



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Gabriela NAUMOVSKA

**UPORABA CRISPR-CAS9 PRI GENETSKI
MODIFIKACIJI TOPOLA ZA IZBOLJŠANJE
SPOSOBNOSTI FITOREMEDIACIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Gabriela NAUMOVSKA

**UPORABA CRISPR-CAS9 PRI GENETSKI MODIFIKACIJI TOPOLA
ZA IZBOLJŠANJE SPOSOBNOSTI FITOREMEDIACIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

**USE OF CRISPR-CAS9 IN GENETIC MODIFICATION OF POPLAR
FOR IMPROVEMENT OF PHYTOREMEDIATION ABILITIES**

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes

Ljubljana, 2020

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Uroša Petroviča.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Uroš PETROVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum predavitve: 10. jul. 2020

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 606:502:602.6:582.7(043.2)
KG	Genetska modifikacija, topol, CRISPR, fitoremediacija
AV	NAUMOVSKA, Gabriela
SA	PETROVIČ, Uroš (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2020
IN	UPORABA CRISPR-CAS9 PRI GENETSKI MODIFIKACIJI TOPOLA ZA IZBOLJŠANJE SPOSOBNOSTI FITOREMEDIACIJE
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VI, 20 str., 1 pregl., 5 sl., 45 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Naše dejavnosti na Zemlji so v antropocenskem obdobju, v katerem smo okolje zastrupili s težkimi kovinami, herbicidi, eksplozivi in z drugimi kemikalijami, močno škodile rastlinam in živalim. Znanstveniki so začeli razvijati različne vrste remediacije šele takrat, ko smo se posledic naših dejanj zavedli, vendar je bila večina teh remediacij zelo draga in zelo zahtevna za izvedbo. Najcenejša, vendar časovno najbolj zahtevna metoda je fitoremediacija, torej remediacija okolja s pomočjo rastlin. Izmed vseh vrst rastlin je za tovrstni postopek zaradi svoje odpornosti in sposobnosti za hitro adaptacijo na različna okolja najbolj primeren topol. Njegova edina težava je njegova počasna presnova, ki pa je lahko za potrebe fitoremediacije ustrezno spremenjena s pomočjo genetske manipulacije. Na področju genetske manipulacije je trenutno zelo priljubljena metoda CRISPR. Cilj te diplomske naloge je predstaviti uporabo metode za utišanje spolnih genov pri topolih, s čimer bi pridobili sterilne topole, ki bodo lahko uporabni kljub omejitvam, ki so določene z zakonom za uporabo genetsko spremenjenih rastlin. Poleg tega je namen naloge podati ideje za izboljšanje metode CRISPR pri vstavljanju genov, ker je prav ta postopek izjemno pomemben pri ustvarjanju topolov z izboljšanimi fitoremediacijskimi sposobnostmi. Pri topolih so bili z drugimi metodami za genetsko modifikacijo že testirani različni geni, ki izboljšujejo fitoremediacijo. Vendar obstaja tudi veliko genov, katerih ogromni potencial je dokazan pri manjših rastlinah, katere bi jih bilo v prihodnosti dobro testirati tudi na topolih. Vstavljanje različnih fitoremediacijskih genov z metodo CRISPR bi zato lahko bilo zelo učinkovit način za remediacijo onesnaženih območij.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 606:502:602.6:582.7(043.2)

CX Genetic modification, poplar, CRISPR, phytoremediation

AU NAUMOVSKA, Gabriela

AA PETROVIČ, Uroš (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2020

TI USE OF CRISPR-CAS9 IN GENETIC MODIFICATION OF POPLAR FOR IMPROVEMENT OF PHYTOREMEDIATION ABILITIES

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VI, 20 p., 1 tab., 5 fig., 45 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Our activities on this planet in the anthropocene have had a negative influence on plants and animals due to the contamination of the environment with heavy metals, herbicides, explosives and other chemicals. Scientists started developing different methods for remediation only once we became aware of the consequences of our actions, though most of them are expensive and technically demanding. The most affordable, but time-consuming method is remediation by plants, i.e. phytoremediation. Among all the different species of plants the most suitable for phytoremediation is poplar, due to its resistance and ability to adapt to different environments. The problem is that poplar trees have slow metabolism, but for phytoremediation purposes this can be solved with genetic engineering. CRISPR technology is currently very popular in the field of genetic engineering. Our goal is to use this technology to suppress the floral genes in poplars, which would result in sterile poplars that could be used also in cases where existing laws prohibit the use of genetically modified plants. We also want to come up with ideas for improving the CRISPR method for gene insertion since this process is extremely important in creating poplars with improved phytoremediation ability. Various genes that improve phytoremediation have already been tested in poplars by using other methods for genetic modification. However, there are also many such genes that have their great potential proven in smaller plants, which should be tested on poplars in the future as well. Insertion of various genes for phytoremediation by the CRISPR method could be a very effective method for the remediation of contaminated zones.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 CRISPR-CAS9 ZA INAKTIVACIJO GENOV	3
2.1 STERILNI TOPOLI	4
2.1.1 Gen <i>LEAFY</i>	4
2.1.2 Gen <i>AGAMUOS</i>	4
2.2 TOPOLI Z VEČJO VSEBNOSTJO LIGNINA	5
3 CRISPR-CAS9 ZA VSTAVLJANJE GENOV	6
3.1 FITOREMEDIACIJE S POMOČJO CITOKROMOV P450	7
3.2 KADMIJ FAKTOR 1 ZA ONESNAŽENA TLA V BLIŽINI RUDNIKOV	9
3.3 IZ S SELENOM ONESNAŽENIH OKOLIJ DO PROTIRAKAVE UČINKOVINE	10
3.4 FITOREMEDIACIJA EKSPLOZIVOV	11
3.5 REMEDIACIJA HERBICIDOV	13
3.6 POVZETEK NAVEDENIH METOD ZA FITOREMEDIACIJO	14
4 Z ENIM POSKUSOM DO STERILNIH TOPOLOV Z IZBOLJŠANIMI FITOREMEDIACIJSKIMI SPOSOBNOSTMI	14
4.1 VSTAVLJANJE GENA S HOMOLOGNO REKOMBINACIJO	15
4.2 VSTAVLJANJE GENA Z NHEJ	16
5 ZAKLJUČEK	17
6 VIRI	17

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Primerjava deležev odstranjenih onesnaževalcev s transgenimi in netransgenimi topoli (na podlagi podatkov iz Doty in sod. 2007).	9

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: PBLAST potrjuje veliko podobnost med proteinskima zaporedjema proteina AGAMOUS vrst <i>Populus euphratica</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
Slika 2: Prekinitev verige DNA v prvem eksonu gena LEAFY s Cas9.	15
Slika 3: Ciljni gen s potrebno rezistenco za uspešno transformacijo; vsak promotor ima svoj ustrezen promotor. Začetna oligonuleotida (modri puščici) vsebujeta homologni ročici (oranžno) na začetku in na koncu zaporedja.	15
Slika 4: Prekinitev verige DNA v prvem eksonu neželenega gena in vstavljanje želenega gena s pomočjo homologne ročice.	16
Slika 5: Vstavljanje gena z NHEJ, vijolično označen del je mesto prereza za Cas9	16

1 UVOD

Za vse težave v okolju obstajajo rešitve, in kot vedno se rešitve skrivajo v naravi. Vendar pa težav, ki smo jih povzročili ljudje, narava sama ne zmore več odpraviti. V katerokoli smer se bo človeška evolucija razvila, brez narave ne bo zmogla. Hrana, voda in zrak so samo najbolj osnovne dobrine, ki nam jih ponuja. Napredki na področju tehnologije so zato brez dvoma potrebni, še bolj pomembni pa so v tem trenutku napredki na področju biotehnologije in še posebej okoljske biotehnologije.

Samo v Evropi obstaja 340.000 območij, označenih kot onesnažena. Za njihovo remediacijo je potrebnih 6,5 milijard evrov letno (Eionet, 2020). Višina tega zneska je posledica uporabe napačnih remediacijskih metod. Najpogosteje uporabljena metoda je filtracija tal, ki zahteva odstranjevanje kontaminiranih površin z njihove primarne lokacije in remediacijo s pomočjo filtriranja in uporabe različnih kemikalij (Peuke in Rennenberg, 2005). Druga metoda, ki bi bila cenejša, je mikrobiološko čiščenje ali bioremediacija, vendar je težava pri njej ta, da imajo mikroorganizmi zelo majhno biomaso in potrebujejo posebne pogoje, hranila, temperaturo, vlažnost in pH, ki bi jih bilo v ekstremnem onesnaženju težko zagotoviti (Kang, 2014).

Navzoči onesnaževalec je pogosto surovina ali produkt industrije, ki deluje v bližini onesnaženega območja. Tla so najpogosteje onesnažena s težkimi kovinami in mineralnimi olji, podzemne vode pa so najpogosteje onesnažene z benzenom, toluenom, etilbenzenom in ksilenom (BTEX) (Panagos in sod., 2013). S takšnimi okoljskimi problemi, ki lahko povzročajo razne zdravstvene težave pri ljudeh in živalih ter težave pri rasti rastlin, se srečujemo tako v Evropi kot tudi drugod po vsem svetu.

