

# Nove genomske tehnike za natančno žlahtnjenje rastlin

Sabina BERNE<sup>1, 2</sup>

Received March 03, 2025, accepted March 30, 2025  
Delo je prispelo 3. marec 2025, sprejeto 30. marec 2025

## Nove genomske tehnike za natančno žlahtnjenje rastlin

**Izvleček:** Podnebne spremembe, nove bolezni ter omejeni viri vplivajo na trajnostno pridelavo zadostne količine kakovostne hrane, kar zahteva stalno prilagajanje sort kmetijskih rastlin obstoječim in prihodnjim sistemom pridelave. Sorte kmetijskih rastlin morajo biti v prihodnosti odpornejše na biotske in abiotske dejavnike, prav tako pa morajo prejeeto energijo in hranila učinkoviteje pretvoriti v kakovostne sestavine, pri čemer je veliko prostora za inovacije. Z razvojem rastlinske biotehnologije in genetike, uporabo znanj pridobljenih z visokozmogljivimi omskimi pristopi in naprednimi statističnimi analizami ter z metodami strojnega učenja se je močno pospešilo doseganje specifičnih žlahtniteljskih ciljev, ki lahko pomembno prispevajo k trajnostnemu kmetijstvu in varni preskrbi s hrano. S pregledom znanstvene literature pojasnjemo, kako delujejo nove genomske tehnike, v čem se razlikujejo od splošno sprejetih metod žlahtnjenja in kakšne prednosti imajo v primerjavi s klasičnimi tehnikami žlahtnjenja rastlin. V nadaljevanju obravnavamo, katere rastline in njihove lastnosti so bile spremenjene z novimi tehnikami, kako je oblikovana ustrezna zakonodaja, tudi z vidika gensko spremenjenih organizmov, ter povzemamo zaključke javne razprave o njihovi potrebi in možnih tveganjih.

**Ključne besede:** preurejanje genoma, nove genomske tehnike, NGT, žlahtnjenje rastlin, agronomске lastnosti, GSO, zakonska ureditev

## New genomic techniques for precision plant breeding

**Abstract:** Climate change, new diseases and resource constraints are affecting the sustainable production of sufficient and quality food, requiring the continuous adaptation of plant varieties to existing and future production systems. Crop varieties of the future must be more resilient to biotic and abiotic stresses, and able to convert the energy and nutrients they receive into food more efficiently, presenting significant opportunities for innovation. The development of plant biotechnology and genetics, the application of knowledge gained from high-throughput omics approaches, and advanced statistical analysis and machine learning methods have greatly accelerated the identification of specific breeding targets that can make an important contribution to sustainable agriculture and food security. We review the scientific literature to explain how new genomic techniques work, how they differ from commonly accepted breeding methods and what advantages they have over traditional techniques. We then discuss which plants, and their traits have been modified, the intricacies of relevant legislation, particularly from the perspective of GMOs, and summarise the conclusions drawn from the public debate concerning the necessity and potential risks of these techniques.

**Key words:** genome editing, new genomic techniques, NGT, plant breeding, agronomic traits, GMO, legislation

<sup>1</sup> University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Agronomy Department, Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup> korespondenčni avtor: sabina.berne@bf.uni-lj.si

## 1 OD UDOMAČITVE DO MOLEKULARNEGA ŽLAHTNENJA RASTLIN

Žlahtnjenje rastlin je starodavna dejavnost, ki sovpadajo z začetki kmetijstva okrog 12.000 let pred našim štetjem. Nedavni genetski in arheobotanični dokazi kažejo na obstoj vsaj petih neodvisnih središč udomačitve gojenih rastlin: riža na Kitajskem, žit in stročnic na Bližnjem vzhodu, koruze, fižola in buč v Srednji Ameriki, krompirja in kvinoje v Andih ter koruze, manioke, buč, sladkega krompirja in maranta v jugozahodni Amazoniji (Iriarte in sod., 2020; G. Larson in sod., 2014). Ljudje so na svojih poljih pridelovali rastline in izbirali lastnosti kot so večji plodovi, semena in boljši okus. Semena najboljših rastlin so shranjevali za setev v naslednji rastni sezoni. Takšne poskusne selekcijske metode so bile predhodnice zgodnjih postopkov žlahtnjenja rastlin (Slika 1).

S pojavom Mendelove genetike v 19. stoletju ter boljšim razumevanjem principov dedovanja so se razvili

sistematični pristopi križanja rastlin, ki so vključevali rodovnike in linijsko selekcijo ter se osredotočali na predvidljivo dedovanje lastnosti (Louwaars, 2018; Mittelsten Scheid, 2022). Pomemben mejnik v žlahtnjenju rastlin v začetku 20. stoletja je dosegel George Shull s poskusi križanja linij koruze in opisom pojava heteroze. Ugotovil je, da sta pridelek in vitalnost pri inbridiranih linijah koruze na splošno slabša, medtem ko je pridelek hibridov (njihovih potomcev) pogosto presegal pridelek inbridiranih starševskih linij. Poleg tega so imeli hibridi zelo zaželeno lastnost, bili so uniformni (Crow, 1998). Velik uspeh hibridov koruze na trgu je prispeval k hitremu prenosu tehnologije tudi na druge kmetijske rastline, predvsem tujeprašne poljščine.

