

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA  
PRIMERJAVA IZBRANIH ORODIJ ZA RAZVOJ  
CRISPR-Cas9 VODILNE RNA MOLEKULE ZA  
TARČNO MUTAGENAZO RASTLIN

ATANAS SHAJKAROV

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Primerjava izbranih orodij za razvoj CRISPR-Cas9 vodilne  
RNA molekule za tarčno mutagenozo rastlin**

(Comparison of selected tools for the development of CRISPR-Cas9 guide  
RNA molecule for targeted mutagenesis in plants)

Ime in priimek: Atanas Shajkarov  
Študijski program: Bioinformatika  
Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Koper, julij 2020

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Atanas SHAJKAROV

Naslov zaključne naloge: Primerjava izbranih orodij za razvoj CRISPR-Cas9 vodilne RNA molekule za tarčno mutagenozo rastlin

Kraj: Koper

Leto: 2020

Število listov: 28

Število slik: 10

Število tabel: 5

Število referenc: 81

Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Ključne besede: CRISPR, CRISPR-Cas9, gRNA, PAM motiv, urejanje genoma

Izvleček:

Za razvoj CRISPR-Cas9 vodilne RNA molekule so na voljo številna orodja. V okviru naloge smo naredili izbor orodij, ki se uporabljajo pri razvoju vodilnih RNA za tarčno mutagenozo rastlin ter izbrana orodja tudi testirali in jih med seboj primerjali. Opravljen je bil praktični preizkus delovanja orodij, pregled algoritmov, na osnovi katerih izbrana orodja določijo vodilne RNA molekule, kakšne podatke poleg zaporedja vodilnih RNA orodja še generirajo (kot na primer možnosti nespecifičnega prileganja vodilne RNA) ter pregled drugih značilnosti orodij (kot na primer možnost izbora različnih endonukleaz, različnih PAM motivov, rastlinskih vrst itd.).

## Key document information

Name and SURNAME: Atanas SHAJKAROV

Title of the final project paper: Comparison of selected tools for the development of CRISPR-Cas9 guide RNA molecule for targeted mutagenesis in plants

Place: Koper

Year: 2020

Number of pages: 28

Number of figures: 10

Number of tables: 5

Number of references: 81

Mentor: Assist. Prof. Matjaž Hladnik, PhD

Keywords: CRISPR, CRISPR-Cas9, gRNA, PAM motif, genome editing

Abstract:

Several tools are available for the development of CRISPR-Cas9 guide RNA molecules for targeted mutagenesis in plants. Within the framework of the final project paper we made a selection of tools, which were used for testing and comparison between them.. A practical test of the tools was performed, an overview of the algorithms by which the selected tools determine the leading RNA molecules, what data, in addition to the sequence of the guide RNA tools, they generate (such as the non-specific alignment of the guide RNA) and an overview of other tool features (such as the possibility to use different endonucleases, different PAM motifs, plant species, etc.).

## **ZAHVALA**

Najprej bi se zahvalil mentorju dr. Matjažu Hladniku za vse popravke, pojasnila ter za hitro odzivnost.

Zahvaljujem se moji družini za spodbudo in neizmerno podporo v teku mojega študija.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali in stali ob strani tekom študija, tudi če jih nisem poimensko omenil v tej zahvali.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Genski inženiring.....	1
1.2	Tehnike za pridobivanje novih sort .....	1
1.3	Primeri razvoja novih sort kmetijski rastlin z uporabo »konvencionalnih« tehnik genskega inženiringa .....	1
1.4	Stanje pridelave GSR v svetovnem merilu .....	2
1.5	Razvoj sort odpornih na herbicide in škodljivce .....	2
1.6	Razvoj sorte z izboljšano hranilno vrednostjo .....	5
2	RASTLINE, RAZVITE Z METODAMI ZA UREJANJE GENOMOV .....	5
2.1	Primeri uporabe CRISPR/Cas9 na rastlinah .....	5
2.2	Pridelava semena gensko spremenjene soje, po poteku patentne zaščite (angl. generic GMOs) .....	6
2.3	Princip delovanja metod za urejanje genomov .....	6
2.3.1	CRISPR tehnologija za urejanje genoma .....	6
2.3.2	Zgodovina razvoja CRISPR metode .....	7
2.3.3	Popravljalni mehanizmi prelomov DNA.....	8
2.3.4	Princip delovanja CRISPR/Cas9 .....	9
2.3.5	Načini vnosa Cas9/gRNA v rastlinske celice .....	10
2.3.6	Načini preprečevanja nespecifičnih mest pri CRISPR-Cas9.....	11
3	METODE DELA .....	12
3.1	Izbor orodij .....	12
3.2	Pregled orodij.....	12
3.2.1	CRISPR RGEN Tools – Cas-Designer in Cas-OFFinder.....	12
3.2.2	CRISPR-P 2.0.....	13
3.2.3	CRISPOR .....	14
3.3	Testiranje orodij .....	14
4	REZULTATI IN DISKUSIJA.....	16
4.1	Rezultati testiranje orodja Cas-Designer .....	16
4.2	Rezultati testiranja orodja CRISPR-P 2.0.....	17
4.3	Rezultati testiranja orodja CRISPOR .....	18
4.4	Primerjava rezultatov orodij .....	20
5	ZAKLJUČEK.....	21
6	LITERATURA IN VIRI.....	22

## **KAZALO PREGLEDNIC**

Tabela 1: Pregled orodij za razvoj vodilne RNA na osnovi pregleda literature.....	12
Tabela 2: Izbrane gRNA zaporedja iz študija [81] .....	14
Tabela 3: Izbrana gRNA zaporedja po testiranju orodja Cas-Designer .....	16
Tabela 4: Izbrana gRNA zaporedja po testiranju orodja CRISPR-P 2.0.....	17
Tabela 5: Izbrana gRNA zaporedja po testiranju orodja CRISPOR .....	18

## KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Prikaz porabe insekticidov v ZDA po uvedbi Bt koruze [13].....	2
Slika 2: Poravnava regije s palindromnimi zaporedij CRISPR lokusa iz različnih vrst bakterij. Potemnjeni deli predstavljajo ohranjena zaporedja. S puščicami so označene palindromne ponovitve [59] .....	7
Slika 3: Nukleazno inducirano urejanje genoma [47] .....	9
Slika 4: Vrste CRISPR-Cas sistemi [2] .....	9
Slika 5: Sistem CRISPR-Cas9 tipa II [5] .....	10
Slika 6: Primer sestave konstrukta za vnos CRISPR/Cas9 v rastlinsko celico [8] .....	11
Slika 7: Shema CRISPR / Cas9 nespecifičnih mest [78] .....	13
Slika 8: Rezultati pri testiranju MLO-7 gena v orodja Cas-Designer .....	16
Slika 9: Rezultati pri testiranju MLO-7 gena v orodja CRISPR-P 2.0.....	17
Slika 10: Rezultati pri testiranju MLO-7 gena v orodja CRISPOR .....	19



## SEZNAM KRATIC

**CRISPR** - gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev (angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

**Cas9** – s CRISPR lokusom povezana endonukleaza

**RNA** - ribonukleinska kislina

**bp** – bazni par

**PAM** – PAM motiv (angl. protospacer adjacent motif)

**DNA** - deoksiribonukleinska kislina

**GSR** gensko spremenjene rastline

**Bt** - *Bacillus thuringiensis*

**ZDA** - Združene države Amerike

**ZFN** – nukleaza z motivi cinkovih prstov (angl. zinc-finger nucleases)

**TALEN** – nukleaza z DNA vezavno domeno TAL efektorja (angl. transcription activator-like effector nucleases)

**DSB** – dvoverižni prelom DNA (angl. double strand break)

**NHEJ** - nehomologono združevanje koncev

**HDR** - popravljalni mehanizem združevanja koncev DNA s pomočjo homolognega zaporedja (angl. homology directed repair)

## 1 UVOD

### 1.1 Genski inženiring

Spreminjanje genetskega materiala s pomočjo biotehnoloških metod imenujemo tudi genski inženiring. Namen ustvarjanja genetskih sprememb, je lahko proučevanje funkcije genov, razvoj genskih terapij za zdravljenje dednih bolezni ali razvoj rastlin z želenimi lastnostmi [1].

Z genskim inženiringom, ki je nepogrešljiv del sodobne biotehnologije je bilo do danes pridobljenih že vrsto rekombinantnih beljakovin (t. i. biološka zdravila), kot so inzulin, človeški rastni hormon ali somatotropin, folitropin (za zdravljenje neplodnosti), človeški albumin, monoklonska protitelesa, antihemofilni faktorji, cepiva [2] ki jih medicina uporablja za zdravljenje številnih bolezni ter drugi encimi kot so restrikcijske endonukleaze, DNA ligaze, DNA polimeraza, itd. [3] ki se uporabljajo v biotehnoloških laboratorijih, kemični, predelovalni in živilski industriji, veliki pa so tudi obeti na področju tako imenovanega genskega zdravljenja [4].

V nadaljevanju smo se osredotočili na področje genskega inženiringa rastlin.

### 1.2 Tehnike za pridobivanje novih sort

Eden izmed možnih načinov za razvoj novih sort je uporaba klasičnega žlahtenja. Vendar se je pri klasičnem žlahtnjenju potrebno zavedati, da uspeh žlahtnjenja omejen na razpoložljivo gensko variabilnost, postopek z uporabo klasičnih metod žlahtnjenja pa dolgotrajen [5].

Med tehnike klasičnega žlahtnjenja sodi tudi mutacijsko žlahtnjenje, pri katerem se uporabljajo mutageni, kot so rentgenski žarki, UV žarki, etil metansulfonat itd. Pri uporabi omenjenih mutagenov ne moremo vplivati na mesto induciranja mutacij. S takšnim mutacijskim žlahtnjenjem se lahko spremeni več tisoče genov. Medtem ko se lahko z metodami za urejanje genov oz. genomov (angl. gene editing, genome editing), kot je na primer metoda CRISPR-Cas9, inducira mutacijo na tarčnem mestu. Žlahtnjenje z uporabo tehnik za urejanje genomov je torej hitreje od klasičnega žlahtenja [6].

Z metodami za urejanje genomov je mogoče vzgojiti rastlino, ki se od izvorne razlikuje samo v na novo inducirani mutaciji in ne vsebuje vstavljenih tujih genov, kot je to značilno pri uporabi t.i. konvencionalnih tehnik genskega inženiringa [7].