Ker živimo v svetu, v katerem ima ekonomija velik vpliv na vsakršno odločitev, je naš cilj poiskati rešitev, ki bo vzpostavila ravnovesje med naravo in družbo. Za remediacijo okolja je bilo uporabljenih že veliko metod, vendar pogosto za previsoko ceno ali s prenizko učinkovitostjo. Genetske spremembe rastlin, posebej pri drevesih z veliko biomaso kot so topoli, so optimalna rešitev za ekološke težave (Peuke in Rennenberg, 2005).

Rastline so, podobno kot jetra pri ljudeh, same po sebi sposobne akumulacije ali predelave škodljivih substanc (Hannink in sod., 2002). Naša naloga je, da poiščemo gene, ki rastlinam pri tem pomagajo, in jih pomnožimo; rešitev pa lahko poiščemo celo pri drugem organizmu in njegove koristne sposobnosti prenesemo v rastlino z večjo biomaso, ki bo imela večjo učinkovitost na večji površini.

Topoli so za fitoremediacijo že bili uporabljeni. Njihove sposobnosti razgrajevanja in skladiščenja različnih snovi so že bile dokazane, vendar pa imajo zaradi svoje velikosti počasno presnovo. Posledično lahko, če želimo hitre rezultate na velikih površinah, ustvarimo

topole s sposobnostjo razgrajevanja in skladiščenja samo določenega onesnaževalca. Potencialne rastline za fitoremediacijo, kot so *Nicotiana tabacum* (tobak), *Arabidopsis thaliana* ali *Oryza sativa* (riž), so predmet raziskovanja že dalj časa, vendar pa bi morale za dovoljšno učinkovitost zaradi svoje majhne biomase zavzeti zelo veliko površino (Doty, 2008).

Topol ima kot drevo že sam po sebi veliko biomaso in je zato idealna rastlina za fitoremediacijske namene. Prav tako tudi hitro raste in ima širok razpon korenin, kar mu omogoča, da absorbira onesnaževalce z večjih površin in iz globljih slojev tal, kamor korenine manjših rastlin ne morejo doseči. Brez težav se prilagaja na različne vrste tal in različna podnebja. Poleg tega ima tudi visoko toleranco na različne onesnaževalce in ima visoko genetsko biodiverzitetu (Baldantoni in sod., 2014; Doty, 2008).

Genetski inženiring ima v Evropi še vedno visoke omejitve. Eden glavnih vzrokov za to je njegov potencialen vpliv na biodiverzitetu. Rastline, ki imajo fiziološke prednosti pred ostalimi rastlinami, lahko s časom v istem okolju prevladajo nad netransgenimi rastlinami. Obstoj genetsko modificiranih rastlin v Sloveniji ureja Zakon o soobstoju gensko spremenjenih rastlin z ostalimi kmetijskimi rastlinami (ZSGSROKR, 2009), ki zahteva številne varnostne ukrepe. Da omogočimo uporabo fitoremediacijskih topolov kljub zakonskim omejitvam, lahko uporabimo sterilne topole z izboljšanimi fitoremediacijskimi sposobnostmi. Sterilne topole lahko ustvarimo s pomočjo metode CRISPR, ki je bila odkrita v bakterijskem genomu. Pri bakterijah so CRISPR gruče specifičnih zaporedij, ki so prekinjena s kratkimi palindromnimi ponovitvami in ki pomagajo bakterijam pri njihovem imunskem odzivu proti virusom. Iz tega je bila razvita metoda za genetsko manipulacijo, ki utiša gene v različnih organizmih na osnovi 20 bp dolgega zaporedja (Horvath in Barrangou, 2010). Uporaba metode CRISPR za genetsko modifikacijo (GM) topola za fitoremediacijo onesnaženega okolja je možna rešitev za remediacijo velikih, trenutno neuporabnih površin.

Pojav tehnologije CRISPR je v zadnjih letih prinesel velik napredek na področju medicine, biologije, rastlinske in živalske biotehnologije predvsem zato, ker dovoljuje specifične modifikacije pri različnih organizmih (Basharat in sod., 2018). Uspešnost te tehnologije se je pokazala pri inaktivaciji genov, vendar pa so v tem primeru še bolj pomembne njene zmožnosti za vstavitev genov. Na tem področju je pričakovati še veliko napredka.

1.1 NAMEN DELA

Da bi vse naše življenjske potrebe zadovoljili na globalni ravni, smo razvili industrije, ki so napredovale do te mere, da si danes življenja brez njih ne moremo predstavljati. Ker je od njih odvisna svetovna družba in ekonomija, jih vseh v kratkem času ne moremo zamenjati z manj onesnaževalnimi oblikami, kljub temu, da je na tem področju veliko dela. Tudi če bi jih

zamenjali, bo onesnaženje na območju, kjer je stal industrijski obrat, še vedno prisotno, ker lahko okolje ostane onesnaženo še dolgo po prenehanju delovanja industrije.

Rešitev za to onesnaženje so lahko zeleni pasovi okoli industrijskih con, porasli z visokimi topoli, ki so genetsko spremenjenimi tako, da so sterilni in pripravljeni za remediacijo najbolj pogostega onesnaževalca v okolju. Takšni pasovi bi pretvarjali ekstremno onesnažena območja v plodna in ekonomsko funkcionalna.

2 CRISPR-CAS9 ZA INAKTIVACIJO GENOV

Med prvimi drevesi, na katerih je bila uporabljena metoda CRISPR, je bil topol. V prvem poskusu je bilo izvedena inaktivacija gena *PtoPDS*, ki kodira fitoen desaturazo. Ker ima fitoen desaturaza vlogo v biosintezi klorofila, je bila posledica uspešne inaktivacije pojav albino fenotipa. Z 51,7-odstotno uspešnostjo so Di in sod. (2015) dokazali, da je uporaba CRISPR metode možna in dovolj učinkovita tudi pri kompleksnih rastlinskih genomih.

Pri uporabi CRISPR tehnologije je najbolj pomemben korak izbira tarče in zaporedja vodeče RNA. Tarčnemu podobno zaporedje je lahko prisotno tudi na drugem lokusu, vendar je verjetnost za povsem identično zaporedje 20 nukleotidov zelo majhna. Če se podobno zaporedje od tarčnega razlikuje za 5 ali manj nukleotidov, ga upoštevamo kot možno zunanjo tarčo, zato se takšnim zaporedjem izogibamo (Ran in sod., 2013). Za izračun ocene ujemanja in podobnosti zunanjih tarč obstaja več različnih spletnih orodij: CCTop, NMD CRISPR Cas9, CRISPOR, zifit in druga. Pri uporabi teh orodij za načrtovanje eksperimenta z metodo CRISPR za vstavljanje ciljnega gena in organizma v spletnem orodju pridobimo vse možne izbire in tarče s ponujenimi 20 bp dolgimi zaporedji.

V ustrezen vektor vstavimo kodirajoči zaporedji za izbrano vodečo RNA in za protein Cas9. Vodeča RNA prepozna specifično zaporedje na tarčni DNA, za katerim se nahaja 3 bp dolgo zaporedje PAM, ki omogoči, da se Cas9 zaustavi na določenem odseku DNA. Zaporedje PAM skupaj z vodečo RNA usmeri Cas9, da prekine DNA zaporedje med tretjim in četrtem nukleotidom navzgor od zaporedja PAM (Ran in sod., 2013). Sestavljeni vektor s pomočjo bakterije *Agrobacterium tumefaciens* vnesemo v razrezano rastlinsko tkivo in ga pustimo na gojišču, kjer se formirajo kalus, korenine in poganjki, ki bodo postali rastlina za fitoremediacijo okolja.

Vodeča RNA je tista, ki odloča, ali bo naš eksperiment uspešen. Zato izbiramo takšna zaporedja, ki ciljajo na prvi oziroma drugi ekson. Najboljša opcija je kombinacija obeh, ker v teh primerih izzovemo obsežne delecije, ki zagotovo povzročijo inaktivacijo tarčnega gena (Fan in sod., 2015).

2.1 STERILNI TOPOLI

Sterilizacijo topola je mogoče opraviti s ciljanjem gena za cvetenje rastlin, in sicer *LEAFY* (*LFY*) – gen, ki je odgovoren za razvoj cvetnega meristema, ali *AGAMOUS* (*AG*) – gen, ki je odgovoren za razvoj cvetnih organov kot so prašniki, pestič in semenska zasnova. V eksperimentu, pri katerem je bilo izvedeno odstranjevanje genov *LFY* in *AG*, je bila uporabljena tehnologija CRISPR, s katero so dosegli 61,3-odstotno uspešnost (Elorriaga in sod., 2018). Podoben poskus za sterilizacijo topola je bil izveden z metodo ZNF (angl. *zinc finger protein*), pri kateri so dosegli le 3-odstotno uspešnost (Lu in sod., 2016), kar pojasni, zakaj ima CRISPR metoda prednost pred ostalimi metodami.