Temelj sedanjemu molekularnemu žlahtnjenju rastlin zagotovo predstavlja odkritje strukture DNK (Watson in Crick, 1953), ki je omogočilo pripisovanje genotipa fenotipu ter oblikovanje centralne dogme molekularne biologije. Poleg osnovnih molekularnih tehnologij razvitih v osemdesetih in devetdesetih letih prejšnjega



Slika 1: Zgodovinski mejniki v žlahtnjenju rastlin  
Figure 1: Historical milestones of plant breeding

stoletja, kot so kloniranje, določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje) in tehnologija rekombinantne DNK (Berg in Mertz, 2010; Duffin in Mach, 2022; Shendure in sod., 2017), je bil za sodobno žlahtnjenje rastlin ključen tudi napredek na področju rastlinske biotehnologije, ki je zagotovil gojenje rastlinskih celic in tkiv *in vitro* ter regeneracijo in klonsko razmnoževanje novih rastlin (Thorpe, 2007).

Osnovno načelo žlahtnjenja rastlin je ne glede na vrsto pridelka vedno enako: temelji na genetski raznolikosti, ki je nastala naravno z mutacijami in spolnim razmnoževanjem, ali pa jo je z različnimi metodami ustvaril človek. Hermann J. Muller je prvi opisal inducirane mutacije z rentgenskimi žarki pri vinskih mušicah (Muller, 1928). Njegove ugotovitve je kmalu zatem potrdil Lewis J. Stadler z obsevanjem semen ječmena z rentgenskimi žarki ali obdelavo z radijem (Stadler, 1928). Tretirane rastline so imele recesivne mutacije povezane s klorofilom, ki naj bi bile posledica kromosomske aberacije, ali uničenja gena. Povzročanje mutacij z ionizirajočim sevanjem ali kemijskimi mutageni je še vedno pomembno orodje za žlahtnjenje rastlin, kot tudi za rastlinsko genetiko in funkcijsko genomiko (Jankowicz-Cieslak in sod., 2016; Sikora in sod., 2012). Čeprav so z mutacijskim žlahtnjenjem v zadnjih osemdesetih letih pridobili že več kot 3.000 novih sort (Maluszynski, 2001), se na regulatorni ravni ne razlikuje med rastlinami, ki so nove lastnosti pridobile z mutacijskim žlahtnjenjem in rastlinami, ki so nove lastnosti pridobile s klasičnim žlahtnjenjem s križanji; potrebni niso nobeni postopki presoje tveganja in odobritve pred dajanjem na trg, prav tako zanje ni potrebno posebno označevanje.

Mutacije pogosto ne prinašajo nobenih koristi, vendar se občasno lahko pojavijo nove in dragocene lastnosti. S klasičnim genskim inženiringom je mogoče gene za zelene lastnosti vnesti v genom rastlinskih celic. Naključno vgrajena zaporedja DNK so lahko natančna kopija zaporedij, ki so že prisotna v vrsti, lahko pa izvirajo iz druge vrste. Tako so leta 1983 v celice tobaka prvič vnesli bakterijska gena, ki sta se pod rastlinskim promotorjem funkcionalno izrazila in tobaku zagotovila odpornost na antibiotik kanamicin (Herrera-Estrella in sod., 1983). Produkt klasičnega genskega inženiringa so gensko spremenjeni organizmi (GSO) oziroma gensko spremenjene (GS) rastline ali transgene rastline. Sledili so prvi poljski poskusi s transgenimi rastlinami odpornimi na herbicide leta 1986, medtem ko je bila prva vrsta transgene rastline, ki je prišla na trg leta 1994, paradižnik z upočasnjem zorenjem (Herrera-Estrella in sod., 2005). Po podatkih iz leta 2023 je bilo z GS rastlinami zasajenih 206,3 milijona hektarjev, kar predstavlja 13,4 % celotne svetovne kmetijske površine, pri čemer prevladujejo GS soja, koruza in

bombaž z odpornostjo na herbicide in insekte (X. Cheng in sod., 2024).