### 1.3 Primeri razvoja novih sort kmetijski rastlin z uporabo »konvencionalnih« tehnik genskega inženiringa

Pred predstavitvijo možnosti razvoja sort z uporabo metod za urejanje genomov, v nadaljevanju navajamo primere in načine razvoja rastlin z novimi lastnostmi z uporabo konvencionalnih tehnik genskega inženiringa. Od prihoda prve gensko spremenjene rastline (GSR), paradižnika FlavrSavr, na trg mineva že 25 let [8]. Poleg omenjene sorte paradižnika so bile razvite tudi številne sorte drugih rastlinskih vrst in najbolj razširjene v pridelavi predstavljamo v nadaljevanju. Glede na lastnosti sort, ki so bile razvite s pomočjo genskega inženiringa, lahko GSR razdelimo v tri generacije. Prva generacija transgenih poljščin vključevala zlasti gene za odpornost na viruse, škodljivce in herbicide. Drugo generacijo

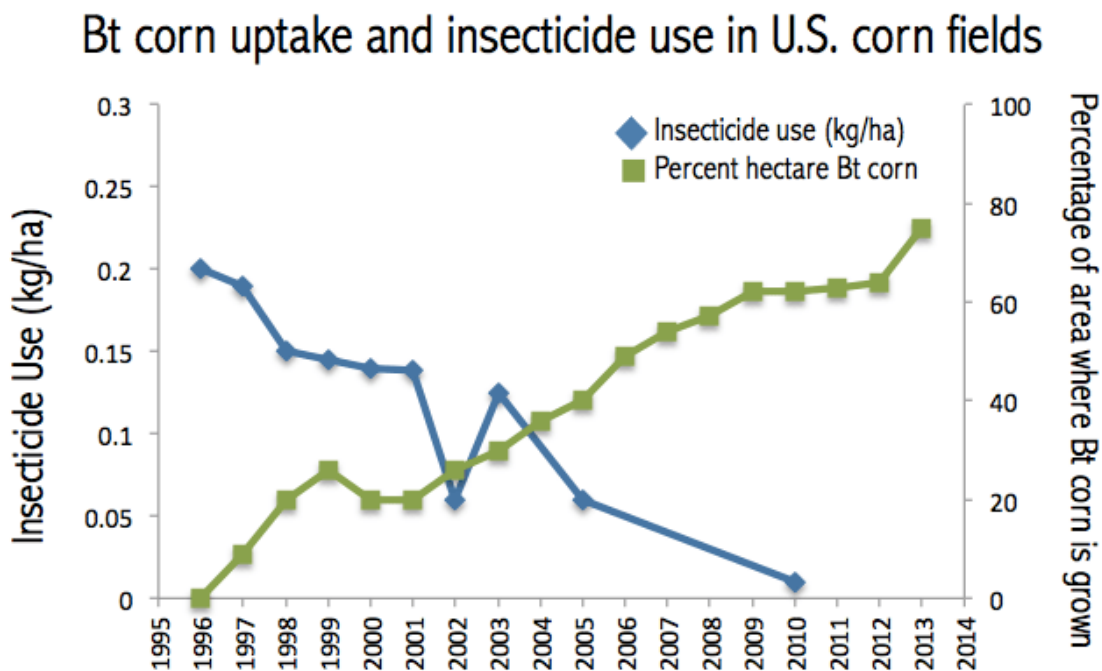
predstavljajo GSR, pri katerih je bila izboljšana hranilna vrednost, čas obstojnosti in okus. V tretjo generacijo sodijo GSR za sintezo industrijskih izdelkov, kot so biosenzorji, industrijski encimi, epoksi, plastika, kozmetični izdelki ter za farmacevtsko industrijo zdravila, kot so cepiva, protitelesa in terapevtski proteini [9].

## 1.4 Stanje pridelave GSR v svetovnem merilu

GSR pridelujejo na približno 12 % (179, 7 milijona od 1, 5 milijarde hektarjev) vseh svetovnih kmetijskih površin. Med GSR, ki zasedajo največji delež po pridelavi sodijo: soja, koruza, bombaž, krompir in oljna ogrščica [10].

## 1.5 Razvoj sort odpornih na herbicide in škodljivce

Najbolj razširjeni lastnosti GSR sta odpornost na herbicide in odpornost na škodljivce. Odpornost na škodljivce je pripomogla k zmanjšanju porabe insekticidov, medtem ko je odpornost na herbicide omogočila uporabo glifosata namesto drugih, bolj toksičnih herbicidov [12]. Primer porabe insekticidov v ZDA po uvedbi Bt korusa je prikazan na spodnjem grafu (slika 1). Zaradi manjše porabe sredstev za varstvo rastlin in manjšega števila tretiranj imajo pridelovalci manjše stroške pri pridelavi, obenem pa je taka pridelava manj obremenjujoča za okolje. Ugotovljeno je bilo, da je uvedba GSR pripomogla tudi k povečanju količine pridelka [12].



Adapted from Malakof D. and Stokstad E. Pesticide Planet. Science Magazine. 16 August 2013.

**Slika 1:** Prikaz porabe insekticidov v ZDA po uvedbi Bt korusa [13]

O zmanjšani porabi insekticidov priča tudi primerjava podatkov o porabi insekticidov od leta 1976 do 1996 (pred pridelavo Bt koruze) ter podatkov po začetku pridelave Bt koruze, in sicer od leta 1996 do 2016, ki kaže da se je količina insekticida na površinah v New Jerseyju zmanjšala za 85 odstotkov. K zmanjšanju insekticidov je prispeval tudi razvoj novih, bolj učinkovitih pesticidov, ki se uporabljajo manj pogosto [14].

Z genskim inženiringom je mogoče spremeniti tudi hranilno vrednost (npr. zlati riž). Zlati riž je GSR, pri katerem je povečana vsebnost  $\beta$ -karotena oziroma provitamina A. Pri zlatem rižu prve generacije, so vstavili tri gene, in sicer gen za fitoen sintazo, fitoen desaturazo in likopen ciklazo, s čimer so omogočili sintezo  $\beta$ -karotena. Pri zlatem rižu druge generacije so namesto gena za fitoen sintazo iz bakterije (*Erwina spp.*), vstavili gen iz koruze in s pomočjo tega dosegli kar 20-krat višji nivo karotenoidov [15].

Soja je rastlina, ki vsebuje zelo visok odstotek beljakovin [16]. Prvo gensko spremenjeno sojo, odporno na herbicid glifosat (Roundup Ready Soybean), znano tudi kot GTS 40-3-2 (OECD UI: MON-04032-6), je na trg uvedlo podjetje Monsanto v ZDA, in sicer leta 1998 [17]. Podjetje Monsanto je leta 2018 prevzelo podjetje Bayer [18]. Leta 2014 je bilo po svetu posajenih 90,7 milijonov hektarjev gensko spremenjene soje, kar je 82 % vseh svetovnih površin, namenjenih pridelavi soje [19] [20].

Odpornost na glifosat omogoča vstavljen gen, ki kodira na glifosat odporen encim 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaza (EPSPS). Glifosat ovira sintezo aminokislin fenilalanina, tirozina in triptofana. Te aminokislino uvrščamo med esencialne, ker jih lahko sintetizirajo le rastline in mikroorganizmi, medtem ko jih živali pridobijo z uživanjem rastlin [21]. Pri sintezi omenjenih aminokislin sodeluje encim, imenovan 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaza (EPSPS). Soja Roundup Ready izraža različico EPSPS iz seva CP4 bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, ekspresijo omenjenega gena pa v soji uravnava konstitutivni promotor 35S (E35S) iz mozaičnega virusa cvetače (CaMV). Zaporedju EPSPS gena je pri vstavljenem konstrukt dodano še zaporedje kloroplastnega tranzitnega peptida (CTP4) iz petunije. Tranzitni protein je potreben zato, da se EPSPS transportira v kloroplaste, kjer sodeluje pri šikimati poti. Transkripcija gena EPSPS se ustavi pri nopalinsintazi (nos 3') terminator zaporedju iz *Agrobacterium tumefaciens*. Plazmid z zapisom za EPSPS in drugimi zgoraj omenjenimi genetskimi elementi so vstavili v embrio soje z gensko pištolo. Patent prve generacije gensko spremenjene soje Roundup Ready je potekel marca 2015 [22] [27].

Koruza odporna na herbicid glifosat (Roundup Ready Corn), ki je bila razvita v podjetju Monsanto, je bila prvič sproščena na trg leta 1996 [24]. Bayer CropScience je razvil sorto koruze, odporno na glufosinat (LibertyLink Corn). LibertyLink je blagovna znamka, ki je sedaj v lasti podjetja BASF. Pod blagovno znamko sodijo na herbicid glufosinat (Liberty herbicid z aktivno snovjo glufosinat) in na glufosinat odporne sorte rastlin [21]. LibertyLink zagotavlja sistem za odpornost na herbicide, ki je še vedno učinkovit tudi pri plevelih, odpornih na glifosat. Gen, ki daje odpornost na glufosinat, je *bar* (izoliran iz *S. Viridochromogenes*) ali *pat* gen (izoliran iz *S. hygrosopicus*) [25].

Sorte, odporne na herbicid, je mogoče razviti tudi z drugimi tehnikami zlahtnjenja. Pioneer (sedaj Corteva Agriscience) je razvil in tržil hibridne sorte koruze s toleranco na imidazolinske herbicide pod blagovno znamko "Clearfield" - pri teh hibridih je odpornost na herbicid vzgojena s selekcijo tkivnih kultur in uporabo kemijskega mutagena etil

metansulfonata. Zakonodaja, ki ureja odobritev transgenih rastlin, ne velja za Clearfield koruzo [26].

Bt poljščine in vrtnine so bile razvite tako, da je bil vstavljen en ali več genov iz bakterije *Bacillus thuringiensis*, in sicer za Bt proteine (tudi kristalni proteini, cry proteini ali delta endotoksini) [27]. Beljakovine z insekticidnim delovanjem so toksične za določene vrste žuželk, na primer za koruzno veščo (*Ostrinia nubilalis*). Le-ta v stadiju ličinke vrta koruzna stebela in storže, zaradi tega se koruza poleže, na poškodovane dele pa se naselijo drugi patogeni mikroorganizmi [28].

Identificirani so bili na primer tudi Bt proteini, ki so toksični za koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera*), ki ravno tako kot koruzna vešča, povzroča veliko gospodarsko škodo [29] [30]. Bt protein se izraža v celotni rastlini. Ličinka se hrani z različnimi deli rastline, ki vsebujejo Bt toksin, le-ti v alkalnem oziroma bazičnem prebavnem traktu žuželke razpadejo in zaradi oligomerizacije tvorijo pore v prebavnem sistemu. Poškodbe membran epitelijskih celic povzroči lizo celic in okužbo z mikroorganizmi (sepsa) [31]. Žuželka se po nekaj urah preneha hraniti in pogine [31]. Prva sorta koruze z vstavljenim genom za Bt protein je bila odobrena leta 1996 [32].

Identificiranih je bilo več Bt genov: Cry1A.105 (MON89034), CryIAb (MON810), CryIF (1507), Cry2Ab (MON89034), Cry3Bb1 (MON863 in MON88017), Cry34Ab1 (59122), Cry35Ab1 (59122), mCry3A (MIR604), in Vip3A (MIR162) [33] [34]. Različni cry proteini imajo specifično toksično delovanje proti vrstam žuželk iz vrst *Lepidoptera* (moli in metulji), *Diptera* (muhe in komarji), *Coleoptera* (hrošči), *Hymenoptera* (osi, čebele, mravlje in rastlinske ose) in proti *Nematodes* (gliste) [35].

Študija iz leta 2018 je pokazala, da je Bt koruza zmanjšala populacijo koruzne vešče tudi na bližnjih poljih, posejanih s koruso brez vstavljenega Bt gena, kar je še dodatno zmanjšalo uporabo pesticidov na teh pridelkih. Geni za Bt proteine so bili vstavljeni v sorte bombaža, koruz, soja, krompirja, jajčevca, paradižnika.

Prav tako je bil vstavljen gen za Bt protein tudi pri bombažu. Bt bombaž je bil prvič odobren za tržno pridelavo v ZDA leta 1995, [36] medtem ko je Kitajska prvič zasadila Bt bombaž leta 1997 [37]. Leta 2002 je Mahyco (po združitvi s podjetjem Monsanto) uvedlo Bt bombaž v Indijo. Kitajska je zasadila Bt bombaž zaradi južne plodovrtke (*Helicoverpa armigera*), proti kateri so kmetje uporabljali konvencionalne pesticide [38]. Tudi v Indiji in ZDA je bila pri Bt bombažu ugotovljena manjša škoda zaradi škodljivcev, zaradi česar se je povečala količina pridelka in zaslužek pridelovalcev [39] [40] [41]. Študije so pokazale, da je manjša poraba pesticidov na poljih bombaža ter zaradi tarčnega delovanja Bt proteinov, pripomogla k povečanju biotske raznovrstnosti neciljnih organizmov, kot so polonice, pravi mrežekrilci in pajki [42]. Zaradi povečane biotske raznolikosti je bilo prisotnih tudi več naravnih sovražnikov, zaradi česar so metode integriranega varstva rastlin bolj učinkovite [38]. V letu 2011 je imela Indija 10, 6 milijonov hektarjev gensko spremenjenega bombaža in bila tako največja pridelovalka. Drugo mesto so zasedle ZDA, ki so imele 4 milijone hektarjev gensko spremenjenega bombaža. Sledita ji Kitajska s 3, 9 milijona hektarjev in Pakistan z 2, 6 milijona hektarjev [43]. V letu 2014 so imele ZDA 96 % gensko spremenjenega bombaža, medtem ko je bilo v Indiji 95 % gensko spremenjenega [44] [45].