2.1.1 Gen *LEAFY*

LEAFY (*LFY*) je gen, ki je bil dolgo raziskovan pri vrsti *Arabidopsis thaliana*, vendar je njegova vloga podobna tudi pri topolih. *LEAFY* se aktivira že v zgodnji fazi rasti cvetnih meristemov. Pri deaktivaciji tega gena lahko že na začetku rasti rastlin dobimo razvite sterilne topole. Leta 2015 so Klocko in sodelavci takšno deaktivacijo testirali v poljskem poskusu z RNAi genetsko modificiranega topola. V prvih dveh letih je med 15 rastlinami imela le 1 rastlina 100-odstotno uspešnost sterilnosti, kar pomeni, da ni imela nobenih spolnih organov in je še vedno imela normalno rast. Topol je imel minimalne razlike v rasti, in sicer za 10 % manjšo rast. Pri opazovanih topolih ovule in brsti niso bili prisotni, kar pomeni, da so bili osnovni elementi za razmnoževanje pri rastlini uspešno odstranjeni. To so rezultati, ki si jih želimo pri sterilnih topolih. Vendar je v tem primeru težava ta, da je *LFY* gen, ki uravnava razvijanje cvetnih meristemov na začetku rasti, uravnavanje le-teh pa ni zagotovljeno pri nadaljnji rasti (Klocko in sod., 2016). Zato lahko sterilnost zagotovimo z inaktivacijo še enega gena, odgovornega za identiteto cvetnih organov – gena *AGAMOUS*.

2.1.2 Gen *AGAMUOS*

Bowman in sodelavci (1989) so delovanje gena *AGAMOUS* raziskovali pri vrsti *A. thaliana*. Ob prisotnosti mutiranega *AG* gena pri *A. thaliana* so opazili odsotnost pestičev in prašnikov. Na ostalih organih ni bilo vidnih drugih sprememb – čašni in cvetni listi so bili normalno razviti. To pomeni, da se rastline še vedno normalno razvijajo in da je njihov videz podoben, vendar pa nimajo možnosti za spolno razmnoževanje. Raziskave za utišanje gena *AG* pri topolih, so bile opravljene samo na genskem nivoju, bile so preverjene s PCR in s sekvenciranjem, rastline pa niso bile naprej opazovane za določitev vpliva utišanja (Elorriaga in sod., 2018). Zaporedji proteinov *AG* pri topola in *A. thaliana* sta 64-odstotno identični (Slika 1). Pri topolih se je v preteklosti *AGAMUOS* podvojil, njegov paralog (paralogni gen) ima enako funkcijo, zato sedaj obstajata *AG1* in *AG2*. Na osnovi odstotka podobnosti proteinov *AG* med topolom in *A. thaliana* lahko sklepamo, da imajo proteini *AG* enako vlogo, vendar lahko vplivajo na spolnost z različno intenziteto. Zato so na tem področju potrebne dodatne raziskave.

AGAMOUS-like 19 [*Arabidopsis thaliana*]

Sequence ID: [NP_001320037.1](#) Length: 219 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 214 [GenPept](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
253 bits(647)	6e-85()	Compositional matrix adjust.	137/215(64%)	169/215(78%)	5/215(2%)	
Query 1	MVRGKTQMKRIENATSRQVTF	SKRRRNGLLKKAFELSVLCDAEVALIVFSTRGKLYEFSSS	60			
sbjct 1	MVRGKT+MKRIENATSRQVTF	SKRRRNGLLKKAFELSVLCDAEVAL++FS R KLYEFSSS	60			
Query 61	SINRTIERYQKRAKVDGVISSKMVDNI	EPVKEDFTFLAKKIELLEVSKRKILGEGLETCS	120			
sbjct 61	SI TTIERYQ+R K++G + K DN +	+++T L KKIE LE+SKRK+LGEG++ CS	119			
Query 121	TDELQLENQLERGLTRIRARKNQ	LFRRVEKLLKAEKIMLEENRRLREKC-GMQQLDLS	179			
sbjct 120	+ELQLENQL+R L+RIRA+K QL RE	+EKLKAAE+ +++EN+ L+EK GM ++	179			
Query 180	STRKQQLLEDROI---TEVETEL	FIGPPETRLAPK 211				
sbjct 180	SSQSTLSSSEVNI	DDNMEVETGLFIGPPETRQSKK 214				

Slika 1: PBLAST potrjuje veliko podobnost med proteinskima zaporedjema proteina AGAMOUS vrst *Populus euphratica* in *Arabidopsis thaliana*

2.2 TOPOLI Z VEČJO VSEBNOSTJO LIGNINA

PtoMYB156 je gen, ki ima negativen vpliv na sintezo sekundarnih celičnih sten in lignina pri vsaj treh različnih rastlinskih rodovih, in sicer *Arabidopsis*, *Eucalyptus* in *Populus* (topol). Njegov mehanizem je najbolj raziskan pri topolih. Omenjeni gen ima vlogo v negativnem uravnavanju sinteze fenilpropanoidov in s tem tudi vlogo pri kontroliranju količine lignina, ksiloze in celuloze. Pri povečanem izražanju *PtoMYB156* se količina lignina, ksiloze in celuloze zniža. Pri odstranjevanju *PtoMYB156* pa se delež teh treh komponent v biomase bistveno zviša (Yang in sod., 2017).

Navedene tri komponente – lignin, ksiloza in celuloza – so zelo pomembne pri transportu hranil in vode ter so osnova za odpornost in rigidnost rastlin; pomagajo jim, da zdržijo svojo težo in nadaljujejo svojo rast v vertikali. Pri rastlinah so ekvivalentne kostnemu sistemu živali. Z ekstrakcijo RNA in izvedbo qRT-PCR so Yang in sodelavci (2017) ugotovili, da je *PtoMYB156* najbolj aktiven v starih listih in najmanj v koreninah. S tem si lahko predstavljamo njegov vpliv: organi, ki so najbolj rigidni, imajo najmanjšo aktivnost gena *PtoMYB156*, najbolj občutljivi pa imajo največjo aktivnost tega gena. Ta protein ima optimalno lokacijo v jedru celice. S tem lažje vpliva na vse promotorje, vezane na gene, ki vplivajo na mehanske lastnosti rastlin. *PtoMYB156* je odgovoren za njihovo represijo. Pri prekomernem izražanju navedenega gena so Yang in sodelavci opazili, da je bila rast rastlin zmanjšana za 60 %, premer rastlin pa za 35 %. Prav tako so opazili vpliv na velikost listov, razvejanost korenin in poganjkov.

Pri topolih je bila izvedena inaktivacija gena *PtoMYB156* s pomočjo tehnologije CRISPR po postopku, ki je opisan v točki 2 te diplomske naloge. Pri tem poskusu niso bile opažene

nobene očitne fenotipske razlike na rastlini, vendar pa je bilo pri mikroskopski analizi opaženo očitno povečanje ksilemskih tkiv in deleža lignina, ksiloze in celuloze (Yang in sod., 2017). Na podlagi navedenega lahko zaključimo, da bi imele takšne rastline videz podoben divjemu tipu, vendar bi bile zaradi večje rigidnosti in stabilnosti bolj odporne na slabe vremenske pogoje, zdržale bi dlje časa in bile manj dostopne za živali, ki bi lahko raznašale njihov genetsko modificirani material. S tem bi se lahko tudi delno izognili omejitvam, ki jih določa Zakonu o soobstoju gensko spremenjenih rastlinah z ostalimi kmetijskimi rastlinami.

3 CRISPR-CAS9 ZA VSTAVLJANJE GENOV

Uporaba tehnologije CRISPR za vstavljanje genov se še vedno razvija in je ogromnega pomena za napredek na področju biotehnologije. Vstavitev s CRISPR je večinoma opravljena na način, da se vstavi nov gen tako, da se popravljanje dvojno verižnih prelomov izvede s homologno rekombinacijo (Li in sod., 2015), vendar se le-ta ne pojavlja tako pogosto kot združevanje nehomolognih koncev (NHEJ). Homologna rekombinacija zahteva veliko dela na celici, še preden se vstavi gen (Zhang in sod., 2019). Po drugi strani, je ta metoda zelo natančna in gen se bo vstavil na mestu, kjer se homologne ročice prekrivajo z genomom, zato so nekatere metode, ki lahko pomagajo pri popravljanju s homologno rekombinacijo, razložene spodaj.

Pri vstavljanju genov s CRISPR-Cas9 obstajata dve različici. Pri prvi spreminjamo določene aminokislinske tarčnega proteina z namenom, da izboljšamo lastnosti tega proteina. Druga metoda pa zajema vstavljanje celotnega gena in je dosti bolj tehnično zahtevna (Ding in sod., 2016). Kljub vsem napredkom na področju biotehnologije je dosti težko ugotoviti mesto v genomu, kjer bo naš ciljni protein zagotovo deloval oziroma kjer se bo prepisal brez epigenetskega utišanja, vendar pa so v 2020, pri poskusu za obogatitev riža s karotenoidi Dong in sodelavci za insercijo gena, ki se bo zagotovo izrazil, uporabili statistično varna mesta za vstavljanje gena v rižev genom. Ta mesta še vedno niso odkrita pri topolu, vendar s statistično analizo prejšnjih insercij lahko ta mesta ugotovimo tudi v njegovem genomu.

Pri inserciji s homologno rekombinacijo, ko določimo lokacijo za vstavljanje našega tarčnega gena, dodamo na njegovih koncih še homologni ročici, ki sta identični zaporedjema okoli mesta prekinitve DNA v genomu. Genetska modifikacija pri rastlinah se najpogosteje izvaja z bakterijo *A. tumefaciens*. V teh primerih moramo poleg tarčnega gena dodati še dva gena za rezistenco, in sicer enega za bakterijo in enega za rastlino, vsakega s svojim promotorjem. Dodajanje tako velikih zaporedij s homologno rekombinacijo je izziv, vendar je le-to možno z razporeditvijo tarčnega gena na enem vektorju in Cas9 z vodečo RNA na drugem vektorju. Dodajanje manjših zaporedij, kot so geni za proteinske oznake, z metodo CRISPR in homologno rekombinacijo, se že izvaja kot rutinski postopek (Invitrogen, 2019; Koch in sod., 2018).