Od objave prvega rastlinskega genoma navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) leta 2000 (Kaul in sod., 2000) je bilo javno razkritih več kot 700 genomov zelenih rastlin Viridiplantae (O'Leary in sod., 2024), pri čemer prevladujejo gojene rastline (Marks in sod., 2021). Dostopnost genomskih podatkov za asociacijske raziskave po celotnem genomu (angl. genome-wide association study, GWAS) in analize pangenoma ter razvoj novih tehnik sekvenciranja, kot je na primer genotipizacija s sekvenciranjem (angl. genotyping by sequencing, GBS), so privedli do odkritja velikega števila molekularnih označevalcev (angl. marker) ter lokusov kvantitativnih lastnosti (angl. quantitative trait loci, QTL), ki so povezani z različnimi agronomsko zaželenimi lastnostmi (He in sod., 2014; Nadeem in sod., 2018).

V zadnjem času se v žlahtniteljskih programih, poleg selekcije na podlagi genomov, uporabljajo visoko zmogljivi pristopi fenotipizacije, metabolomike, proteomike in transkriptomike, ki so v kombinaciji z naprednimi statističnimi orodji in metodami strojnega učenja močno pospešili realizacijo specifičnih žlahtniteljskih ciljev (Sun in sod., 2024). Z najnovejšim sklopom orodij za preurejanje genoma (angl. genome editing) je mogoče izvesti usmerjene spremembe na točno določenem mestu v genomu rastlinske vrste in v relativno kratkem času izboljšati izbrane lastnosti (Pixley in sod., 2022). Poleg teh orodij so v nadaljevanju predstavljene posamezne nove genomske tehnike, mehanizmi njihovega delovanja in predlagano zakonsko (ne)urejanje področja v EU.

## 2 KAJ SO NOVE GENOMSKE TEHNIKE?

Nove genomske tehnike (NGT) so po definiciji „tehnik, ki lahko spremenijo genski material organizma in so bile razvite po objavi Direktive EU 2001/18/ES o namernem sproščanju gensko spremenjenih organizmov v okolje“ (Direktiva - 2001/18 - EN - EUR-Lex, b. d.). Z uporabo nekaterih NGT lahko na ravni zaporedja DNK povzročijo komaj zaznavne spremembe v obliki variacij posameznih nukleotidov (zamenjave (substitucije), kratke vstavitve (insercije) ali izbrise (delecije)), s pomočjo drugih pa lahko uvedejo daljše vstavitve ali izbrise odsekov DNK. Te spremembe lahko ustvarijo celični popravljalni mehanizmi DNK, ki so nagnjeni k naključnim napakam, ali pa nastanejo namerno s kopiranjem iz donorske matrice DNK. Le-ta lahko vsebuje i) homologna zaporedja, ki so prisotna pri drugem posamezniku iste vrste (npr. divjem tipu rastline, ki je prednik gojene rastline) ali ii) heterologna zaporedja iz drugih vrst, ki se v naravi ne morejo križati (transgene rastline). Kopira-

na zaporedja se nato mestno specifično integrirajo v genom ciljnega organizma, pri čemer nastane produkt, podoben tistemu, ki ga dobimo s klasičnim genskim inženirstvom. Na ravni zaporedja RNK lahko z NGT uvedemo spremembe, kot so variacije posameznih nukleotidov, modulacije spajanja pre-mRNK in razgradnje RNK, vključno z nekodirajočimi RNK, ki imajo regulatorne učinke na druge gene (Broothaerts in sod., 2021).

NGT vključujejo naslednje štiri skupine tehnik (Slika 2), kot so jih razložili (Broothaerts in sod., 2021):

- tehnike, ki povzročijo dvoverižne prelome DNK, vključno z RNK usmerjanimi nukleazami (kot so na primer Cas9 in Cpf1) povezanimi z gručami enakomerno prekinjenih kratkih palindromskih ponovitev (angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), nukleaze TAL efektorjev (angl. transcription activator-like effector nucleases, TALEN), nukleaze z motivi cinkovih prstov (angl. zinc finger nucleases, ZNF) ter 'prenašalne' endonukleaze (angl. homing nuclease);
- tehnike, ki povzročijo enoverižne prekinitve DNK ali ne vključujejo prekinitve DNK, kot so mutageniza posredovana z oligonukleotidi (angl. oligonucleotide-directed mutagenesis, ODM), urejevalci baz (angl. base editors, BE) ali sistem urejanja z vnosom (prime editing, PE);
- epigenetske tehnike, kot so z RNK usmerjana metilacija DNK (RNA-directed DNA methylation, RdDM) in interferenca CRISPR (CRISPRi);
- tehnike, ki preurejajo RNK.