## 1.6 Razvoj sorte z izboljšano hranilno vrednostjo

Soja je bila gensko spremenjena, da bi izboljšali kakovost sojinega olja. Zaradi visoke vsebnosti linolne in linolenske maščobne kisline (večkrat nenasičene maščobne kisline), je sojino olje občutljivo za oksidacijo, zato je uporaba sojinega olja v živilskih izdelkih omejena. Z genetskimi spremembami so uspeli povečati količino oleinske kisline, stearinske kisline ter zmanjšali količino nenasičenih maščobnih kislin. S povečanjem deleža stearinske in oleinske kisline, je mogoče doseči na dva načina: (1) heterologna ekspresija stearoil-ACP tioesteraze ali (2) z induciranjem mutacij ali zmanjšanju izražanja  $\Delta 9$ -stearoil-ACP desaturaze (SAD) [46].

Celemnte in sod. [46] povzemajo, da je bila ugotovljena povezava med mutacijami v genu *FAD3* in nižjo vsebnostjo linolenske kisline. V soji so identificirali 3 *FAD3* gene: *GmFAD3A*, *GmFAD3B* in *GmFAD3C* (specifični za zrna). Z uporabo tehnologije interferenčne RNA, so utišali gene iz družine *GmFAD3* ter uspeli vzgojiti sojo z nižjo vsebnostjo linolenske kisline. Z utišanjem delta 9 in delta 12 desaturaze je podjetje DuPont Pioneer leta 2009 razvilo sojino olje z visoko vsebnostjo (nad 80 %) oleinske maščobne kisline, ki ga je začel tržiti leta 2010 [46].

## 2 RASTLINE, RAZVITE Z METODAMI ZA UREJANJE GENOMOV

Metode urejanja genomov omogočajo natančne, učinkovite in ciljno usmerjene spremembe v genomu. Urejanje genomov z nukleazami z motivi cinkov prstov (ZFN) in z nukleazami z DNA vezavnimi domenami TAL efektorjev (TALEN), obstaja že dve desetletji, vendar je pred kratkim prišla v ospredje metoda z uporabo nukleaz, povezanih s CRISPR lokusi (npr. Cas9), ki zagotavljajo preprostost in enostavnost ciljnega urejanja genov (slika 1). Vse zgoraj omenjene metode za urejanje genomov temeljijo na nukleazah, s katerimi lahko induciramo dvoverižno rez DNA na tarčnih mestih [47].

Z metodo TALEN je bila razvita sorta soje iz katere so pridelali prvi proizvod, olje Calyto, iz genomske preurejene soje, ki je prišel na trg v ZDA v letu 2019. Primerjava olja Calyno ter olja iz konvencionalne soje, je pokazala, da olje Calyno vsebuje manj nasičenih maščobnih kislin, poleg tega ima tudi višjo vsebnost bolj zdrave enkrat nenasičene oleinske kisline [48].

### 2.1 Primeri uporabe CRISPR/Cas9 na rastlinah

Leta 2016 je podjetje DuPont Pioneer naznanil razvoj prve sorte razvite s tehnologijo CRISPR in sicer izboljšane sorte koruze voščenke. Ostale sorte voščenk vsebujejo 75 % amilopektina in 25 % amiloze, medtem ko so z, z delecijo v genu *wx1* (gen udeležen pri sintezi škroba), so dosegli vsebnost amilopektina višjo od 97 % [49].

Raziskovalci so s pomočjo multipleksnega urejanja (hkratno induciranje mutacij z večimi gRNA), so vzgojili pšenico z genetskimi spremembami v genih *TaGW2*, *TaLpx-1* in *TaMLO* s čimer so povečali velikost pšeničnih zrn (zaradi spremembe v genu *TaGW2*) in boljšo odpornost na bolezn *Fusarium graminearum* (zaradi sprememb v genih *TaLpx-1*) [50].

Za razvoj odpornosti pšenice na žitno pepelovko (*Blumeria graminis*) so raziskovalci poleg CRISPR-Cas9 uporabili tudi TALEN nukleaze in dokazali, da je s tehnikami za urejanje

genoma mogoče hkrati spremeniti alele genov v poliploidnih genomih (pšenica je heksplodna) [51].

Etilen ima ključno vlogo v številnih različnih procesih v razvoju rastlin, kot tudi pri odzivu rastline na stres. Nedavne študije so pokazale, da prekomerna ekspresija gena *ARGOS8* pri koruzi zmanjšuje odziv rastline na etilenkar se v sušnih razmerah odraža v večji količini pridelka. Ker je pri koruzi omejeni gen podizražen, so s CRISPR-Cas9 in HDR popravljalnega mehanizma vstavili promotor *GOS2 PRO* v območje neprevedene regije (5'-UTR) (v tem primeru so potrebovali eno gRNA), z uporabo dveh gRNA pa jim je uspelo izrezati nativni promotor gena *ARGOS8* in ga zamenjati s konstitutivnim promotorjem *GOS2 PRO*. *GOS2 PRO* promotor je promotor gena *GOS2* pri koruzi. Konstrukte za prepis gRNA, sintezo Cas9 in DNK predlogo za vstavitvev na mesto preloma s homologno rekombinacijo so z gensko pištolo vnesli v celice embria. Natančno modifikacijo genomske DNK na mestu *ARGOS8* so preverili s PCR in sekvenciranjem. Pridobili so dve liniji (ena z insercijo promotorja, druga z zamenjavo) in pri obeh so ugotovili povečano izražanje gena *ARGOS8*. Linije so križali s testerjem (linija koruze za ugotavljanje kombinacijske sposobnosti hibrida), pridobili seme hibrida in ga testirali na večih lokacijah v ZDA in na lokacijah s sušnim stresom ugotovili, večji pridelek v primerjavi s hibridom, ki ni vseboval sprememb v promotorju. Ti rezultati dokazujejo uporabnost sistema CRISPR-Cas9 pri ustvarjanju novih alelnih sprememb za vzgojo rastlin, odpornih na sušni stres [52].

## **2.2 Pridelava semena gensko spremenjene soje, po poteku patentne zaščite (angl. generic GMOs)**

Po izteku Monsantoovega patenta za prvo sorto soje Roundup Ready, ki je odporna na glifosat, se je začel razvoj t. i. generične soje, odporne na glifosat. Na Kmetijskem oddelku Univerze v Arkansasu, je bila razvita prva sorta, ki je na trg prišla leta 2015. Glede na mnenje proizvajalca semena, je omenjena sorta prilagojena okolijskim razmeram v Arkansasu (ZDA) [53] [54].

## **2.3 Princip delovanja metod za urejanje genomov**

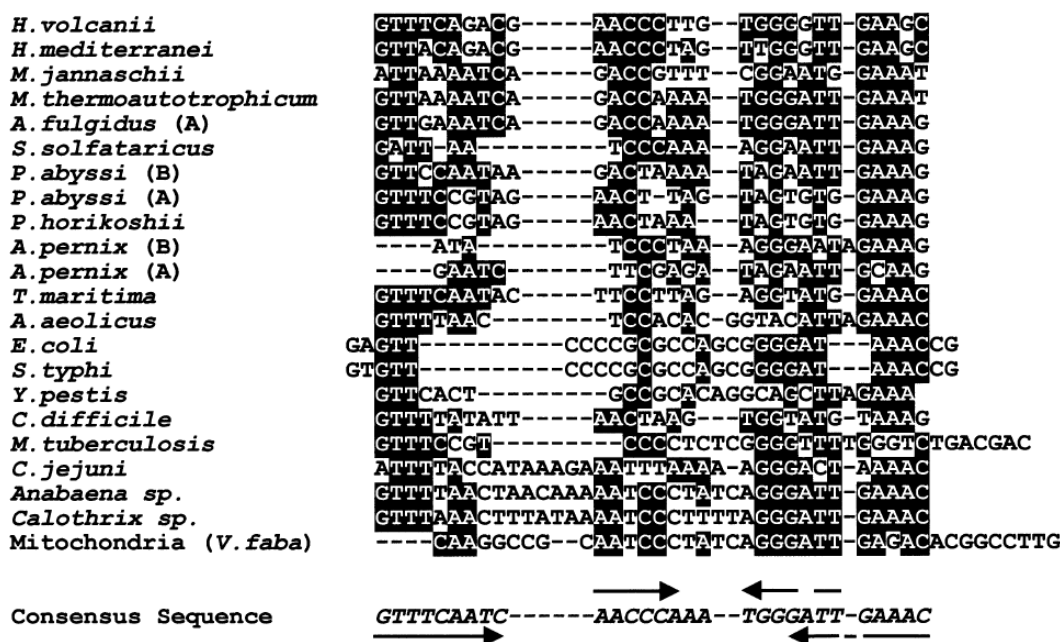
Kot že omenjeno v poglavju 2 metode za urejanje genomov omogočajo dodajanje, odstranjevanje ali spreminjanje genskega materiala na določenih mestih v genomu. Razvitih je bilo več metod za urejanje genomov. Najnovejša je znana kot metoda CRISPR-Cas9. Sistem CRISPR-Cas9 je v primerjavi z ostalimi metodami za urejanje genomov hitrejši, cenejši, natančnejši in učinkovitejši [55].

### **2.3.1 CRISPR tehnologija za urejanje genoma**

Barrangou (2015) povzema da so CRISPR lokusi in z njimi povezani proteini (npr. Cas9), značilni za bakterije in arheje in so pomembni pri razvoju odpornosti na viruse in plazmide. Zaporedja, ki so vrinjena med palindromna zaporedja (slika 2), predstavljajo del invazivnih genetskih elementov (po okužbi), s čimer organizem razvije odpornost na viruse (razvoj pridobljene imunosti), zato imajo ta zaporedja ključno vlogo v protivirusnem obrambnem sistemu prokariotov [56].

Cas9 je encim, ki s pomočjo CRISPR zaporedja, prepisanega v crRNA (angl. CRISPR RNA) in tracrRNA (angl. trans-activating crRNA) povzroči rez na delu DNA, ki je

komplementaren zaporedju crRNA. Encim Cas9 v kombinaciji s CRISPR zaporedjem, predstavlja temelj tehnike za urejanje genomov, znane kot CRISPR-Cas9. Predstavljen postopek urejanja ima široko paleto aplikacij, vključno z osnovnimi biološkimi raziskavami, razvojem biotehnoških izdelkov in zdravljenjem bolezni [57] [58].



Slika 2: Poravnava regije s palindromnimi zaporedji CRISPR lokusa iz različnih vrst bakterij. Potemnjeni deli predstavljajo ohranjena zaporedja. S puščicami so označene palindromne ponovitve [59]

### 2.3.2 Zgodovina razvoja CRISPR metode

Odkritja o CRISPR lokusu segajo v leto 1987, ko so japonski znanstveniki z Univerze v Osaki poročali, da so v bakteriji *E. coli* našli nenavaden del DNA, v katerem je bilo pet ponovitev istega zaporedja 29 nukleotidov, med katere so bili vrinjeni, po 32 nukleotidov dolgi odseki DNA, ki so se medsebojno razlikovali. Kasneje so podobne vzorce zapisov, opazili tudi pri drugih sortah bakterij, pri čemer niso vedeli kakšna je funkcija prekinjenih palindromnih ponovitev [60] [61] [62].

Leta 1993 so Van Soolingen in sod. (1993) med raziskovanem *Mycobacterium tuberculosis* (patogena bakterija iz družine *Mycobacteriaceae* in povzročiteljica tuberkuloze) identificirali lokus s ponovljivimi zaporedji, ki so bila prekinjena z unikatnimi zaporedji v dolžini 35 do 41 bp. Predlagali so uporabo lokusa s ponovitvami za genotipizacijo in identifikacijo različnih sevov *M. tuberculosis* [61] [62].