Vstavljanja z metodo CRISPR so bila izvedena na različnih organizmih, vendar pa je možnosti za napredek še veliko. Vemo, da ima pri vretenčarskih celicah in kvasovkah homologna rekombinacija prednost pred NHEJ v S-faze celičnega cikla, kar pomeni, da bi bilo CRISPR vstavljanje najlažje prav tekom le-te (Ray in Langer, 2002). Poskusi na področju rastlinskih modifikacij še vedno niso bili izvedeni, vendar pa lahko glede na to, da se faze celičnega cikla med različnimi organizmi ne razlikujejo veliko, na podobne rezultate računamo tudi pri rastlinah.

Drugi način za inaktiviranje NHEJ bi lahko bil inaktivacija zanjo ključnih encimov, kot je na primer Rad50. Rad50 je pri kvasovkah del proteinskega kompleksa Rad50/Mre11/Xrs2, ki se uporablja pri NHEJ. Pri inaktivaciji Rad50 so kvasovke veliko bolj občutljive na sevanje, imajo slabo nehomologo in zelo izrazito homologno rekombinacijo. Podobno so dokazali tudi s poskusom na *A. thaliana*, ki je bila po inaktivaciji Rad50 še vedno viabilna, vendar hipersenzitivna na radio-mimetična sredstva (Gherbi in Gallego, 2001). Če je rastlina mutant za Rad50, bi morala spremeniti popravljalni sistem iz nehomolognega v homolognega, kar je potrjeno s poskusom na *A. thaliana*. Rastlina lahko preživi, vendar pa ne vemo, ali bo še vedno tako vzdržljiva ter ali se bo prilagodila na različne pogoje, česar je topol sposoben sam po sebi.

Čeprav je bilo v številnih raziskavah dana prednost homologni rekombinaciji pred NHEJ, so v raziskavi za zdravljenja hemofilije z gensko terapijo dokazali, da je kombinacija CRISPR z NHEJ lahko celo bolj učinkovita kot homologna rekombinacija, ker se v organizmu izvaja bolj pogosto (Zhang in sod., 2019).

Vstavljanje z NHEJ je bilo opravljeno tudi v študiji o vstavljanju genov za sintezo karotenoidov v riž (Dong in sod., 2020). Ta študija je bila še bolj napredna, ker so za ekspresijo proteinov uporabljali gensko »varna pristanišča«. To so mesta, ki so imela najvišjo uspešnost pri vseh prejšnjih insercijah, izvedenih v rižu. Ta »varna pristanišča« so torej mesta, kjer gen ne bo mutiran in ne bo motil dela nekaterih drugih genov. V topolu še ne poznamo »varnih pristanišč«, vendar s statistično analizo lokacij, na katerih smo uspešno vstavili predhodne gene, lahko takšna mesta poiščemo.

3.1 FITOREMEDIACIJE S POMOČJO CITOKROMOV P450

Onesnaževanje je v večini urbanih središč danes velik problem. Ta problem povzročajo ne samo avtomobili, detergenti ter večina tovarn, ampak tudi naše nezavedanje v kakšno usodo peljemo naš planet. Vse to ponavadi delamo, dokler mi sami ne začutimo zdravstvenih težav. Med onesnaževalci so večje breme na okolje hlapni ogljikovodiki:

- TCE – industrijski razmaščevalec.
- Vinil klorid – dokazani karcinogen, ki ga tvorijo mikroorganizmi, ki predelujejo TCE.

- Kloroform – uporablja se kot topilo in je sestavni del pesticidov, lakov in lepil.
- Ogljikov tetraklorid – laboratorijsko topilo; sestavni del čistilnih in razmaščevalnih sredstev.
- Benzen – karcinogena kemikalija uporabljena v plastiki, smoli in detergentih.

Njihov vpliv se zaradi hlapnost hitro širi. Poleg v zraku je njihov učinek prisoten tudi v deževnici in v tleh (Doty in sod., 2007). To pomeni, da je njihov vpliv pomemben in da lahko hitro uidejo izpod našega nadzora.

Ena izmed možnih rešitev za okoljske težave je topol. Topol je sposoben sprejeti onesnaževalce iz tal s sprejemom vode in mineralov iz njih. Poleg tega je sposoben absorbirati onesnaževalce tudi iz zraka. Do tega vnosa lahko pride s pomočjo absorpcije skozi stomate v mezofil lista ali preko adsorpcije v kutikulo. Ko so onesnaževalci enkrat v mezofilu lista, postanejo substrat za encim, ki smo ga dodali zato, da jih razgradimo (Seco in sod., 2007). Topol bi lahko počistil onesnaževalce iz tal ter iz zraka, vendar brez naše pomoči ni dovolj učinkovit. Zaradi večje učinkovitosti je v tem primeru potrebno izvesti genetsko modifikacijo za pospešitev fitoremediacijskega procesa.

Pri sesalcih obstajajo proteini, imenovani citokromi P450, ki so prisotni v različnih celicah, vendar so najbolj aktivni v jetrih, njihova aktivnost pa je močno inducirana z etanolom, ker sodelujejo pri oksidaciji etanola. Poleg tega ima ta encim afiniteto za substrate z nizko molsko maso, kot so lahko različni ksenobiotiki, ki pridejo v naše telo. Takšne so snovi so zdravila, pesticidi, kozmetika, arome, aditivi za hrano, industrijske kemikalije in onesnaževala iz okolja (Meskar in sod., 2001). Hkrati so ti encimi sposobni biotransformacije več različnih prokarcinogenov in protoksinov, med katere sodita tudi vinil klorid in benzen (Gurusamy in Shewade, 2014). Vstavljanje gena za CYP2E1 v topol pa povzroča izboljšane fitoremediacijske sposobnosti. S citokromom P450 2E1 genetsko modificirani topoli so zelo učinkoviti pri odstranjevanju trikloroetilena, kloroforma in benzena iz zraka (Doty in sod., 2007).

Topoli so uporabni za fitoremediacijo raznih snovi: herbicidov, živega srebra, kadmija, svinca, selena in različnih kovin, ki se nahajajo v tleh. Vendar pa je še bolj pomembno, da topole modificiramo za fitoremediacijo snovi kot so TCE, vinil klorid, kloroform, ogljikov tetraklorid in benzen, ki so poleg za okolje nevarne tudi za nas – so karcinogeni, nevrotoksični oziroma hepatotoksični (Doty in sod., 2007).

Leta 2007 so Sharon L. Doty in sodelavci opravili poskus, pri katerem so s klasičnimi pristopi oziroma z *A. tumefaciens* modificirali rastlino. Pri tem so dokazali, da imajo transgeni topoli povprečno 45-krat hitrejši metabolizem za absorpcijo TCE v primerjavi z netransgenimi. Da bi preverili povezavo med genom in povečano aktivnostjo, so uporabili metodo qRT-PCR in

določili število kopij v vsakem transgenem topolu. Opazili so, da imajo tisti topoli, ki imajo več kopij gena *CYP2E1*, tudi večjo aktivnost.

Značilne razlike med transgenimi in netransgenimi topoli so prikazane v Tabeli 1. Te relativno velike razlike prikazujejo, zakaj so prav genetsko modificirani topoli potrebni v sistemu za fitoremediacijo, ter koliko bolj poceni in hitreje se onesnažena okolja lahko rešijo z vplivom biotehnologije na reševanje ekoloških katastrof.

Preglednica 1: Primerjava deležev odstranjenih onesnaževalcev s transgenimi in netransgenimi topoli (na podlagi podatkov iz Doty in sod., 2007).

Onesnaževalec	Netransgeni	Transgeni
TCE	3 %	51-91 %
Vinil klorid	29 %	49 %
Ogljikov tetraklorid	10-22 %	92-94 %
Kloroform	18-20 %	99 %
Benzen	13 %	36-46 %

3.2 KADMIJ FAKTOR 1 ZA ONESNAŽENA TLA V BLIŽINI RUDNIKOV

Odstranjevanje težkih kovin iz tal je dokaj zahteven proces zato, ker kovine niso razgradljive in so toksične za večino rastlin. V njihovi prisotnosti se biomasa rastlin bistveno zniža (Shim in sod., 2013). Poleg njihove toksičnosti za rastline so težke kovine toksične tudi za ljudi, ker se nahajamo na vrhu prehranjevalne verige. Zato je zelo pomembno najti način remediacije težkih kovin iz onesnaženih tal.

Razvoj fitoekstrakcije težkih kovin je na trgu prinesel tudi idejo, ki se imenuje fitoatenuacija. S tem postopkom so rastline lahko najprej uporabljene za počasno fitoremediacijo samo na srednje onesnaženih tleh in lahko iz njih nato pridobimo bioenergijo. To je dober način, s katerim bi fitoremediacija prinesla dodaten pozitiven vpliv na ekonomijo, vendar pa ta metoda ni priporočljiva za zelo onesnažena tla, ker je upravljanje s težkimi kovinami tekom pridobivanja bioenergije za trenutno tehnologijo še vedno izziv (Meers in sod., 2010). Poleg tega, da metoda izgleda koristna, ker poleg pozitivnih učinkov na okolje prinaša tudi dohodek, obstajajo pri njej tudi slabe strani, saj postopek ni okoljsko sprejemljiv, ker vključuje gorenje materialov za odstranjevanje težkih kovin. Metoda ni priporočljiva, dokler ne najdemo boljše rešitve, ki ne bo zahtevala gorenja in s tem tveganja za sprostitvev težkih kovin v okolje.