Kot je razvidno iz Slike 2, lahko načrtno povzročimo specifične spremembe, ki so usmerjene v točno določeno regijo v genomu, vplivamo na epigenom ali na RNK, zato imajo NGT velik potencial v žlahtnjenju rastlin. Rezultati NGT so tudi bolj predvidljivi, čeprav obstaja majhna verjetnost za uvedbo nenačrtovane

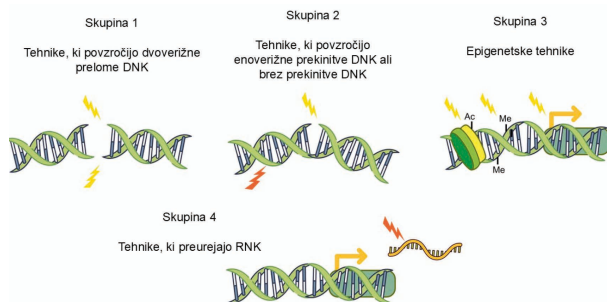
spremembe drugod v genomu (angl. 'off-target' effect) (Anderson in sod., 2015).

Določene NGT so bile razvite, da se odpravi tveganja (npr. nevarnost za okolje in vpliv na zdravje), ki omejujejo uporabo transgenih rastlin. Cisgeneza tako vključuje gensko spreminjanje z uporabo popolne kopije naravnih genov, vključno z izvornimi regulatornimi zaporedji, ki pripadajo spolno združljivim vrstam, medtem ko se intrageneza nanaša na prenos edinstvenih kombinacij genov in regulatornih zaporedij znotraj iste vrste (Vasudevan in sod., 2023).

### 3 DOSTAVNI SISTEMI ZA VNOS MOLEKULARNIH ORODIJ NGT

Najpogosteje uporabljena metoda za vnos in stabilno integracijo transgenov v rastline je transformacija posredovana z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) (Altpeter in sod., 2016). Drug način vnosa genov je obstreljevanje s tako imenovano 'gensko pištolo', pri čemer je DNK vezana na kovinske delce, ki se v celice izstrelijo z veliko hitrostjo. Čeprav na ta način lahko transformiramo širši nabor genotipov kot z ATMT, je velika pomanjkljivost te metode slabša regeneracija rastlin, kot tudi majhno število kopij in integracija na številna mesta v genomu (Wu in sod., 2015). Neposreden vnos rekombinantne DNK iz gojišča v protoplaste, s pomočjo elektroporacije, polietilenglikola (PEG) ali lipofekcije se zaradi zahtevne priprave protoplastov in njihove regeneracije uporablja le pri določenih rastlinah (Altpeter in sod., 2016). Virusni vektorji pripravljene iz geminivirusov (krožnih enoverižnih DNK virusov s širokim naborom rastlinskih gostiteljev) imajo številne prednosti pri vnosu tuje DNK ali RNK v rastline: preprosta manipulacija, veliko število kopij na celico, sistemsko širjenje po rastlini in učinkovita ekspresija genov (Cody in Scholthof, 2019). Omejitve te tehnike so majhen genom virusov, prehodna ekspresija genov, sprememba se ne deduje, stranski učinki na gostitelja ter možnost prenosa na druge rastline. Trenutno je v ospredju razvoj naprednih dostavnih sistemov iz nanomaterialov, kot so karbonske nanocevke, polporozni silikatni nanodelci, nanokompoziti iz glin (angl. clay nanosheets), celice penetrirajoči peptidi (angl. cell penetrating peptides, CPP), nanostrukture DNK in kvantne točke (Demirer in sod., 2021; Li in sod., 2024). Poleg ciljne dostave, nadzorovanega izražanja in zaščite pred razgradnjo, nekateri nanodelci na podlagi fluorescence omogočajo sledenje dedni spremembi in izražanja v rastlini.

Na podlagi integrirane transgene DNK se v tarčnih celicah izrazijo aktivne komponente za NGT, ki povzročijo spremenjeno zaporedje DNK, epigenomski učinek



Slika 2: Delitev novih genomskih tehnik  
Figure 2: Classification of new genomic techniques

**Preglednica 1:** Primerjava novih genomskih tehnik (NGT) in uveljavljenih žlahtniteljskih metod  
**Table 1:** Comparison of new (NGT) genomic techniques and conventional breeding methods

Kriterij*	Klasično žlahtnjenje	Mutacijsko žlahtnjenje	Genski inženiring	Nove genomske tehnike
Način uvedbe genske spremembe	Križanje starševskih linij	Ionizirajoče sevanje ali mutagene kemikalije	Tehnologija rekombinantne DNK	Preurejanje genoma
Število genskih sprememb	Nekaj genov do celoten genom	Nekaj 100 do nekaj 1000	1-8	1 ali več
Rezultat žlahtnjenja	Zaželene spremembe genoma skupaj z drugim haploidnim genomom	Naključne spremembe genoma	Naključna integracija transgena	Načrtne mestno specifične spremembe
Povratno križanje	5-7 generacij	Več generacij	Ni potrebno	Ni potrebno
Na trgu	8-10 let	8-10 let	8-12 let	2-5 let
Uredba	Varnostno testiranje ni zahtevano	Varnostno testiranje ni zahtevano	Potrebno varnostno testiranje, močno regulirano	Potrebno varnostno testiranje, mešana regulacija

\*Povzeto po (Chen in sod., 2019; Gao, 2021)

ali učinek na ravni RNK. Po opravljeni modifikaciji se ta integriran sistem lahko odstrani s križanjem v naslednji generaciji rastlin, ali z uporabo mestno specifične rekombinacije, kot je na primer sistem Cre-LoxP (Broothaerts in sod., 2021).