Regije s ponovitvami so bile identificirane tudi pri arhejah (*Haloferax* in *Haloarcula*) [63], njihovo funkcijo pa je raziskoval Francisco Mojica na Univerzi v Alicanteju, v Španiji. Mojica takrat domneval, da imajo gruče ponovitve vlogo pri pravilni ločitvi replicirane DNK v hčerinske celice med delitvijo celic. Prav tako je domneval, da plazmidi in kromosomi z identičnimi ponovitvenimi nizi, ne morejo obstajati v *Haloferax volcanii*. Prvič je bil zabeležen tudi prepis CRISPR lokusa [62] [64]. Leta 2002, so Tang in sodelavci pokazali, da so regije s CRISPR ponovitvami iz genoma *Archeoglobus fulgidus* prepisane v daljše



RNA molekule, ki so bile nato razrezane v manjše RNA enake dolžine, skupaj z nekaterimi daljšimi oblikami, in sicer dva, tri ali več ponovitvenih enot [65].

Pomembno dopolnilo k razumevanju delovanja sistema CRISPR je prišlo z Jansenovim dognanjem, da CRISPR lokus spremlja niz homolognih genov oziroma *cas* geni. Na začetku so bili identificirani štirje *cas* geni (*cas 1–4*). Pri Cas proteinih so bili ugotovljeni motivi helikaz in nukleaz. V tej publikaciji je kratica CRISPR nastala kot univerzalno ime za lokus s tovrstnimi ponovljivimi zaporedji. Vendar je funkcija CRISPR ostala skrivnostna [66]. Leta 2005 so tri neodvisne raziskovalne skupine pokazale, da so nekatera vrinjena/vmesna zaporedja (angl. spacers) med CRISPR palindromnimi ponovitvami pripadala bakteriofagom in tako je bilo ugotovljeno, da je CRISPR sistem za razvoj pridobljene imunosti. »Pri sistemu CRISPR bakterijam uspe shraniti dele DNA virusa, ki jih je napadel, kar jim omogoča razvoj odpornosti na ta virus. Gene z zapisom za specifični encim Cas9 so našli v bakterijskem genomu v bližini zaporedij CRISPR« [67] [68].

Študija, ki predpostavlja uporabo CRISPR sistema kot orodje za urejanje genetskega zapisa pa je bila objavljena leta 2012, v kateri so predlagali združitev tracrRNA in crRNA v vodilno RNA (gRNA ali sgRNA, angl. guide RNA ali single-guide RNA). Uporaba te metode je začela eksponentno naraščati [69] [70].

### **2.3.3 Popravljalni mehanizmi prelomov DNA**

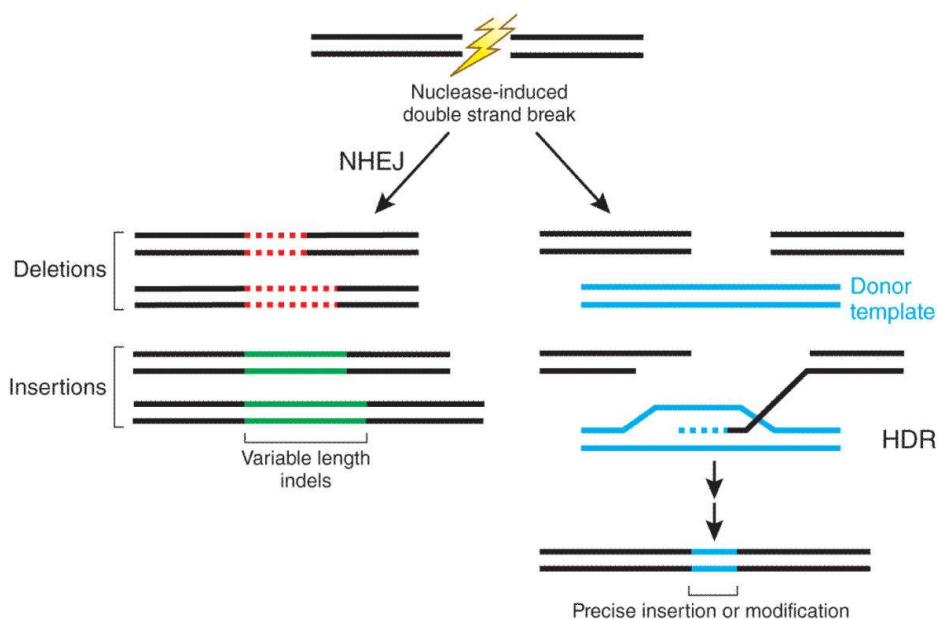
Najpomembnejši prvi korak pri izvajanju tarčnega urejanja genoma je ustvarjanje preloma dvojne verige DNA (angl. double strand break, DSB) na točno določenemu mestu v genomu, kjer želimo inducirati mutacijo oziroma spremembo zapisa DNA. Konca prerezanega kromosoma se lahko združita na 2 različna načina in sicer z nehomolognim združevanjem koncev ali s popravljalnim mehanizmom na osnovi homolognega zaporedja (angl. Homology directed repair, HDR) (slika 3) [47].

#### **Nehomologono združevanje koncev (angl. non-hologous end joining, NHEJ)**

NHEJ lahko vodi do učinkovitga induciranja mutacij, insercij ali delecij (INDEL mutacije) različnih dolžin, ki lahko motijo translacijski bralni okvir kodirajoče regije ali vezavna mesta transkripcijskih dejavnikov v regulatornih regijah genov [47].

#### **Popravljalni mehanizem na osnovi homolognega zaporedja (angl. homology directed repair, HDR)**

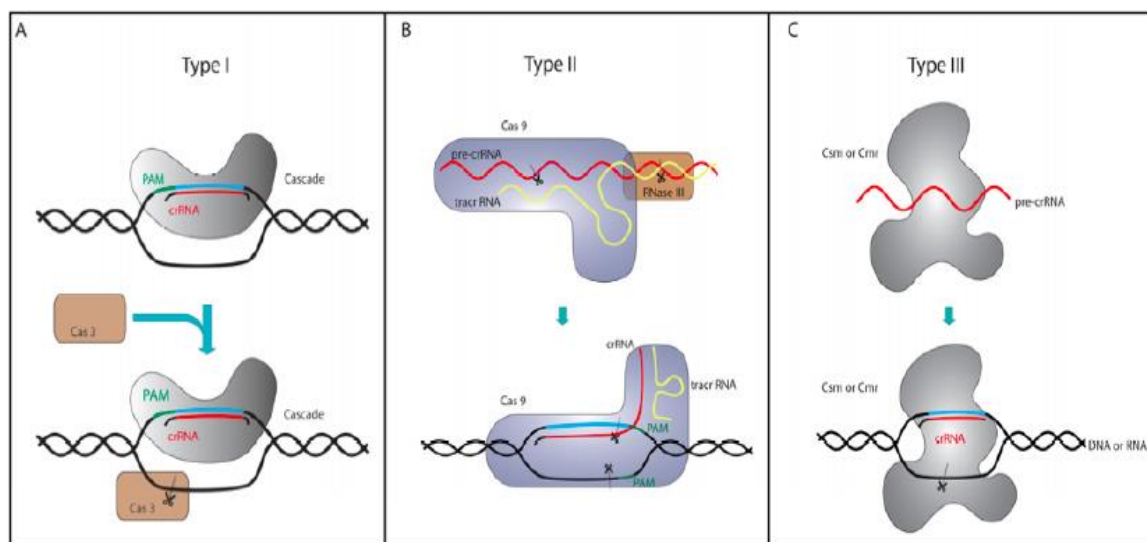
HDR mehanizem se lahko uporabi za uvedbo specifičnih točkovnih mutacij ali za vstavitve želenega zaporedja z rekombinacijo tarčnega mesta s tujo (eksogeno) DNA "donorskimi predlogami" [47].



Slika 3: Nukleazno inducirano urejanje genoma [47]

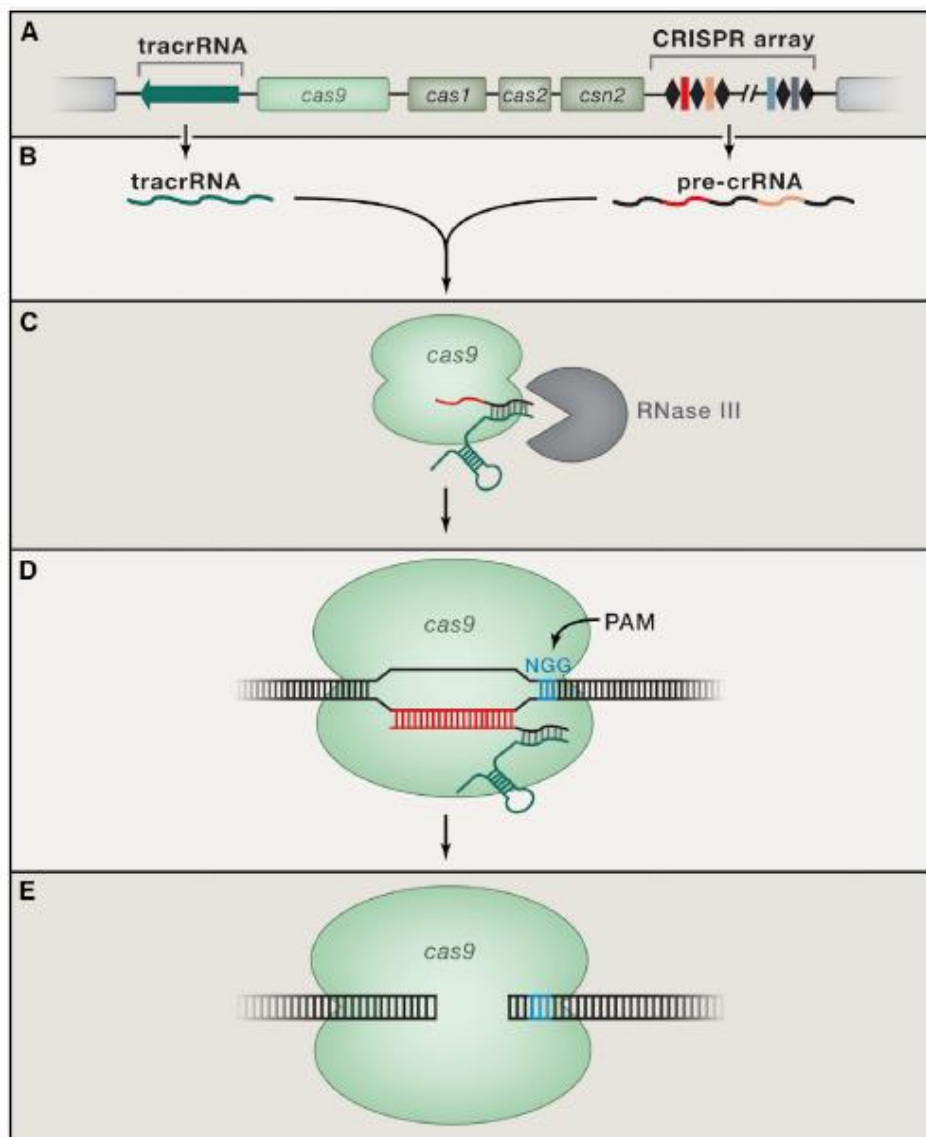
### 2.3.4 Princip delovanja CRISPR/Cas9

Obstajajo trije različni tipi CRISPR-Cas sistemov: A) tip I, B) tip II in C) tip III. (Slika 4) Vrste I in III se nahajajo v bakterijah in arhejah, in tip II le v bakterijah. Bakterijski sistem tipa II CRISPR-Cas je najbolj proučen od treh tipov [71].



Slika 4: Vrste CRISPR-Cas sistemi [71]

Sistem CRISPR-Cas9 tipa II, ki je značilen za bakterije *Streptococcus thermophilus* je najpreprostejši od treh vrst sistemov CRISPR in je bil osnovan za tehnologijo za urejanje genoma. Princip delovanja je prikazan na sliki 7 [69].