Kadmij je zelo toksičen in zelo pogost onesnaževalec v bližini rudnikov ter v bližini območij, kjer so se uporabljala fosforjeva gnojila, ki vsebujejo Cd, kot sredstva za rast rastlin. Dodatni viri kadmija, ki onesnažujejo okolje so lahko: blato iz odplak, gnoj, sežig komunalnih odpadkov, proizvodnja barvnih kovin in kurjenje fosilnih goriv (Roberts, 2014). Kadmij je zelo toksičen tudi za ljudi, ker povzroča bolezni, ki imajo lahko zelo hude bolezenske simptome, kot na primer mehčanje kosti in odpoved ledvic (Nogawa K., 1981, cit. po Shim in

sod., 2013). Za fitoremediacijo kadmija je že bila testirana rastlina *Arabidopsis halleri*, vendar njene kratke korenine ter relativno majhna biomasa ne zadoščata za fitoremediacijo obsežnih onesnaženih površin. Zato so drevesa spet boljša izbira, saj je poleg njihove bistveno večje biomase in daljših korenin pri njih tudi manjša verjetnost, da pridejo težke akumulirane kovine v prehransko verigo, saj topoli niso del prehranske verige domačih živali ali človeka.

Več rastlin je že bilo na različne načine modificiranih za fitoremediacijo kadmija, vendar so najboljše rezultate pri tem dosegli topoli z vstavljenim genom kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* za protein Ycf1 (*yeast cadmium factor*; *ScYCF1*). Protein Ycf1 se v kvasovkah nahaja na membrani vakuole. Vlogo ima pri absorpciji težkih kovin in le-te naredi manj škodljive za celico tako, da jih kelira z glutationom. Ta transporter omogoča prenos z glutationom konjugiranega kadmija v vakuole tudi v rastlinah, kjer je največji volumen za skladiščenje v celici (Shim in sod., 2013). S tem se tolerantnost rastlin na kadmij poveča.

Shim in sodelavci so leta 2013 izvedli poskus z genetsko spremenjenimi topoli z genom *ScYCF1*. Vstavljanje gena je bilo s klasičnim postopkom izvedeno z *A. tumefaciens*. Uspešnost transformacije so testirali na izoliranih tleh v bližini južnokorejskega rudnika Kumho Zn. Tla so bila onesnažena z vsebnostjo kadmija do 43 mg/kg. Vsi genetsko nespremenjeni topoli so v tem okolju imeli nekrozo tkiv, genetsko spremenjene rastline pa so vzdržale tudi te ekstremne pogoje. Poleg kadmija so bile v testiranih tleh visoke koncentracije arzena, bakra, svinca in cinka, vendar so topoli z Ycf1 dosegli visoko biomaso, dolge korenine in skoraj normalno rast, kar se v teh pogojih ne bi moglo zgoditi, če rastlina ne bi bila genetsko spremenjena. Poleg tega so bile YCF-rastline sposobne odstraniti kar 40 % kadmija, ki je bil prisoten v tleh, divji tip pa je odstranil le 18 %. Poljski poskusi so v tem primeru trajali eno leto, vendar pa glede na to, da kadmij na dolgi rok povzroča nekrozo in zmanjšano rast netransgenih rastlin, ne moramo računati, da bodo te rastline preživele tudi dlje časa. Poleg izjemnih sposobnosti za skladiščenje večjih količin kadmija so transgene rastline pokazale, da so v svojih koreninah sposobne tudi fitostabilizacije cinka in svinca.

Topoli so za fitoremediacijo sposobni sami po sebi, vendar pa za rast v ekstremnih pogojih, kot so na primer zelo onesnažena tla v bližini rudnikov ali industrijskih con, niso pripravljeni. Genetska sprememba takšnih rastlin lahko v zelo kratkem času neuporabne in zapuščene mrtve cone spremeni v ekonomsko koristna območja.

3.3 IZ S SELENOM ONESNAŽENIH OKOLIJ DO PROTIRAKAVE UČINKOVINE

Današnji agrosistem (t.j. ekosistem, v katerem prevladujejo nenehni kmetijski posegi človeka) je zelo pogosto onesnažen s težkimi kovinami, ena izmed katerimi je tudi selen. Novodobna družba sprošča selen v okolje iz različnih virov, med katerimi so gnojila, blato iz odplak, mestni promet, cementarna industrija, kovinska industrija in elektrarne (Sarwar in sod., 2017). Selen je sicer hranilna snov za rastline in živali, vendar pa ga organizmi potrebujejo le v

relativno nizkih koncentracijah. Povečane koncentracije selena so toksične za vse vrste in pri ljudeh lahko povzročijo izgubo las, zob, nohtov in utrujenost, pri živalih pa okvare plodu ali sterilnost (MacFarquha in sod., 2010).

Med rastlinami obstajajo hiperakumulatorji selena, ki imajo potrebo po visokih koncentracijah le-tega, vendar so takšne rastline zelo počasi rastoče in je zato fotoremediacija z njimi neučinkovita. Boljša možnost za fitoremediacijo selena so hitro rastoče rastline. To je do sedaj bilo narejeno pri indijski gorčici *Brassica juncea* tako, da so iz počasno rastočega hiperakumulatorja *Astragalus bisulcatus* vzeli gen za selenocistein metiltransferazo (SMT). Encim SMT metilira selenocistein v neškodljivo aminokislino. S tem procesom se zniža tudi koncentracija selenocisteina in selenometionina, ki se sicer lahko toksično inkorporira v proteinih (LeDuc in sod., 2006).

Razgradnja selenita in selenata pri teh rastlinah ne poteka enako, saj rastlina sprejema 10-krat več selenita kot selenata. Selenit je organska reducirana oblika selenata, ki so jo rastline sposobne predelati. Pri rastlinah obstaja tudi encim, ki reducira selenat do selenita, imenovan ATP sulfurilaza (LeDuc in sod., 2006). Rastlina z večjim številom kopij tega encima bo hitreje predelala večje koncentracije selena.

Zato je pomembno, da ima naša fitoremediacijska rastlina oba encima, SMT in ATP sulfurilazo. V tem primeru bo ATP sulfurilaza reducirala selenat, rastline ga bodo metabolizirale v SeCys in SMT ga bo metilirala v MetSeCys. Metliselenocistein ni škodljiv za okolje in ima dodatne protirakave učinke (PubChem CID:147004, 2020). To pomeni, da s fitoremediacijo okolja, onesnaženega z visokimi koncentracijami selena, pridobivamo ne samo pogoje za boljšo rast ostalih rastlin, temveč tudi materiale za proizvodnjo protirakavih učinkovin.

V poskusih z indijsko gorčico, ki je bila genetsko modificirana z genoma za oba encima, je leta napredovala do te mere, da je sprejemala 4 mg selena na 1 g suhe biomase, kar presega celo sposobnosti hiperakumulatorskih rastlin (LeDuc in sod., 2006). Indijska gorčica ima relativno majhno biomaso, kar pomeni, da bo kljub svoji sposobnosti sprejema tolikšne koncentracije selena za učinkovito fitoremediacijo še vedno morala biti razširjena na velikih površinah. Zato je topol že na začetku bolj učinkovita izbira zaradi večje kapacitete korenin, večje biomase ter zaradi večje sposobnosti adaptacije na različna okolja.

3.4 FITOREMEDIACIJA EKSPLOZIVOV

Po več desetletjih proizvodnje in uporabe eksplozivov je bil njihov obstoj vzrok za konec nešteto človeških življenj. Težava pri uporabi eksplozivov je ta, da tudi po eksploziji za seboj pustijo posledice, ki na samem mestu eksplozije ostanejo dlje časa ter so lahko vzrok za še več novih žrtev. Eno samo podjetje, ki je proizvajalo trinitrotoluen (TNT), je lahko izpustilo

dva milijona litrov onesnažene vode s TNT (Jenkins in sod., 1986). Po eksplozijah so tla, na katerih so bile aktivirane TNT bombe, vsebovala tudi do 200 g/kg TNT (Hooker in Skeen, 1999).

Toksičnost TNT se pri ljudeh kaže kot hepatitis ali anemija (Rosenblatt, 1980, cit. po Hannink in sod., 2002). V prvih 8 mesecih prve svetovne vojne v tovarnah delavcev TNT so poročali o 17.000 primerih zastrupitve in 475 smrti (Haythorn, 1920 cit. po Hannink in sod., 2002). Poleg TNT so v tem obdobju uporabljali tudi močnejšo različico le-tega, imenovano Royal Demolition Explosive (RDX). RDX je v skupini nitroaminov manj toksičen, vendar lahko, če je vnešen z vdihavanjem ali zaužitjem, vpliva na centralni živčni sistem (Rosenblatt, 1980, cit. po Hannink in sod., 2002).

Zaradi pogoste kontaminacije tal so le-ta dolgo časa poskušali remediirati z *ex-situ* metodo in z mikroorganizmi, vendar se nobena izmed njih ni izkazala kot dovolj učinkovita in ekonomsko zadostna. TNT se na srečo veže s humusnimi delci in ostane v višjih slojih tal, kar pa za RDX ne velja. Zanj so za bolj učinkovito remediacijo potrebne rastline z globljimi koreninami (Hannink in sod., 2002), kot so korenine topolov.