Alternativa integraciji transgenov je spreminjanje genoma ob prehodni ekspresiji aktivnih komponent za NGT (proteinov in/ ali RNK) iz rekombinantnih plazmidnih ali virusnih vektorjev, ki se po določenem času razgradijo z endogeno nukleazno aktivnostjo (Veillet in sod., 2019). Poleg tega so opisani tudi pristopi NGT, kjer se z biolistiko ali s transformacijo protoplastov s PEG v rastlinske celice vnesejo zgolj proteini, ribonukleoproteinski delci ali mRNK (Broothaerts in sod., 2021).

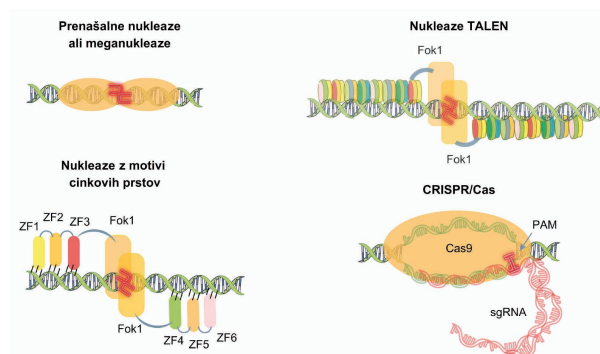
## 4 MOLEKULARNI MEHANIZMI UREJANJA GENOMA

### 4.1 SKUPINA 1 – NGT, KI POVZROČIJO DVOVERIŽNE PRELOME DNK

Nastanek dvoverižnih prelomov DNK je naravni fenomen, ki nastane pri podvojevanju DNK, rekombinaciji DNK, transpoziciji DNK, po delovanju produktov metabolizma (reaktivne kisikove zvrsti) ali eksogenih dejavnikov (UV, ionizirajoče sevanje, kemijski mutageni) (Meheta in Haber, 2014). Prelomi DNK so nevarni, saj lahko vodijo v celično smrt, če jih popravljalni mehanizmi ne odpravijo dovolj hitro.

Preurejanje genomov pri tej skupini tehnik poteka

v dveh korakih in sicer se začne s prepoznavo tarčnega zaporedja in vezavo endonukleaze, ki povzroči dvoverižni prelom DNK, ter nadaljuje s popravilom preloma DNK s celičnimi popravljalnimi mehanizmi. Prva generacija nukleaz, ki se je uporabljala za mestno specifično preurejanje genomov, je temeljila na prepoznavi DNK po interakciji s proteini, kot so nukleaze TAL efektorjev (angl. transcription activator-like effector nucleases, TALEN), nukleaze z motivi cinkovih prstov (angl. zinc finger nucleases, ZNF) ter ‚prenašalne‘ endonukleaze (angl. homing endonuclease ali tudi meganuclease) (Slika 3). Nova generacija nukleaz, kot so sistemi CRISPR/Cas, pa tarčna mesta DNK prepozna po interakciji z RNK (Broothaerts in sod., 2021).



**Slika 3:** Splošen mehanizem delovanja različnih tipov mestno specifičnih nukleaz

**Figure 3:** General mode of action of different types of site-directed nucleases

#### 4.1.1 'Prenašalne' endonukleaze

V naravi zapise za ‚prenašalne‘ endonukleaze najdemo ali v intronih ali v inteinih (Marcaida in sod., 2009). Funkcija ‚prenašalnih‘ endonukleaz je iniciacija rekombinacije z uvedbo dvoveržnih prelomov DNK, ki so asimetrični. Za razliko od običajnih restriksijskih encimov so njihova prepoznavna mesta zelo dolga (12-40 bp) in izjemno redka. Poleg tega pri prepoznavi tarčnega zaporedja lahko tolerirajo manjše spremembe zaporedja nukleotidov.

Za preurejanje genomov so te encime priredili z mutagenozo in presejalnim testiranjem, da so domeno za prepoznavo DNK ločili od katalitičnega mesta in s kombiniranjem različnih ‚prenašalnih‘ nukleaz razširili nabor vezavnih mest (Arnould in sod., 2011). Ker je inženiring teh encimov neučinkovit, časovno potraten in zahteven, se jih danes le redko uporablja za preurejanje genomov.