**Slika 5:** Sistem CRISPR-Cas9 tipa II [69]

Na zgornji sliki lahko vidimo: (A) Poleg CRISPR lokusa so locirani štirje geni, ki kodirajo proteine (*cas9*, *cas1*, *cas2* in *csn2*), ki sodelujejo pri vstavljanju novih zaporedij v CRISPR lokus in razrezu tuje DNA (*Cas9*) in *tracrRNA*. CRISPR lokus vsebuje regije s palindromskimi ponovitvami (označene s črnimi rombi), ki jih ločujejo vrinjena zaporedja (pravokotniki), ki izvirajo iz fagov in drugih genetskih elementov.

(B) Pri transkripciji CRISPR lokusa in *tracrRNA* nastane daljši prekursorski RNA, ki s pomočjo encimov zori v končno obliko *crRNA* in *tracrRNA*.

(C) Ribonukleoproteinski kompleks *crRNA*: *tracrRNA*:*Cas9* RNase III sodeluje pri zorenju *crRNA* in *tracrRNA*.

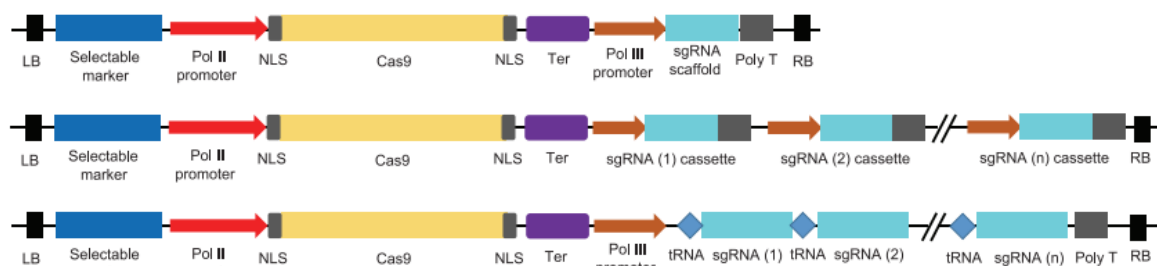
(D) Nastali kompleks (*Cas9*:*tracrRNA*:*crRNA*) prileže na komplementarno zaporedje DNA, ki se ujema z zaporedjem *crRNA* (prikazano z rdečo barvo). Vezava na ciljno mesto zahteva tudi prisotnost PAM motiva. Vezavi sledi razrez DNA molekule 3 nt pred PAM

(E) *Cas9* vsebuje dve endonukleazni domeni, HNH in RuvC, ki katalizirata rez *crRNA* komplementarne in nekomplementarne verige DNA, in nastanek topih koncev.

### 2.3.5 Načini vnosa *Cas9*/gRNA v rastlinske celice

V celico se lahko vstavi konstrukt z zapisom za *Cas9*, gRNA in selekcijskim markerjem ali pa z vnosom ribonukleoproteinskega kompleksa (brez DNA), ki ga sestavlja *Cas9* protein in gRNA [72]. Slika 6 prikazuje primere konstruktov za vnos v celico z *Agrobacterium*

*tumefaciens*. Z enim konstruktom je mogoče v celico vnesti več gRNA in sicer na način, da ima vsako zapredje gRNA promotor za RNA polimerazo III (2. primer na sliki 6) ali pa se več gRNA prepiše v policistrono RNA, ki jo nato endogene ribonukleaze, ki običajno sodelujejo pri zorenju tRNA, policistrono RNA razrežejo na posamezne gRNA molekule (3. primer na sliki 6).



Slika 6: Primer sestave konstrukta za vnos CRISPR/Cas9 v rastlinsko celico [72]

### 2.3.6 Načini preprečevanja nespecifičnih mest pri CRISPR-Cas9

Nespecifično delovanje CRISPR-Cas9 se nanaša na nespecifične oz. netarčne genske spremembe (angl. off-target effects), ki lahko nastanejo pri uporabi tehnik za urejanje genoma. Nepopolno ujemanje vodilne RNA z zaporednjem tarčnega mesta povzroči rez na nespecifičnih mestih, kar pomeni, da je treba zaporedje gRNA skrbno izbrati, da se lahko izognemo takšnim artefaktom in tako zmanjšamo število potencialnih mest za inducirane reze [73].

Ena od možnih strategij je preizkus učinkov zmanjšanja koncentracij gRNA in/ali Cas9 [47]. Tretji način za preprečevanje nespecifičnih mest z uporabo gRNA, ki se skrajša na 5' koncu komplementarne regije. Te skrajšane gRNA (tru-gRNA) vsebujejo 17 ali 18 nukleotidov, kar pomeni, da na splošno delujejo tako učinkovito kot gRNA v polni dolžini pri usmerjanju aktivnosti Cas9 na tarčo, vendar kažejo zmanjšan mutagen učinek na nespecifičnih mestih [74].

K zmanjšanju ne tarčnih sprememb lahko pripomore primerno določena regija za prileganje crRNA, kar omogočajo številna orodja, ki identificirajo verjetnost mutacij na ne tarčnih mestih. Raziskovalci lahko nato uporabijo ciljno sekvenciranje, po izvedbi laboratorijskih poskusov induciranja mutacij s CRISPR-Cas9, kjer lahko preverijo mutacije na tarčnih kot tudi netarčnih regijah [11].

## 3 METODE DELA

### 3.1 Izbor orodij

Orodja smo izbrali na osnovi pregleda literature in so omenjena v tabeli 1.

**Tabela 1:** Pregled orodij za razvoj vodilne RNA na osnovi pregleda literature

Rastlinska vrsta, za katero je bila v raziskavi določena gRNA	Vir	Orodje in link za dostop
Vinska trta	[42]	CRISPR RGEN Tools (Cas-Designer)
Vinska trta	[75]	CRISPR-P CRISPR RGEN
Pregledni članek	[76]	CRISPOR

### 3.2 Pregled orodij

#### 3.2.1 CRISPR RGEN Tools – Cas-Designer in Cas-OFFinder

Orodje Cas-Designer [77] je dostopno na spletni povezavi: <http://www.rgenome.net/cas-designer/>

Razvijalci orodja Cas-Designer so razvili tudi orodje Cas-OFFinder za iskanje potencialnih mest za induciranje mutacij na netarčnih mestih. Orodje Cas-OFFinder je dostopno na spletni povezavi: <http://www.rgenome.net/cas-offinder/> [77]

Orodje nudi izbor naslednjih možnosti: izbor genoma, določitev števila neujemanj, izbor različnih nukleaz in PAM mest [77].

Način delovanja orodja Cas-Designer in Cas-OFFinder: [77]

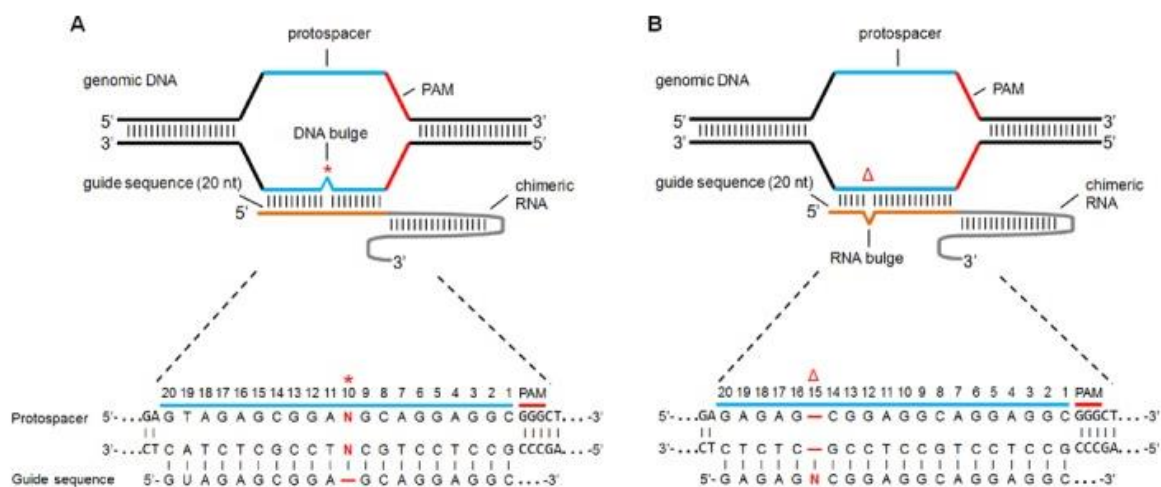
#### 1. Izbira gRNA

Cas-Designer lahko poišče možna tarčna mesta z različnimi PAM motivi [5'-NGG-3' ali 5' NR-NRG-3' za SpCas9, 5'-NNAGAAW-3 za StCas9, 5'-NNNNGMTT-3 N za NmCas9 in 5'-NNGRRT-3' za SaCas9]. Orodje izračuna verjetnost nastanka mutacije s spremembo bralnega okvirja (angl. microhomology-associated out-of-frame score). Orodje prikaže tudi predvidena mesta razreza, vsebnost GC v komplementarnem zaporedju. Orodje s sivo barvo označi tudi tarčne sekvence, ki vsebujejo več kot štiri tandemske ponovljene homopolimerne T regije (običajno take regije prepozna RNA polimeraza III kot transkripcijski terminacijski motiv, RNA polimeraza III sintetizira gRNA).

#### 2. Iskanje potencialnih nespecifični mest

Nato Cas-Designer prikliča Cas-OFFinder za določitev potencialnih netarčnih mest v uporabniško določenem genomu. Orodje določi potencialna netarčna mesta s simulacijo

insercij ali delecij na sistematično določenih potencialnih priležnih mestih gRNA na DNA (slika 7).



**Slika 7:** Prikaz simuliranja insercij na DNA in gRNA za določitev potencialnih učinkov na netarčnih mestih. [78]

Na sliki 7 lahko vidimo: (A) nastanek zanke pri simulaciji insercije v DNA molekuli ali (B) nastanek zanke na gRNA pri simulaciji insercije pri gRNA.

### 3.2.2 CRISPR-P 2.0

Orodje CRISPR-P 2.0 je dostopno na spletni povezavi: <http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/SCORE>

Na voljo imamo naslednje možnosti: izbor genoma za različne rastlinske vrste, določitev števila neujemanj, izbor različnih nukleaz in PAM mest, izbor snoRNA promotorja, izbor vektorja za vnos gRNA v celico [79].

Način delovanja orodja CRISPR-P 2.0: [79]

CRISPR-P 2.0 je orodje za načrtovanje, ki temelji na predhodni verziji CRISPR-P, ki je bila ena izmed najbolj priljubljenih orodij za določitev sgRNA za uporabo pri rastlinah. Tehnologija CRISPR-Cas9 se je v zadnjih dveh letih hitro razvijala, zato je platforma posodobljena. CRISPR-P 2.0 zagotavlja spletno storitev za računalniško podprto načrtovanje na visoko učinkovitih sgRNA z minimalnimi netarčnimi učinki. Na voljo ima naslednje funkcije:

- Podpira oblikovanje sgRNA za 49 rastlinskih genomov.
- Izboljšan je bil sistem za ovrednotenje učinkovitosti sgRNA na tarčnem mestu ter na netarčnih mestih. Sistem vrednotenja učinkovitosti v CRISPR-P 2.0 temelji na najnovejših znanjih o urejanju genoma s CRISPR-Cas9.
- Podpira različne CRISPR-Cas sisteme, kot so Cpf1 in različne Cas9 endonukleaze.
- Orodje izračuna vsebnost GC v vodilni RNA, prikaže mesto rezi in sekundarno strukturo sgRNA.

- Določena je tudi identifikacija sgRNA iz zaporedij po meri. Če uporabnikova genom/zaporedje ni na seznamu izbranih genomov, uporabnikom omogoča nalaganje zaporedij po meri in identifikacijo sgRNA.