Kljub temu, da rastlina ne potrebuje ksenobiotičnih snovi, jih v svoj metabolizem sprejema in jih, tako kot jetra pri človeku, predela v treh fazah. Po sprejemu z oksidacijo, redukcijo ali hidrolizo rastlina aktivira ksenobiotik, ga s svojimi molekulami konjugira in ga na kakršenkoli način v varni obliki inkorporira v svoj sistem, ponavadi v vakuole ali v celične stene (Komoša, 1995, cit. po Hannink in sod., 2002).

Rastline imajo zelo omejeno kapaciteto za predelavo eksplozivov. Nekatere rastline so bolj močni hiperakumulatorji, vendar nimajo zadostne biomase za učinkovito fitoremediacijo. Takšne rastline so *Cypers esculentus* (užitna ostrica), *Phaseolus vulgaris* (fižol) ali *Allium schoenopasum* (drobnjak) (Hannink in sod., 2002). Zato so bile raziskane možnosti za fitoremediacijo s pomočjo topolov. Topol brez genetskih modifikacijah lahko absorbira TNT, vendar pa njegova naravna sposobnost ne zadostuje za hitro remediacijo. Zato je pri njem potrebna genetska modifikacija.

Encim nitroreduktaza iz bakterije *Enterobacter cloacae* dokazano pospešuje remediacijo škodljivih nitroaromatskih spojin, med katerimi je tudi TNT (Bryant in sod., 1991). Gen, ki kodira nitroreduktazo, se imenuje *nfsI*. Hannink in sodelavci (2001) so na tobaku izvedli poskus, s katerim so dokazali uspešnost vstavljanja gena *nfsI*. Od 25 transgenih rastlin jih je pri PCR testu kar 22 pokazalo prisotnost gena *nfsI*, vendar so rezultati pokazali, da je bila, ko so rastline zrasle, nitroreduktaza aktivna samo v eni izmed njih. To kaže na potrebo po novih metodah za transformacijo. Ta edina uspešna rastlina je pokazala izjemno dobre rezultate v primerjavi z divjim tipom. Poskus so izvedli pri različnih koncentracijah TNT. Pri koncentraciji 0,25 mM je imel divji tip rastline opazno zmanjšano biomaso (34 %), transgene

rastline pa so rastle nespremenjeno. Divji tip je prav tako pokazal beljenje listov in krnenje korenin, transgeni tip pa je pokazal izjemno uspešnost pri odstranjevanju TNT iz raztopin: pri koncentraciji 0,25 mM je bil TNT v celoti odstranjen v 72 urah.

Ker ima tobak zelo majhne korenine, bodo njegove sposobnosti fitoremediacije na velikih površinah zelo omejene. Zato je potrebno izvesti poskuse s transgenimi topoli z genom *nfsI*. Njihova tolerantnost na TNT je dober pokazatelj njihove uspešnosti na tem področju.

3.5 REMEDIACIJA HERBICIDOV

Agronomi se v kmetijstvu že dolgo zanašajo na uporabo različnih herbicidov. Med njimi so med drugimi tudi kloroacetanilidi, za katere je dokazano, da imajo zelo škodljive učinke na ljudi. Spojini acetoklor in metoklor sta sicer znani kot manj škodljivi, vendar pa sta v več primerih pokazali akutno zastrupitev. Pri ljudeh znižujeta koncentracijo HCO_3 v arterijski krvi, pri starejših osebah pa lahko zastrupitev vodi tudi v komo ali smrt po 24 urah. Ti primeri so bili zaradi zaužitja več kot 20 ml herbicida ekstremni, vendar pa so bile pri ostalih zastrupljenih pacientih opažene tudi poškodbe živcev (Seok in sod., 2012). To lahko pomeni, da bi bil ta herbicid strupen tudi pri daljši časovni uporabi, vendar pa lahko v tem primeru njegova toksičnost ostane neprepoznana. V drugih poskusih na miših je bila prav tako zaznana toksičnost preko nekroze jeter (Ashby in sod., 1996), ki je lahko posledica nizke koncentracije HCO_3 v krvi. Poleg tega so ti herbicidi še vedno med petimi najpogostejše uporabljenimi herbicidi (Meyer in Scribner, 2009). Uporabljajo jih za uničevanje invazivnih rastlin, vendar jih preko tal sprejemajo tudi ostale, za nas koristne rastline, preko katerih lahko herbicidi preidejo tudi do naše prehranske verige. Za omejitev nadaljnje škode lahko uvedemo fitoremedicijo površin, na katerih se kloroacetanilidni herbicidi še vedno uporabljajo ali pa so se uporabljali v preteklosti.

Gullner in sod. (2000) so s topoli naredili poskus, ki je dokazal, da ima encim γ -glutamylcistein sintetaza sposobnost pospešitve razgradnje kloroacetanilidnih herbicidov. Encim γ -glutamylcistein sintetaza (γ -ESC) je regulatorni encim, ki omejuje hitrost biosinteze glutationa (GSH). Povečana koncentracija GSH pri rastlinah je pokazatelj toksičnega okolja ali potrebe po antioksidativni zaščiti. GSH je tiol, ki je sposoben vezati škodljive substance kot so herbicidi in nekatere težke kovine, vendar pa vse rastline ne morejo vzdržati visokih koncentracij γ -ESC. Tobak pri povečani koncentraciji GSH postane nekrotičen ali dobi klorotične simptome, topol pa spada med rastline, ki lahko ta stres vzdržijo.

Pri poskusu je bila genetska transformacija narejena za vstavljanje več kopij gena za γ -ESC. Vzgojene rastline so bile izpostavljene 66 μg herbicida na g tal, kar ima pri rastlinah efekt srednje toksičnosti. V 35 dneh rasti nobena od rastlin ni pokazala nekroze tkiv, vendar pa je bila opažena velika razlika v teži svežega tkiva pri rastlinah. Divji tip rastline je imel za od 40 do 45 % manjšo maso poganjkov, transgene rastline pa za od 23 do 30 %. Korenine so bile

zaradi neposrednega kontakta pod večjim vplivom herbicida. Pri divjem tipu so opazili znižanje koreninske biomase za 70 %, pri transgenih rastlinah pa za 50 %. Z biokemijsko analizo so prav tako zaznali, da je bila koncentracija GSH trikrat večja pri transgenih rastlinah (Gullner in sod., 2000) kot pri divjemu tipu, kar pomeni, da imajo transgene rastline trikrat večjo sposobnost za konjugacijo herbicidov.

Topoli imajo tudi to lastnost, da v svojih tkivih sprejemajo herbicide namesto rastlin, s katerimi se prehranjujemo ljudje in živali. Topoli, ki imajo sposobnost fitoremediacije herbicidov, odstranjujejo škodljive substance iz naših in živalskih prehranskih verig v krajšem časovnem obdobju, kar je bolj učinkovito.

3.6 POVZETEK NAVEDENIH METOD ZA FITOREMEDIACIJO

Zgoraj navedene metode za fitoremediacijo TCE, benzena, vinil klorida, kloroforma, kadmija, selena in herbicidov so izvedene s klasičnim postopkom za naključno vstavljanje gena z *A. tumefaciens* ali z biolistiko. Ta način vstavljanja gena pogosto poškoduje gene za pomembne proteine v rastlinskem genomu. Te metode so do neke mere učinkovite, vendar funkcionirajo z naključno insercijo v genom organizma, ki lahko povzroči znižan donos pri rastlinah. Zaradi tega je čas, da stare metode nadomestimo s tehnologijo CRISPR. Vstavljanje gena z metodo CRISPR je lahko zahtevno, vendar je metoda zelo natančna, in z njo ne izgubimo nobenih za organizem pomembnih proteinov, kot se to lahko zgodi pri metodah z naključno insercijo. S tehnologijo CRISPR lahko vstavimo gen na mesto, ki je za vstavljeni gen varno. To so storili Xiaou Dong in sodelavci leta 2020. V rižu so našli genska »varna pristanišča«, kjer je na osnovi predhodne insercije statistično dokazano, da so ta mesta varna za vstavljanje novih genov, ter tam gen ne bo mutiran in ne bo motil dela nekaterih drugih genov. Tehnologija CRISPR se konstantno razvija in zaradi tega jo moramo čim več uporabljati tudi pri modifikaciji rastlin, saj lahko prinese ogromen napredek na področju fitoremediacije.

4 Z ENIM POSKUSOM DO STERILNIH TOPOLOV Z IZBOLJŠANIMI FITOREMEDIACIJSKIMI SPOSOBNOSTMI

CRISPR metoda se zaradi svoje enostavnosti in natančnosti pogosto uporablja za inaktivacijo genov, na področju vstavljanja genov pa se še vedno razvija. Naslednji korak je kombinacija obeh. Ideja je pojasnjena spodaj s hipotetičnim poskusom za boljše razumevanje. Hipotetični poskus je opisan na osnovi poskusa za odstranjevanje gena *LFY* s pomočjo Cas9 (Elorriaga in sod., 2018) in na osnovi vnašanja citokroma P450 (Doty in sod., 2007) s pomočjo metode CRISPR (Invitrogen, 2019; Zhang in sod., 2019).