#### 4.1.2 Nukleaze z motivi cinkovih prstov (ZFN)

ZFN so hibridni encimi, ki so jih ustvarili z združenjem endonukleaze, kot je bakterijski encim FokI, in proteinov s cinkovimi prsti, ki prepoznajo in se vežejo na različna zaporedja DNK (Osakabe in Osakabe, 2015). V domeni za vezavo DNK najdemo 3-4 cinkove prste, pri čemer je vsak sestavljen iz tripleta baz. Nukleazna domena FokI za cepitev DNK potrebuje dimerizacijo, zato se morata dve ZFN vezati na nasprotni verigi DNK. To pomeni, da je prepoznavno zaporedje dolgo 18 bp, kar je dovolj za določitev edinstvenega tarčnega mesta znotraj genoma.

Omejitev ZFN, kot so zahteven inženiring tarčnih mest, aktivnost ter občasna citotoksičnost (verjetno povezana z nenačrtovanim delovanjem na drugih tarčnih mestih), so prispevale k manjši uporabi ZFN za preurejanje genomov rastlin (Broothaerts in sod., 2021).

#### 4.1.3 Nukleaze TAL efektorjev (TALEN)

Efektorji TAL so transkripcijski aktivatorji, ki so jih odkrili pri bakterijah rodu *Xanthomonas* (Mak in sod., 2012). Ko so jih po vzoru ZFN načrtno združili z endonukleazami, kot je encim FokI, so ustvarili mestno specifične nukleaze TALEN (Becker in Boch, 2021). Domena za vezavo na DNK je sestavljena iz motivov tandemskega ponovitev 33-35 aminokisljin. Vsak motiv prepozna posamezno bazo v zaporedju DNK, pri čemer sta pomembni predvsem aminokisljini v motivu na mestih 12 in 13. Motive lahko med seboj poljubno kombiniramo, da zagotovimo bolj specifično prepoznavo tarčnih mest. Tako kot pri ZFN je tudi pri TALEN za cepitev DNK potrebna vezava nukleaze na nasprotnih verigah DNK in dimerizacija. Inženiring domene za vezavo DNK zahteva veliko

truda in nekaj poskusnega testiranja, poleg tega je sama velikost konstruktov omejitev za številne dostavne sisteme (Broothaerts in sod., 2021).

#### 4.1.4 Sistem CRISPR-Cas

Sistem CRISPR-Cas je vsestransko in najpogosteje uporabljeno orodje za preurejanje genoma. Tehnologija izvira iz prokariotskega imunkega sistema tipa II, ki je prilagodljiv obrambni sistem odvisen od RNK, ki bakterije in arheje štiti pred fagnimi okužbami ter drugimi invazivnimi genskimi elementi (Barrangou in sod., 2007). Lokusi CRISPR-Cas vsebujejo nekaj sto kratkih odsekov DNK (30-40 bp), ostankov predhodnih okužb, tako imenovanih protovmesnikov, ki so ločeni s ponovitvami dolgimi 25-35 bp. Ti protovmesniki se prepisujejo v CRISPR RNK (crRNA) in povežejo v kompleks s trans-aktivno CRISPR RNK (tracrRNA), na katerega se veže nukleaza Cas. Nastane aktiven ribonukleoproteinski kompleks, ki je namenjen razgradnji tujih nukleinskih kislin.

Z inženiringom so združili crRNK in tracrRNK v usmerjevalno RNK (angl. single-guide RNA, sgRNA) ter obdržali ključne lastnosti: 20 nukleotidov dolgo zaporedje na 5' koncu sgRNK, ki se veže na komplementarna mesta tarčne DNK, ter dvoveržno strukturo na 3' koncu, kamor se veže Cas (Jinek in sod., 2012). Tako je nastal preprost dvokomponentni sistem, v katerem lahko s spremembami 20 nukleotidov v sgRNK programiramo sistem CRISPR-Cas, da se usmeri na katerokoli zaporedje DKA, če le meji na PAM (angl. protospacer adjacent motif), 2-6 nukleotidov dolgo zaporedje takoj za tarčnim mestom. V primeru najpogosteje uporabljane nukleaze Cas9 iz bakterije *Streptococcus pyogenes* Rosenbach 1884 je to zaporedje 5'-NGG-3', pri čemer je prvi nukleotid poljuben, sledita pa mu dva zaporedna gvaninska nukleotida (Doudna in Charpentier, 2014). Od leta 2012 so odkrili številne ortologe Cas9 in jih razdelili v dva razreda ter 6 tipov glede na število podenot in njihovo arhitekturo (Makarova in sod., 2019). Sistemi CRISPR-Cas razreda 1 imajo efektorske module, sestavljene iz več proteinov Cas, ki tvorijo kompleks za vezavo crRNK in delujejo skupaj pri vezavi in procesiranju tarče. Sistemi razreda 2 imajo en sam večdomenski protein, ki veže crRNK in je funkcionalno podoben celotnemu efektor-skemu kompleksu razreda 1.