### 3.2.3 CRISPOR

Orodje CRISPOR lahko najdemo na spletni povezavi: <http://crispor.tefor.net/>.

Na voljo imamo naslednje možnosti izbora orodij, kot so izbor genoma, določitev števila neujemanj, izbor različnih nukleaz in PAM mest [80].

V uporabniškem vmesniku uporabnik vstavi zaporedje tarčne regije in izbere rastlinsko vrsto. CRISPOR zatem določi gRNA in izračuna parametre (specifičnost (angl. specificity score)

- vrednost, ki je izračunana na osnovi števila potencialnih netarčnih mest, je v razponu od 0 do 100, pri čemer višja vrednost pomeni boljši rezultat. Vrednost 100 pomeni, da se v genomu ne nahaja nobeno zaporedje, ki se od gRNA razlikuje do 4 nt: učinkovitost (angl. Efficiency scores)

- vrednost od 0 do 100 predvideva učinkovitost induciranja rezi z izbrano gRNA; verjetnost nastanka mutacije s spremenjenim bralnim okvirjem (angl. Out-of-frame score), ki prav tako obsega vrednosti med 0 in 100; seštevek potencialnih netarčnih mest (angl. Off-target mismatch counts), delež GC, itd.

### 3.3 Testiranje orodij

Za testiranje orodij smo uporabili DNA zaporedje 3. eksona gena *MLO-7* (*Mildew Locus O-7*), ki je bilo uporabljeno v študiji Malnoy, in sod. [81], in sicer z namenom razvoja odpornosti vinske trte na oidij vinske trte. V študiji so uporabili naslednja 3 gRNA zaporedja:

**Tabela 2:** Izbrane gRNA zaporedja iz študija [81]

Oznaka	Zaporedje
RG1	TATGCATTTCTGAGAGTGTTGGG
RG2	CACTTGGCACCCCTTGTA AAAAAGG
RG3	CCAAAGATTTTAAGAACACATGC
RG4	TTTTAAGAACACATGCTCTGAGG

S testiranjem različnih orodij smo želeli preveriti, če bi tudi glede na rezultate vseh orodij še vedno bile najbolj primerne gRNA iz preglednice 3 ali pa bi predlagali uporabo drugih gRNA. Po in vitro testiranju gRNA, so v omenjeni študiji najboljše rezultate pridobili pri uporabi gRNA z oznako RG4.

DNA zaporedje 3. eksona gena *MLO-7* prenesli iz podatkovne zbirke EnsemblPlants, kjer je dostopen genom vinske trte.

Povezava do spletne strani z dostopom do *MLO-7* gena:  
[https://plants.ensembl.org/Vitis\\_vinifera/Transcript/Exons?db=core;g=VIT\\_13s0019g04060;r=13:24396255-24396255;t=VIT\\_13s0019g04060.t01](https://plants.ensembl.org/Vitis_vinifera/Transcript/Exons?db=core;g=VIT_13s0019g04060;r=13:24396255-24396255;t=VIT_13s0019g04060.t01)

DNA zaporedje 3. eksona gena *MLO-7*. Zato, da smo lahko določili gRNA na robnih zaporedjih eksona, smo dodali še 25 bp zaporedja sosednjih intronov (označeno z malimi črkami).

```
ttctatcttggtgtgtgaagAGCTTATGCTGTTGGGAGTCATATCCTTGCTGCTTACAAT  
ATTACAAGATTACATTTCAAAGATATGCATTTCTGAGAGTGTGGGTCCACTTG  
GCACCCTTGTA AAAAAGGAAACCAAAGATTTTAAGAACACATGCTCTGAGgtaatta  
agttcatataattctat
```

Pri testiranju orodij smo izbrali genom vinske trte, sistem CRISPR-Cas9, PAM motiv 5'-NGG-3'. Za vse ostale možnosti smo pustili privzete nastavitve.



## 4 REZULTATI IN DISKUSIJA

### 4.1 Rezultati testiranja orodja Cas-Designer

Rezultati orodja Cas-Designer so na sliki 8.

RGEN Target (5' to 3')[?]	Position[?]	Cleavage Position (%)[?]	Direction[?]	GC Contents (% w/o PAM)[?]	Out-of-frame Score[?]	Mismatches[?]		
						0	1	2
TTGTGAAGAGCTTATGCTGTTGG	18	17.7	+	40.0	59.8	1	1	0
TGTGAAGAGCTTATGCTGTTGGG	19	18.2	+	40.0	60.4	2	0	0
TTGTAATTTGTAAGCAGCAAGG	50	28.6	-	30.0	49.0	1	1	0
ATATGCATTTCTGAGAGTGTGG	88	54.2	+	35.0	44.9	1	1	0
TATGCATTTCTGAGAGTGTGGG	89	54.7	+	35.0	52.7	1	0	0
CTGAGAGTGTGGGTCCACTTGG	98	59.4	+	55.0	67.8	1	0	1
CTTTTTACAAGGGTCCAAGTGG	113	61.5	-	45.0	64.8	1	0	0
CACTTGGCACCCCTGTAAAAAGG	114	67.7	+	45.0	71.7	1	0	0
CITTTGGITTCCTTTTTACAAGG	123	66.7	-	30.0	70.6	1	0	0
TCTTTGGITTCCTTTTTACAAGG	124	67.2	-	30.0	71.6	1	0	1
GCATGTGTTCTTAAATCTTGG	140	75.5	-	30.0	60.9	1	0	0
TTTTAAGAACACATGCTCTGAGG	147	84.9	+	35.0	64.6	1	0	0

**Slika 8:** Rezultati pri testiranju MLO-7 gena v orodja Cas-Designer

Orodje poleg mesta za prileganje gRNA ponudi še naslednje izračune, ki omogočajo izbiro najprimernejših gRNA. To so:

- delež GC gRNA(v izračun ni vključen PAM motiv): Priporočljiva vsebnost je od 20 % do 80 %.
- verjetnost nastanka mutacij s spremenjenim bralnim okvirjem (angl. out-of-frame score): Priporočljiva je vrednost 66 ali več. „N / A“ pomeni, da ocene ni bilo mogoče izračunati.
- RGEN Target (5 'do 3'): vsa določena mesta za razvoj gRNA. Homopolimerne regije z več kot štirimi T so obarvane sivo, ker jih lahko RNA polimeraza III prepozna kot terminatorski signal pri transkripciji.

Glede na priporočila smo izbrali gRNA v Tabela 3: Izbrane sgRNA zaporedja pri testiranju orodja Cas-Designer

**Tabela 3:** Izbrana gRNA zaporedja po testiranju orodja Cas-Designer

Oznaka	Zaporedje	GC Contents (% w/o PAM)	Rezultat zunaj okvira (Out-of-frame)
RG1	CTGAGAGTGTGGGTCCACTTGG	55.0	67.8
RG2	CACTTGGCACCCCTGTAAAAAGG	45.0	71.7
RG3	TCTTTGGITTCCTTTTTACAAGG	30.0	71.6

## 4.2 Rezultati testiranja orodja CRISPR-P 2.0

Rezultati testiranja orodja CRISPR-P 2.0 so na sliki 9.

	On-score <sup>?</sup>	Sequence	Region	%GC
guide1	0.5843	CTTTTTACAAGGGTGCCAAGTGG	exon	45%
guide2	0.4579	CTTTGGTTTCCTTTTTACAAAGG	exon	30%
guide3	0.2764	TTTAAAGAACACATGCTCTGAGG	exon	35%
guide4	0.2269	CTGAGAGTGTTGGGTCCACTTGG	exon	55%
guide5	0.1626	GCATGTGTTCTTAAAATCTTGG	exon	30%
guide6	0.1379	TGTGAAGAGCTTATGCTGTTGGG	intron	40%
guide7	0.1095	TTGTAATATTGTAAGCAGCAAGG	exon	30%
guide8	0.0893	ATATGCATTTCTGAGAGTGTGG	exon	35%
guide9	0.0879	TCTTTGGTTTCCTTTTTACAAAGG	exon	30%
guide10	0.0806	CACTTGGCACCCTTGTA AAAAGG	exon	45%
guide11	0.0673	TATGCATTTCTGAGAGTGTGGG	exon	35%
guide12	0.0174	TTGTGAAGAGCTTATGCTGTGG	intron	40%

Slika 9: Rezultati pri testiranju MLO-7 gena v orodja CRISPR-P 2.0

Orodje ponudi naslednje izračune, ki omogočajo izbiro najprimernejših gRNA. To so:

- delež GC gRNA(v izračun ni vključen PAM motiv): Priporočljiva vsebnost je od 20 % do 80 %.
- Specifičnost (angl. On-target): Za najboljše so predvidene vrednosti nad 0.5, zadostni so lahko med 0.2 in 0.5

Glede na priporočila smo izbrali gRNA v Tabeli 4.

Tabela 4: Izbrana gRNA zaporedja po testiranju orodja CRISPR-P 2.0

Oznaka	Zaporedje	On-score	%GC
RG1	CTTTTTACAAGGGTGCCAAGTGG	0.5843	45%
RG2	CTTTGGTTTCCTTTTTACAAAGG	0.4579	30%
RG3	TTTAAAGAACACATGCTCTGAGG	0.2764	35%
RG4	CTGAGAGTGTTGGGTCCACTTGG	0.2269	55%

### 4.3 Rezultati testiranja orodja CRISPOR

Rezultati testiranja orodja CRISPOR so na sliki 10.

Parametriza izbor gRNA:

- vrednost specifičnosti (angl. Specificity Score, kratica MIT označuje, da je bila formula za izračun te vrednosti vzeta iz MIT Crispr spletne strani): Priporočljiva vrednost je nad 50.
- vrednost učinkovitosti – višja vrednost tega parametra nakazuje boljšo učinkovitost induciranja rezi na tarčnem mestu.
- verjetnost nastanka mutacij s spremenjenim bralnim okvirjem (angl. out-of-frame score): 0-100. Ta parameter je pomemben, kadar želimo doseči izbitje gena oz. utišati izražanje. Priporočljivo je 66 ali več.

Glede na priporočila smo izbrali gRNA v Tabeli 5.

**Tabela 5:** Izbrana gRNA zaporedja po testiranju orodja CRISPOR

Oznaka	Zaporedje	MIT Specificity Score	Out-of-Frame
RG1	TTTTAAGAACACATGCTCTGAGG	97	67
RG2	CTGAGAGTGTTGGGTCCACTTGG	96	68
RG3	CACTTGGCACCCTTGTA AAAAAGG	96	70
RG4	CTTTTTACAAGGGTGCCAAGTGG	95	70