V izbranem organizmu (v našem primeru je to topol) izberemo gen, ki ga želimo odstraniti. V našem primeru za pridobitev sterilnih topolov odstranimo gen *LFY*. Kodirajoče zaporedje gena pomnožimo s PCR ter izberemo ustrezno 20 bp dolgo zaporedje za sgRNA. Elorriaga in

sodelavci so leta 2018 za inaktivacijo gena ciljali na začetek gena, kjer so naredili dvakratno prekinitev, prvo pred prvim eksonom in drugo znotraj prvega eksona. Če je prekinitev narejena v prvem eksonu, je verjetnost za uspešno funkcioniranje proteina iz tega gena zelo majhna.

V kombiniranem načinu je primer pokazan z eno prekinitvijo na genu *LEAFY* (Slika 2.).



Slika 2: Prekinitev verige DNA v prvem eksonu gena *LEAFY* s Cas9.

Zaporedje gena *LEAFY* smo pridobili preko podatkovne baze GenBank in s pomočjo spletnega orodja CRISPOR (Haeussler, 2016) poiskali optimalne lokacije za prekinitev ciljnega gena. Med navedenimi zaporedji je bilo tudi zaporedje sgRNA, katerega so leta 2018 uporabili Elorriaga in sodelavci. Kljub temu, da je bilo v spletnem orodju za to zaporedje navedenih 7 zunanjih tarč, se v njihovem eksperimentu ni pojavila niti ena izmed njih. To zaporedje lahko uporabimo, ker je že bilo testirano in pri tem imelo 79-odstotno uspešnost.

GCCCCGCCTCAGCAGC | CAC CGG

- CGG – ležeče predstavljen del je zaporedje PAM.
- | - mesto rezanja

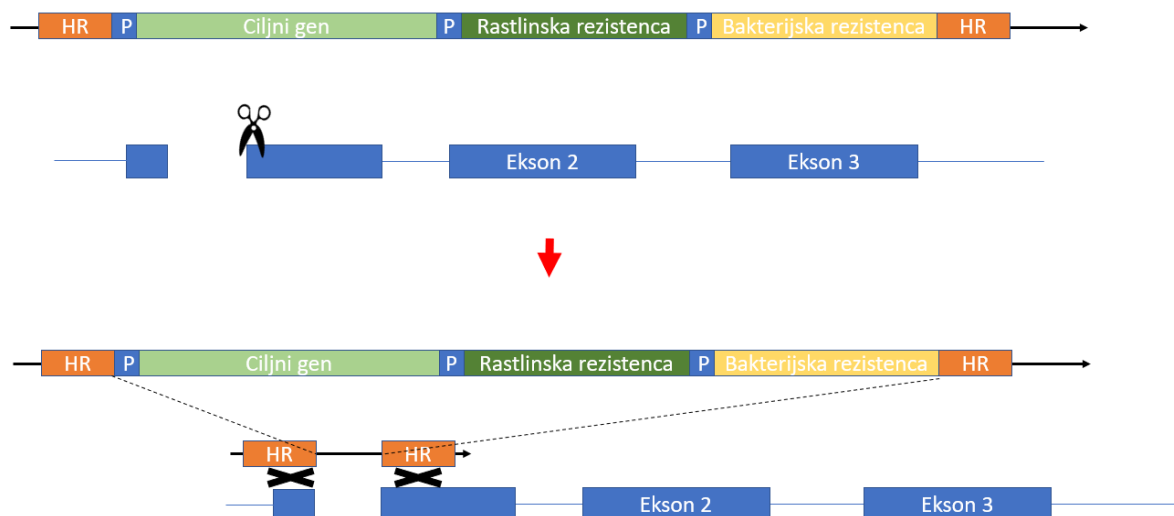
4.1 VSTAVLJANJE GENA S HOMOLOGNO REKOMBINACIJO

Ker vemo, kje se bo prekinitev zgodila, na osnovi tega zaporedja izdelamo homologne ročice, vsako dolgo po 800 bp. Če izvajamo transformacijo rastlin z *A. tumefaciens*, moramo dodati tudi gen za rezistenco pri bakterijah (Slika 3.). Za topole lahko vnesemo kanamicinsko rezistenco, za selekcijo z *A. tumefaciens* lahko dodamo gen *GUS*, glifosfatno toleranco ali drug antibiotik (Kyung-Hwan in sod., 2000)



Slika 3: Ciljni gen s potrebno rezistenco za uspešno transformacijo; vsak promotor ima svoj ustrezen promotor. Začetna oligonucleotida (modri puščici) vsebujeta homologni ročici (oranžno) na začetku in na koncu zaporedja.

S pomočjo sestavljanja DNA po Gibsonu (*Gibson Assembly*) ustvarimo donorski vektor in Cas9 vektor. Ustvarjene vektorje s pomočjo *A. tumefaciens* nato vstavimo v rastlinske celice, vendar moramo poskrbeti, da so rastlinske celice v fazi S, kjer ima homologna rekombinacija prednost pred NHEJ. S tem bomo povečali uspešnost vstavljanja.

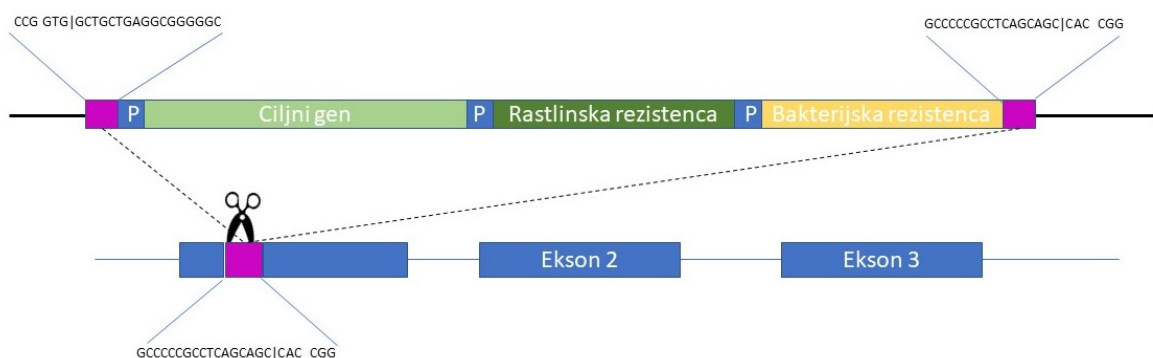


Slika 4: Prekinitev verige DNA v prvem eksonu neželenega gena in vstavljanje želenega gena s pomočjo homologne ročice.

Pri postopku vstavljanja gena s pomočjo CRISPR-Cas9 moramo določiti lokacijo, kjer bomo vstavili naši ciljni gen. Vendar na ta način – s kombiniranjem, t.j. z inaktivacijo enega in z vstavljanjem drugega gena – vzpostavimo sistem, v katerem nov gen zavzema prostor inaktiviranega gena in s tem, ker zavzame mesto že obstoječega gena, bolje varujemo ciljni gen pred epigenetsko modifikacijo.

4.2 VSTAVLJANJE GENA Z NHEJ

Pri vstavljanjem z NHEJ ne potrebujemo homologne ročice, temveč namesto njih 20 bp dolga zaporedja, ki so enaka zaporedju, kjer bo Cas9 naredil prekinitev. To pomeni, da dodamo v tem primeru GCCCCCGCCTCAGCAGC|CAC CGG zaporedji levo in desno od DNA sekvence, ki jo želimo vstaviti v rastlinski genom (Slika 5.).



Slika 5: Vstavljanje gena z NHEJ, vijolično označen del je mesto prereza za Cas9

Zhang in sodelavci so v 2019 dokazali, da je takšen način vstavljanja genov z NHEJ bolj učinkovit zaradi njegove pogostnosti v organizmih. Zaradi njegove učinkovitosti se trenutno izvajajo številne raziskave za dodatno izboljšanje metode. Nekatere izmed njih se izvajajo tudi na rastlinah, kot je na primer raziskava za obogatitev riža s karotenoidi s pomočjo tehnologije CRISPR in z NHEJ insercijo gena, ki je bila podrobneje opisana v točki 3.

5 ZAKLJUČEK

Veliko število topolov je bilo s klasično genetsko modifikacijo že spremenjenih, vendar je za nove ideje in načine, s katerimi bi topoli lahko učinkoviteje remediirali svojo okolico, še veliko prostora. Nekatere genetske spremembe iz zgoraj navedenih, kot so citokrom P450, kadmij faktor 1 in remediacija herbicidov z glutamilcistein sintetazo, so že bile implementirane in testirane na topolih, vendar pa obstaja veliko genov z velikim fitoremediacijskim potencialom, ki še niso bili uporabljenih pri topolih, kot so *nfsI* za fitoremediacijo eksplozivov ali selenocistein metiltransferaza za fitoremediacijo selena.

Vsi navedeni geni bi lahko bili vneseni tudi s pomočjo CRISPR tehnologije. CRISPR je zelo dobra in že dokazana metoda za inaktivacijo genov, ki je že bila uporabljena pri pridobivanju sterilnih in bolj robustnih topolov. Vendar so za izboljšanje njegove uspešnosti pri vstavljanju genov v rastline potrebne še dodatne raziskave.

Kljub temu, da je to diplomsko delo zgolj teoretično, upam, da je vsaj korak v smeri proti čistejšemu okolju in da prispeva k ozaveščanju ljudi o metodah, s katerimi lahko okolju pri tem pomagamo. To je začetek projekta za zelene pasove okoli industrijskih con z genetsko spremenjenimi topoli, ki so sterilni in sposobni remediacije specifičnega onesnaževalca.