Tehnologija CRISPR-Cas se še naprej razvija, vključno z izboljšavami ter novimi načini uporabe. Posebna pozornost je namenjena zmanjševanju vplivov na nenačrtovana tarčna mesta, predvsem z natančnim izborom tarčnih mest in načrtovanjem sgRNK, zmanjšanjem izražanja Cas9 z uporabo šibkih promotorjev, uvedbo Cas-mRNK ali ribonukleoproteinskih kompleksov namesto DNK vektorjev ter uporabo delno ali popolnoma

inaktivne različice Cas (nikaze ali dCas) (Broothaerts in sod., 2021).

#### 4.1.5 Popravilo dvoverižnega preloma DNK

Drug korak pri urejanju genoma je popravilo dvoverižnih prelomov DNK. V evkariontskih celicah obstajata dva mehanizma: povezovanje nehomolognih koncev (angl. non-homologous end joining, NHEJ) in popravljanje na podlagi homologije (angl. homology-directed repair, HDR) (Osakabe in Osakabe, 2015). Popravilo z NHEJ je pogostejše in se običajno zgodi že po nekaj minutah po prelomu DNK z neposrednim zlepljanjem koncev DNK, pri katerem sodeluje kopica proteinov. Postopek NHEJ je podvržen napakam, predvsem nastanku majhnih insercij in delecij (indel), kar vodi do mutacij (zamikov bralnih okvirjev in nesmiselnih mutacij). Če so mesta preloma DNK blizu skupaj, lahko nastanejo delecije, inverzije ali duplikacije. S sistemom CRISPR-Cas lahko ustvarimo tudi daljše delecije, če uporabimo dve sgRNK, ki ciljata zaporedji okrog regije, ki jo želimo izbrisati. Tako lahko določen gen v celoti izbijemo. Mehanizem popravila s HDR je počasnejši, a natančen, in poleg številnih encimov zahteva določeno mero homologije z donorsko matrico, ki je lahko endogenega ali eksogenega izvora. V takem primeru lahko s CRISPR-Cas popravimo okvarjen gen ali ga zamenjamo. Poleg tega je možno multipleksiranje, oziroma ciljanje več genov hkrati (Broothaerts in sod., 2021).

## 4.2 SKUPINA 2 – NGT, KI POVZROČIJO ENOVERIŽNE PREKINITVE DNK ALI BREZ PREKINITVE DNK

Popravilo dvoverižnih prelomov DNK s celičnimi popravljivimi mehanizmi, ki so podvrženi napakam, je težko nadzorovati in ima lahko neželene posledice. Zato so z mutagenezo mestno specifičnih nukleaz razvili manj škodljive encime za preurejanje genoma, tako imenovane nikaze (nCas), ki imajo inaktivirano eno katalitično domeno ter povzročijo enoverižne prekinitve DNK, ki se v celicah običajno popravijo na zelo zanesljiv način s popravljanjem z izrezom baze (angl. base excision repair) (Komor in sod., 2016).

### 4.2.1 Tarčna mutageneza z oligonukleotidi

Ta tehnika je bila razvita že v osemdesetih letih prejšnjega stoletja za spreminjanje kratkih zaporedij (nekaj baznih parov) v genomih bakterij in kvasovk, kasneje pa so jo izkoristili tudi za rastline in živali (Sauer in sod., 2016). Temelji na uporabi homolognih kratkih enoverižnih oligonukleotidov DNK, himernih RNK/DNK

oligonukleotidov, ali dvoverižnih DNK molekul, ki se s tarčnim zaporedjem ne ujemajo na enem ali več mestih. Preurejanje genoma se začne s prileganjem oligonukleotida na tarčno zaporedje po principu komplementarnega parjenja baz. Zaradi neujemanja baznih parov, se aktivirajo celični popravljalni mehanizmi, ki vključujejo neposredno popravilo neujemanja (angl. mismatch repair), ali vključitev v verigo v prisotnosti ali odsotnosti aktivnosti povezane z replikacijo DNK (Broothaerts in sod., 2021).