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency <small>Show all scores</small> Doench '16 Mor-Mateos		Outcome Out-of-Frame Lindel		Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score <small>No exons. <input type="checkbox"/> chr13 only</small>
167 / fw	TTTTAAGAACACATGCTCTG AGG ⚠ Not with U6/U3 Enzymes: <i>BstDEI</i> , <i>MluCI</i> , <i>Hpy188I</i> Cloning / PCR primers	97	97	65	33	67	92	0-0-0-2-28 0-0-0-0-0 30 off-targets	4:chr3 19.07 Mbp 3:chr8 18.29 Mbp 4:chr18 23.33 Mbp show all...
118 / fw	CTGAGAGTGTGGGTCCACT TGG Enzymes: <i>Hpy166II</i> , <i>BanI</i> , <i>NlaIV</i> Cloning / PCR primers	96	98	47	56	68	84	0-0-1-0-16 0-0-0-0-0 17 off-targets	2:chr13 5.36 Mbp 4:chr7 1.84 Mbp 4:chr14 1.79 Mbp show all...
134 / fw	CACTTGGCACCCCTGTAAAA AGG Cloning / PCR primers	96	97	27	42	70	76	0-0-0-4-9 0-0-0-0-0 13 off-targets	4:chrUn 25.43 Mbp 4:chrUn 10.24 Mbp 4:chrUn 25.44 Mbp show all...
113 / rev	CTTTTACAAGGGTGCCAAAG TGG ⚠ Not with U6/U3 Enzymes: <i>Bme18I</i> , <i>Hpy166II</i> , <i>NlaIV</i> , <i>PspPI</i> Cloning / PCR primers	95	98	63	35	70	85	0-0-0-1-16 0-0-0-0-1 17 off-targets	4:chr11 7.86 Mbp 4:chr12 16.71 Mbp 4:chr15 14.88 Mbp show all...
109 / fw	TATGCATTCTGAGAGTGT GGG ⚠ Inefficient Enzymes: <i>Bme18I</i> , <i>Hpy166II</i> , <i>NlaIV</i> , <i>PspPI</i> Cloning / PCR primers	83	96	47	46	62	85	0-1-0-13-38 0-0-0-2-1 52 off-targets	4:chr3 2.94 Mbp 4:chr16 595.72 Kbp 4:chr3 17.03 Mbp show all...
140 / rev	GCATGTGTTCTTAAATCTT TGG ⚠ Inefficient Cloning / PCR primers	80	88	35	37	57	78	0-0-0-7-79 0-0-0-1-3 86 off-targets	4:chr18 21.27 Mbp 4:chr11 16.80 Mbp 4:chr13 10.90 Mbp show all...
123 / rev	CTTTGGTTCTTTTTACAA GGG ⚠ Not with U6/U3 Enzymes: <i>BanI</i> , <i>NlaIV</i> Cloning / PCR primers	78	88	43	24	67	80	0-0-2-13- 114 0-0-0-0-0 129 off-targets	4:chr1 7.27 Mbp 4:chr16 17.28 Mbp 3:chr18 5.86 Mbp show all...
124 / rev	TCCTTGGTTCTTTTTACA AGG ⚠ Not with U6/U3 Enzymes: <i>BanI</i> , <i>NlaIV</i> Cloning / PCR primers	73	86	49	32	69	87	0-0-2-11- 137 0-0-2-2-21 150 off-targets	4:chr8 15.70 Mbp 4:chr18 2.03 Mbp 4:chr13 2.63 Kbp show all...
108 / fw	ATATGCATTCTGAGAGTGT TGG Enzymes: <i>Bme18I</i> , <i>NlaIV</i> , <i>PspPI</i> Cloning / PCR primers	70	95	59	32	52	67	0-1-0-0-39 0-0-0-0-0 40 off-targets	1:chr13 5.36 Mbp 4:chr5 831.76 Kbp 4:chr13 16.93 Mbp show all...
50 / rev	TTGTAATATTGAAGCAGCA AGG Enzymes: <i>ApeKI</i> , <i>Fsp4HI</i> , <i>BstVII</i> Cloning / PCR primers	60	95	64	32	48	86	0-1-0-3-34 0-0-0-0-0 38 off-targets	1:chr13 5.36 Mbp 4:chr2 1.82 Mbp 4:chr18_random 2.75 Mbp show all...
38 / fw	TTGTAAGAGCTTATGCTGT TGG Enzymes: <i>HinfI</i> , <i>PpsI</i> Cloning / PCR primers	49	97	47	37	54	67	0-1-0-1-22 0-1-0-0-0 24 off-targets	1:chr13 5.36 Mbp 4:chr12 11.12 Mbp 4:chr12 2.33 Mbp show all...
39 / fw	TGTGAAGAGCTTATGCTGT GGG ⚠ Inefficient Enzymes: <i>HinfI</i> , <i>PpsI</i> Cloning / PCR primers	49	96	55	63	57	86	1-0-0-1-29 1-0-0-1-0 31 off-targets	0:chr13 5.36 Mbp 4:chr14 3.95 Mbp 4:chr8 11.42 Mbp show all...

Slika 10: Rezultati pri testiranju MLO-7 gena v orodja CRISPOR

## 4.4 Primerjava rezultatov orodij

V okviru zaključne naloge smo testirali različna orodja za razvoj gRNA s CRISPR-Cas9 metodo, s PAM motivom 5'-NGG-3'. Za tarčno zaporedje smo izbrali 3. ekson gena MLO-7 vinske trte, ki so ga v raziskavi, katere namen je bil razvoj vinske trte sorte 'Chardonnay' odporne na oidij oz. pepelovko.

Naredili smo izbor gRNA z najboljšimi vrednostmi parametrov, ki jih orodja poleg gRNA izračunajo. Rezultati so naslednji:

- Pri zaporedju CTGAGAGTGTTGGGTCCACTTGG smo dobili enake rezultate, pri testiranju vseh orodjih.
- Prav tako smo dobili enake rezultate pri zaporedju TTTTAAGAACACATGCTCTGAGG pri CRISPOR, CRISPR-P 2.0. To zaporedje, se je pri testiranju na gRNA celicah z oznako RG4, prikazalo kot najbolj primerno in je bilo izbrano v študiji. Pri Cas-Designerji se to zaporedje ne pojavlja kot primerno za izbiri.
- Tudi pri zaporedju CTTTTTACAAGGGTGCCAAGTGG pri testiranju v CRISPOR in CRISPR-P 2.0., so bili rezultati enaki. Pri Cas-Designerji se to zaporedje pojavlja, ampak z premajhno verjetnost nastanka mutacij s spremenjenim bralnim okvirjem, priporočljivo vrednost 66 ali več, zaporedje pa ima vrednost 64.8.

## 5 ZAKLJUČEK

Enoznačnega odgovora brez dodatne interpretacije na naslovno zastavljeno vprašanje zaenkrat ne moremo podati.

Tekom pisanje zaključnega dela smo spoznali načine delovanja različnih orodij za razvoj CRISPR-Cas9 vodilne RNA molekule za tarčno mutagenozo rastlin. V sami nalogi smo testirali zaporedja za DNA zaporedje 3. eksona gena *MLO-7* ter način pridobili rezultate za izbiro gRNA zaporedja.

Glede na pridobljene rezultate testiranja, lahko sklepamo, da je izbor gRNA, ki so jo Malnoy in sod. [9] označili z oznako RG4 (TTTTAAGAACACATGCTCTGAGG), najbolj primerna, saj se pojavlja pri testiranju orodjih CRISPOR, CRISPR-P 2.0 ter v študiji. To zaporedje, se je pri testiranju na gRNA celicah v študiji, prikazalo kot najbolj primerno. V orodje Cas-Designer se prav tako pojavlja, vendar z manjšo verjetnostjo nastanka mutacij ter s spremenjenim bralnim okvirjem (angl. out-of-frame score) od priporočljivega.

Kot drugo primerno zaporedje, predlagamo zaporedje CTTTTTACAAGGGTGCCAAGTGG, saj se pojavlja pri testiranju vseh orodjih, vendar ne v študiji. Leta 2016 je bila narejena študija, vendar so do zdaj na izbiro boljše posodobitve vseh orodij.

Kot zadnjo, tretjo izbiro, bi navedli zaporedje CTTTTTACAAGGGTGCCAAGTGG katero pri testiranju v CRISPOR in CRISPR-P 2.0., orodjih, smo dobile iste rezultate glede določenih parametrov.

Želimo si, da bi bilo v prihodnosti narejenih več podobnih študij preizkušenih na več različnih orodjih, saj lahko na tak način pridobimo bolj zanesljive rezultate pri izbiri gRNA primerne zaporedja.

## 6 LITERATURA IN VIRI

- [1] Bohanec, B., Javornik, B., Srel, B., Gensko spremenjena hrana., 167 str., 2004, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Link za dostop: <http://www.bf.uni-lj.si/oddelek-za-agronomijo/o-oddelku/katedre-in-druge-org-enote/za-genetiko-biotehnologijo-statistiko-in-zlahtnjenje-rastlin/genetika-biotehnologija-in-zlahtnjenje-rastlin/gsr/>
- [2] Genetic Engineering Products, Link za dostop: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/genetic-engineering-products/>
- [3] 5 Main Enzymes Involved in Genetic Engineering | Biotechnology, Link za dostop: <http://www.biologydiscussion.com/genetic-engineering/5-main-enzymes-involved-in-genetic-engineering-biotechnology/61379>
- [4] Y. Zhang, K. Massel, I. D. Godwin, and C. Gao, "Applications and potential of genome editing in crop improvement," *Genome Biology*, vol. 19, p. 210, November 30 2018, Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30501614>
- [5] P. Gepts, A Comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding, and Genetic Engineering, Nov, 2002
- [6] "Genome editing of crops: A renewed opportunity for food security" (2017 Jan 11), Fawzy Georges and Heather Ray Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5592977/>
- [7] Lutz Grohmann, Jens Keilwagen, Nina Duensing, Emilie Dagand, Frank Hartung, Ralf Wilhelm, Joachim Bendiek and Thorben Sprink, Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities, 12 March 2019 Link za dostop: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00236/full>
- [8] Clive James, Anatole F. Krattiger, Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants: 1986 to 1995, No. 1-1996 Link za dostop: <http://www.isaaa.org/kc/Publications/pdfs/isaaabriefs/Briefs%201.pdf>
- [9] PATRICK A. STEWART AND WILLIAM P. McLEAN, PUBLIC OPINION TOWARD THE FIRST, SECOND, AND THIRD GENERATIONS OF PLANT BIOTECHNOLOGY, 14 July 2005, Link za dostop: [https://www.jstor.org/stable/4293924?seq=1#metadata\\_info\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/4293924?seq=1#metadata_info_tab_contents)
- [10] "Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects" (2016) Board on Agriculture and Natural Resources; Division on Earth and Life Studies; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Link za dostop: <https://agbiotech.ces.ncsu.edu/wp-content/uploads/2016/05/NAS-Genetically-Engineered-Crops-Full-Report.pdf? fwd=no>

- 
- [11] SANDEEP RAVINDRAN (Mar 1, 2018) "New Methods to Detect CRISPR Off-Target Mutations" Link za dostop: <https://www.the-scientist.com/lab-tools/new-methods-to-detect-crispr-off-target-mutations-30013>
- [12] Fernandez-Cornejo J, Wechsler SJ, Livingston M. Adoption of genetically engineered crops by U.S. farmers has increased steadily for over 15 years. (4 March 2014). USDA
- [13] Adapted from Malakoff d. and Stokstad E. Pesticide Planet. Science Magazine 16 avgust 2013
- [14] GITIG, DIANA (15 March 2018). "Planting GMOs kills so many bugs that it helps non-GMO crops". Ars Technica. Retrieved 2018-04-13. Link za dostop: <https://arstechnica.com/science/2018/03/planting-gmos-kills-so-many-bugs-that-it-helps-non-gmo-crops/>
- [15] "PLANT BIOTECHNOLOGY AND GENETICS: Principles, Techniques, and Applications" (2008) C. Neal Stewart, Jr Link za dostop: <http://www.routetvies.fr/medias/files/1-plant-biotechprinciples-techniques-and-applications1.pdf>
- [16] Riaz, Mian N. (2006). Soy Applications in Food. Boca Raton
- [17] Modified Organism MON-Ø4Ø32-6 - Roundup Ready™ soybean Link za dostop: <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14796>
- [18] Germany's Bayer closes \$63 billion Monsanto takeover, plans to drop US company's name Link za dostop: <https://www.cnbc.com/2018/06/07/germanys-bayer-closes-monsanto-deal-plans-to-drop-us-companys-name.html>
- [19] Roller, Sibel; Susan Harlander (1998). "Modern Food Biotechnology: Overview of Key Issues". In Roller, Sibel; Susan Harlander (eds.). Genetic Modification in the Food Industry: A Strategy for Food Quality Improvement. London: Blackie strani 5-26
- [20] Celec P; et al. (Dec 2005). "Biological and Biomedical Aspects of Genetically Modified Food". Biomedicine & Pharmacotherapy.
- [21] Uradna spletna stran BASF Link za dostop: <https://www.basf.com/si/sl.html>
- [22] Homrich MS et al (2012) Soybean genetic transformation: a valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants
- [23] Padgett SR, et al (1995) Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line.
- [24] "Roundup Ready System". Monsanto. Archived from the original on 2013-04-02. Link za dostop: <https://web.archive.org/web/20130402204619/http://www.monsanto.com/weedmanagement/Pages/roundup-ready-system.aspx>