6 VIRI

- Ashby J., Kier L., Wilson A., Green T., Lefevre P., Tinwell H., Clapp M. 1996. Evaluation of the potential carcinogenicity and genetic toxicity to humans of the herbicide acetochlor. *Human & Experimental Toxicology*, 15, 9: 702–735
- Baldantoni D., Cicutelli A., Bellino A., Castiglione S. 2014. Different behaviours in phytoremediation capacity of two heavy metal tolerant poplar clones in relation to iron and other trace elements. *Journal of Environmental Management*, 146: 94–99
- Basharat Z., Yasmin A. 2018. Genome editing weds CRISPR: What is in it for phytoremediation?. *Plants*, 7, 3, 51 doi:10.3390/plants7030051: 8 str.
- Bowman J. L., Smyth D. R., Meyerowitz E. M. 1989. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1: 37–52
- Bryant C., Hubbard L., McElroy W. D. 1991. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the Nitroreductase Gene from *Enterobacter cloacae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 7: 4126-4130

- Ding Y., Li H., Chen L. L., Xie K. 2016. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 7, 703, doi:10.3389/fpls.2016.00703: 12 str.
- Dong O. X., Yu S., Jain R., Zhang N., Duong P. Q., Butler C., Li Y., Lipzen A., Martin J. A., Barry K. W., Schmutz J., Tian L., Ronald P. C. 2020. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. *Nature Communications*, 11, 1178, doi:10.1038/s41467-020-14981-y: 10 str.
- Doty S. L., James C. A., Moore A. L., Vajzovic A., Singleton G. L., Ma, Zareen Khan C., Xin G., Won Kang J., Young Park J., Meilan R., Strauss S.H., Wilkerson J., Farin F., Strand S. E. 2007. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees. *PNAS*, 104, 43: 16816-16821
- Doty S. L. 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist*, 179: 318-333
- Eionet. 2020. European Environment Agency, Soil contamination widespread in Europe. <https://www.eea.europa.eu/highlights/soil-contamination-widespread-in-europe> (5. mar. 2020)
- Elorriaga E., Klocko A. L., Ma C., Strauss S. H. 2018. Variation in mutation spectra among CRISPR/Cas9 mutagenized poplars. *Frontiers in Plant Science*, doi:10.3389/fpls.2018.00594: 12 str.
- Fan D., Liu T., Li C., Jiao B., Li S., Hou Y., Luo K. 2015. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in *Populus* in the First Generation. *Scientific Reports*, 5, 12217, doi:10.1038/srep12217: 7 str.
- Gherbi H., Gallego M. E. 2001. Homologous recombination in planta is stimulated in the absence of Rad50. *EMBO Reports*, 2: 287-291
- Gullner G., Kömives T., Rennenberg H. 2001. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *Journal of Experimental Botany*, 52, 358: 971-979
- Gurusamy U., Shewade D. G. 2014. Pharmacogenomics in India. 46: Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Padmanabhan S., Academic Press: 1037-1059
- Haeussler M., Schönig K., Eckert H. Eschstruth A., Mianné J., Renaud J. B., Schneider-Maunoury S., Shkumatava A., Teboul L., Kent J., Joly J. S., Concordet J. P. 2016. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, 17, 148, doi:10.1186/s13059-016-1012-2: 12 str.
- Hannink N. K., Rosser S. J., Bruce N. C. 2002. Phytoremediation of Explosives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 5: 511-538
- Hooker B., Skeen R. 1999. Transgenic phytoremediation blasts onto the scene. *Nature Biotechnology*, 17, 428, doi:10.1038/8596: 1 str.
- Horvath P., Barrangou R. 2010. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*, 327, 167, doi:10.1126/science.1179555: 6 str.

- Jenkins T. F., Leggett D. C., Grant C. L., Bauer C. F. 1986. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of nitroorganics in munitions wastewater. *Analytical Chemistry*, 58, 1: 170-175
- Kang J. W. 2014. Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation. *Biotechnology Letters*, 36: 1129–1139
- Klocko A., Brunner A., Huang J., Meilan R., Lu R., Ma C., Morel A., Zhao D. 2016. Containment of transgenic trees by suppression of LEAFY. *Nature Biotechnology*, 34: 918–922
- Koch B., Nijmeijer B., Kueblbeck M., Cai Y., Walther N., Ellenberg J. 2018. Generation and validation of homozygous fluorescent knock-in cells using CRISPR–Cas9 genome editing. *Nature Protocols*, 13: 1465–1487
- Kyung-Hwan H., Meilan R., Ma Cathleen Strauss S. 2000. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Reports*, 19: 315–320
- LeDuc D. L., Samie M. A., Montes-Bayon M., Wu C. P., Reisinger S. J., Terry N. 2006. Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium phytoremediation traits in Indian mustard. *Environmental Pollution*, 144, 1: 70-76
- Li Z., Liu Z., Xing A., Moon B. P., Koellhoffer J. P., Huang L., Ward R. T., Clifton E., Falco S. C., Cigan A. M. 2015. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiology*, 169, 960–970
- Lu H., Klocko A. L., Dow M., Ma C., Amarasinghe V., Strauss S. H. 2016. Low frequency of zinc-finger nuclease-induced mutagenesis in *Populus*. *Molecular Breeding*, 36, 121, doi:10.1007/s11032-016-0546-z: 13 str.
- MacFarquhar J. K., Broussard D. L., Melstrom P., Hutchinson R., Wolkin A., Martin C., Burk R. F., Dunn J. R., Green A. L., Hammond R., Schaffner W. 2010. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Archives of Internal Medicine*, 170, 3: 256–261
- Meers E., Van Slycken S., Adriaensen K., Ruttens A., Vangronsveld J., Du Laing G., Witters N., Thewys T., Tack F. M. G. 2010. The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for ‘phytoattenuation’ of heavy metals on moderately contaminated soils: A field experiment. *Chemosphere*, 78, 1: 35-41
- Meskar A., Plee-Gautier E., Amet Y., Berthou F., Lucas D. 2001. Alcohol-xenobiotic interactions. Role of cytochrome P450 2E1. *Pathologie Biologie*, 49, 9: 696-702
- Meyer M. T., Scribner E. A. 2009. Chapter 13 - The evolution of analytical technology and its impact on water-quality studies for selected herbicides and their degradation products in water. *Handbook of Water Purity and Quality*: 289-313
- NCBI. 2005. PubChem Database: Methylselenocysteine, CID=147004. National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylselenocysteine> (17. mar. 2020)
- Panagos P., Van Liedekerke M., Yigini Y., Montanarella L. 2013. Contaminated sites in Europe: review of the current situation based on data collected through a European

- network. *Journal of Environmental and Public Health*, 158764, doi:10.1155/2013/158764: 11 str.
- Peuke A. D., Rennenberg H. 2005. Phytoremediation. *EMBO reports*, 6, 6, 497–501.
- Ran F. A., Hsu P. D., Lin C., Gootenberg J. S., Konermann S., Trevino A. E., Scott D. A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. 2013. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, 155, 2: 479-480
- Ray A., Langer M. 2002. Homologous recombination: ends as the means. *Trends in Plant Science*, 7, 10: 435-440
- Roberts T. L. 2014. Cadmium and Phosphorous Fertilizers: The Issues and the Science. *Procedia Engineering*, 83: 52-59
- Sarwar N., Imran M., Shaheen M. R., Ishaque W., Kamran M. A., Matloob A., Rehim A., Hussain S. 2017. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171: 710-721
- Seco R., Peñuelas J., Filella I. 2007. Short-chain oxygenated VOCs: Emission and uptake by plants and atmospheric sources, sinks, and concentrations. *Atmospheric Environment*, 41, 12: 2477-2499
- Seok S. J., Choi S. C., Gil H. W., Yang J., Lee E., Song H., Hong S. 2012. Acute oral poisoning due to chloracetanilide herbicides. *Journal of Korean Medical Science*, 27, 2: 111–114
- Shim D., Kim S., Choi Y., Song W., Park J., SooYouk E., Jeong S., Martinoia E., Noh E., Lee Y. 2013. Transgenic poplar trees expressing yeast cadmium factor 1 exhibit the characteristics necessary for the phytoremediation of mine tailing soil. *Chemosphere*, 90, 4: 1478-1486
- User Guide True Tag DNA Donor Kit. 2019. Invitrogen, Thermo Fisher, Scientific: 58 str.
- Yang L., Zhao X., Ran L., Li C., Fan D., Luo K. 2017. PtoMYB156 is involved in negative regulation of phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biosynthesis during wood formation in poplar. *Scientific Reports*, 7, 41209, doi:10.1038/srep41209: 14 str.
- Zakon o soobstoju gensko spremenjenih rastlin z ostalimi kmetijskimi rastlinami. 2009. Ur. RS, št. 41/09 in 69/15 – ZOPPGSR
- Zhang J., Cheng X., Zhao M., Li G., Xu J., Zhang F., Yin M., Meng F., Dai X., Fu Y., Yang Z., C., Su R. J., Wen W., Wang W., Chen W., Choi H., Wang C., Gao G., Zhang L., Cheng T., Zhang X. 2019. Curing hemophilia A by NHEJ-mediated ectopic F8 insertion in the mouse. *Genome Biology*, 20, 276, doi:10.1186/s13059-019-1907-9: 17 str.