- [25] Caio A. Carbonari, Débora O. Latorre, Giovanna L. G. C. Gomes, Edivaldo D. Velini, Daniel K. Owens, Zhiqiang Pan, and Franck E. Dayan corresponding author (5 Jan 2016) "Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink® and WideStrike® cotton"
- [26] Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL (March 2005). "Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future".
- [27] "History of Bt". University of California. Retrieved 8 February 2010. Link za dostop: [http://www.bt.ucsd.edu/bt\\_history.html](http://www.bt.ucsd.edu/bt_history.html)
- [28] Ostlie KR et al. University of Minnesota Extension Office. Last Reviewed 2008. Bt Corn & European Corn Borer: Long-Term Success Through Resistance Management
- [29] Marra, M.C., Piggott, N.E., & Goodwin, B.K. (2012). The impact of corn rootworm protected biotechnology traits in the United States. AgBioForum,
- [30] Erin W. Hodgson, Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory. Link [za dostop: https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://en.wikipedia.org/&httpsredir=1&article=1984&context=extension\\_curall](https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://en.wikipedia.org/&httpsredir=1&article=1984&context=extension_curall)
- [31] F.B. Peairs (2013). "Bt Corn: Health and the Environment – 0.707" Colorado State University Extension Office. Link [za dostop: https://extension.colostate.edu/docs/pubs/crops/00707.pdf](https://extension.colostate.edu/docs/pubs/crops/00707.pdf)
- [32] Erin Hodgson and Aaron Gassmann, Iowa State Extension, Department of Entomology. May 2010. New Corn Trait Deregulated in U.S. Link za dostop: <https://crops.extension.iastate.edu/cropnews/2010/05/new-corn-trait-deregulated-us>
- [33] Ric Bessin, Extension Entomologist, University of Kentucky College of Agriculture. May 1996, last updated November 2010. Bt-Corn for Corn Borer Control Link za dostop: <http://entomology.ca.uky.edu/>
- [34] Castagnola AS, Jurat-Fuentes, JL. Bt Crops: Past and Future. Chapter 15 in [Bacillus Thuringiensis Biotechnology], Ed. Estibaliz Sansinenea. Springer, Mar 2, 2012
- [35] Jun-Zhi Wei, Kristina Hale, Lynn Carta, Edward Platzer, Cynthia Wong, Su-Chiung Fang, and Raffi V. Aroian, Bacillus thuringiensis crystal proteins that target nematodes, 2003 Mar 4 Link [za dostop: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151414/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151414/)
- [36] James, Clive (1996). "Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants: 1986 to 1995" The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Link [za dostop: http://www.isaaa.org/kc/Publications/pdfs/isaaabriefs/Briefs%201.pdf](http://www.isaaa.org/kc/Publications/pdfs/isaaabriefs/Briefs%201.pdf)
- [37] Qiu, Jane (13 May 2010). "GM crop use makes minor pests major problem". Nature. Retrieved 10 June 2016. Link [za dostop: https://www.nature.com/news/2010/100513/full/news.2010.242.html](https://www.nature.com/news/2010/100513/full/news.2010.242.html)

- [38] Lu, Y; Wu, K; Jiang, Y; Guo, Y; Desneux, N (Jul 2012). "Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services" Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722864>
- [39] Kathage, J; Qaim, M (Jul 2012). "Economic impacts and impact dynamics of Bt (*Bacillus thuringiensis*) cotton in India" Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753493>
- [40] Morse, S; Bennett, RM; Ismael, Y (2005). "Genetically modified insect resistance in cotton: some farm level economic impacts in India" Link za dostop: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026121940400239X?via%3Dihub>
- [41] Wu, K-M; Lu, Y-H; Feng, H-Q; Jiang, Y-Y; Zhao, J-Z (Sep 2008). "Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton" Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801998>
- [41] M. Malnoy, R. Viola, M.-H. Jung, O.-J. Koo, S. Kim, J.-S. Kim, et al., "DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins," *Frontiers in Plant Science*, vol. 7, p. 1904, 12/2009/11/received 12/01/accepted 2016
- [43] ISAAA Brief 43-2011: Executive Summary Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. Retrieved 24 September 2012. Link za dostop: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp>
- [44] Adoption of Genetically Engineered Crops in the U.S. – Economic Research Service, of the U.S. Department of Agriculture Link za dostop: <https://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us.aspx>
- [45] "Facts and trends - India" (PDF). International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Link za dostop: [http://www.isaaa.org/resources/publications/biotech\\_country\\_facts\\_and\\_trends/download/Facts%20and%20Trends%20-%20India.pdf](http://www.isaaa.org/resources/publications/biotech_country_facts_and_trends/download/Facts%20and%20Trends%20-%20India.pdf)
- [46] Clemente, Tom E.; Cahoon, Edgar B. (2009). "Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content". *Plant Physiology*.
- [47] J. D. Sander and J. K. Joung, "CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting," *Nature biotechnology*, vol. 32, pp. 347-355, 03/02 2014.
- [48] "Rise of the First Gene-edited Soybean Welcomes New CRISPR Foods" (July 3, 2019) Link za dostop: <http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=17596>
- [49] "DUPONT PIONEER'S NEXT GENERATION OF WAXY CORN SHOWS THE GREEN SIDE OF CRISPR-CAS9" (16 February 2017) Link za dostop: <https://biovox.eu/insights/detail/dupont-pioneer-s-next-generation-of-waxy-corn-shows-the-green-side-of-crispr-cas9>

- [50] W. Wei, P. Qianli, H. Fei, A. Alina, C. Shiaoman, T. Harold, et al., "Transgenerational CRISPR-Cas9 Activity Facilitates Multiplex Gene Editing in Allopolyploid Wheat," *The CRISPR Journal*, vol. 1, pp. 65-74, 2018.
- [51] Y. Wang, X. Cheng, Q. Shan, Y. Zhang, J. Liu, C. Gao, et al., "Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew," *Nature Biotechnology*, vol. 32, p. 947, 07/20/online 2014.
- [52] J. Shi, H. Gao, H. Wang, H. R. Lafitte, R. L. Archibald, M. Yang, et al., "ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions," *Plant Biotechnol J*, vol. 15, pp. 207-216, Feb 2017.
- [53] Fred Miller, University of Arkansas Division of Agriculture Communications (December 3, 2014). "Arkansas: 'Look Ma, No Tech Fees.' Round Up Ready Soybean Variety Released". AGFAX. Retrieved July 30, 2015. Monsanto's patent on the first generation of Roundup Ready products expires in March 2015
- [54] Antonio Regalado (July 30, 2015). "Monsanto no longer controls one of the biggest innovations in the history of agriculture". MIT Technology Review. Retrieved July 30, 2015.
- [55] Jinggong Guo,#1 Kun Li,#1 Lifeng Jin,#2 Rui Xu,#1 Kaiting Miao,1,3 Fengbo Yang,1 Chaoya Qi,2 Lin Zhang,2,4 Jose R. Botella,5 Ran Wang,corresponding author2 and Yuchen Miaocorresponding author1 (2018 May 29) "A simple and cost-effective method for screening of CRISPR/Cas9-induced homozygous/biallelic mutants" Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5972395/>
- [56] Barrangou R (2015). "The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond". *Current Opinion in Immunology*.
- [57] CRISPR-CAS9, TALENS and ZFNs - the battle in gene editing Link za dostop: <https://www.ptglab.com/news/blog/crispr-cas9-talens-and-zfns-the-battle-in-gene-editing/>
- [58] Hsu PD, Lander ES, Zhang F (June 2014). "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering" Link za dostop: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414006047>
- [59] F. J. M. Mojica, C. Díez-Villaseñor, E. Soria, and G. Juez, "Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria," *Molecular Microbiology*, vol. 36, pp. 244-246, 2000.
- [60] Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD (August 1993). "Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of Mycobacterium tuberculosis". *Journal of Clinical Microbiology* Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265684/>
- [61] Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD (December 1993). "Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium

- tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method". *Molecular Microbiology*.
- [62] Mojica FJ, Montoliu L (2016). "On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals". *Trends in Microbiology*
- [63] SANDEEP RAVINDRAN (Mar 1, 2018) "New Methods to Detect CRISPR Off-Target Mutations" Link za dostop: <https://www.the-scientist.com/lab-tools/new-methods-to-detect-crispr-off-target-mutations-30013>
- [64] Mojica FJ, Rodriguez-Valera F (2016). "The discovery of CRISPR in archaea and bacteria". *The FEBS Journal*.
- [65] Charpentier E, Richter H, van der Oost J, White MF (May 2015). "Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity" Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5965381/>
- [66] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G (March 2005). "CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies". *Microbiology* Link za dostop: <https://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27437-0>
- [67] Horvath P, Barrangou R (January 2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea" Link za dostop: <https://science.sciencemag.org/content/327/5962/167>
- [68] Morange M (June 2015). "What history tells us XXXVII. CRISPR-Cas: The discovery of an immune system in prokaryotes". *Journal of Biosciences*. Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963251>
- [69] E. S. Lander, "The Heroes of CRISPR," *Cell*, vol. 164, pp. 18-28, Jan 14 2016.
- [70] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E., A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745249>
- [71] Zhabiz Golkar<sup>1</sup>, Lugenia Rochelle<sup>2</sup> and Omar Bagasra<sup>3</sup> (Mar 28, 2016) "Crisprs/Cas9 May Provide New Method for Drug Discovery and Development" Link za dostop: [https://www.researchgate.net/profile/Zhabiz\\_Golkar/publication/303344270\\_Crispr\\_sCas9\\_May\\_Provide\\_New\\_Method\\_for\\_Drug\\_Discovery\\_and\\_Development/links/573f2f7608ae9f741b32198f/Crisprs-Cas9-May-Provide-New-Method-for-Drug-Discovery-and-Development.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Zhabiz_Golkar/publication/303344270_Crispr_sCas9_May_Provide_New_Method_for_Drug_Discovery_and_Development/links/573f2f7608ae9f741b32198f/Crisprs-Cas9-May-Provide-New-Method-for-Drug-Discovery-and-Development.pdf)
- [72] Y. Ran, Z. Liang, and C. Gao, "Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing," *Science China Life Sciences*, vol. 60, pp. 490-505, May 01 2017.
- [73] L. Bortesi and R. Fischer, "The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond," *Biotechnol Adv*, vol. 33, pp. 41-52, Jan-Feb 2015.

- [74] James, Clive (1996). "Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants: 1986 to 1995" The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Link za dostop: <http://www.isaaa.org/kc/Publications/pdfs/isaaabriefs/Briefs%201.pdf>
- [75] X. Wang, M. Tu, D. Wang, J. Liu, Y. Li, Z. Li, et al., "CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation," *Plant Biotechnol J*, Sep 14 2017.
- [76] Jean-Paul Concordet and Maximilian Haeussler, CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens, 2018 May 14, Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6030908/>
- [77] J. Park, S. Bae, and J.-S. Kim, "Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites," *Bioinformatics*, vol. 31, pp. 4014-4016, 2015. Link za dostop: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/24/4014/198447>
- [78] Yanni Lin, Thomas J. Cradick, Matthew T. Brown, Harshavardhan Deshmukh, Piyush Ranjan, Neha Sarode, Brian M. Wile, Paula M. Vertino, Frank J. Stewart, and Gang Bao, CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences, 2014 May 16, Link za dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066799/>
- [79] CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR/Cas9 tool for genome editing in plants Link za dostop: <http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>
- [80] CRISPOR Manual, Link za dostop: <http://crispor.tefor.net/manual/>
- [81] M. Malnoy, R. Viola, M.-H. Jung, O.-J. Koo, S. Kim, J.-S. Kim, et al., "DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins," *Frontiers in Plant Science*, vol. 7, p. 1904, 12/2009/11/received 12/01/accepted 2016.