### 4.2.2 Urejevalci baz

Urejanje baz (angl. base editing, BE) je novejši pristop k preurejanju genoma, ki omogoča uvedbo točkovnih mutacij brez prekinitve dvoverižne DNK. Urejevalci baz so sestavljeni iz katalitično neaktivne dCas (angl. dead Cas), ki je spojena s citozin ali adenin deaminazno domeno (Gaudelli in sod., 2017; Komor in sod., 2016). Urejevalca baze na tarčno mesto vodi usmerjevalna sgRNK. Ob vezavi nastane tako imenovana „R“ zanka, ki vsebuje kratek enoverižen odsek DNK, na katerega deluje deaminaza, ki odstrani amino skupino iz citozina (angl. cytosine base editor, CBE). Nastane uracil, ki ga polimeraze DNK prepoznajo kot timin. V celicah je prisoten tudi encim uracil DNK glikozilaza, ki lahko par U:G zamenja nazaj v par C:G (Komor in sod., 2016). Zato so za povečanje učinkovitosti urejevalcem CBE na C-terminalni del dodali dve domeni inhibitorja uracil DNK glikozilaze. V primeru ABE (angl. adenine base editor) z deaminacijo adenina nastane inozin, ki ga polimeraze DNK prepoznajo kot gvanin. Z uporabo različic Cas, deaminaz in povezovalnih molekul so razvili urejevalce baz naslednje generacije, ki imajo boljšo učinkovitost in specifičnost uvedenih sprememb (Anzalone in sod., 2020).

### 4.2.3 Sistem urejanja z vnosom

Urejanje z vnosom (angl. prime editing, PE) je vsestranska in natančna metoda urejanja genoma, ki neposredno zapisuje novo genetsko informacijo na točno določeno mesto DNK. Pri tem uporablja nikazo (nCas) spojeno z reverzno transkriptazo ter pegRNK, ki vodi sistem PE do tarčnega mesta in nosi genetsko informacijo za želeno preurejanje (Anzalone in sod., 2019). Kjer pegRNK prepozna tarčno zaporedje DNK, nikaza uvede enoverižno prekinitvev DNK s prostim 3' koncem, ki služi reverzni transkriptazi kot začetnik za prepisovanje informacije iz pegRNK v DNK. Nastane razvejan intermedijat DNK, ki ga popravijo celični popravljalni mehanizmi tako, da odstranijo nespremenjeno (staro) zaporedje DNK, ki štrli na 5' koncu.

Urejanje z vnosom omogoča uvedbo substitucij posameznih nukleotidov, insercij in delecij do 100 baznih parov. Pomembna prednost te tehnike je, da ob urejanju

ne nastanejo neželeni indeli, omejitev pa je vnos v celice zaradi same velikosti sistema (Broothaerts in sod., 2021).

#### 4.3 SKUPINA 3 - NGT, KI TEMELJIJO NA SPREMINJANJU EPIGENOMA

Epigenom je skupek dednih modifikacij kromatina, ki uravnavajo izražanje genov v diferenciranih celicah brez spreminjanja nukleotidnega zaporedja v DNK. Epigenetske modifikacije so lahko neposredne, kot na primer vezava metilnih skupin na DNK ter vezava metilnih ali acetilnih skupin na lizin v histonih, ali posredne, ki vplivajo na regulacijo transkripcije z aktivatorji ali represorji (McCutcheon in sod., 2024).

##### 4.3.1 Neposredne modifikacije kromatina

Metilacija DNK poteka z encimi DNK metiltransferazami, ki uvedejo metilno skupino na mesto C5 v citozinu. Pri rastlinah je večina citozinov v odsekih CpG, CpHpG ali CpHpH (pri čemer je H lahko A, C ali T), ki so del promotorskih regij ali zaporedij DNK, ki se aktivno prepisujejo, nemetiliranih (Gallego-Bartolomé, 2020). Medtem ko je metilacija teh mest povezana s kondenzacijo kromatina in represijo transkripcije. Poleg citozina lahko metilno skupino v nekaterih primerih najdemo tudi na adeninu na mestu N6.

Za uvedbo metilne skupine na tarčno mesto v DKA so katalitično domeno metiltransferaze spojili z mestno specifičnim proteinom za vezavo na DNK (npr. proteini s cinkovimi prsti, efektorji TAL, dCas). Za odstranitev metilne skupine iz tarčne DNK, pa so proteine za vezavo na DNK spojili z demetilazo (Kungulovski in Jeltsch, 2016).

Najpogostejši modifikaciji histonov pri rastlinah sta metilacija histona H3 na mestu lizina 4 ali 27 ter acetilacija histona H3 na mestu lizina 27. Metilacija histonov pri rastlinah je povezana s številnimi razvojnimi procesi (K. Cheng in sod., 2020), medtem ko je acetilacija histonov povezana s prilagajanjem rastlin na abiotični stres (Wang in sod., 2024).

Zaenkrat so mestno specifični modifikatorji kromatina slabše raziskani in v uporabi zgolj pri modelnih rastlinah (Ueda in Seki, 2020).

##### 4.3.2 Posredne epigenetske modifikacije

S številnimi transkripcijskimi faktorji, ki delujejo kot aktivatorji ali represorji lahko uravnavamo prepisovanje genov. Katalitično neaktivna nukleaza dCas se lahko specifično veže na mesta pred promotorjem ter onemogoči vezavo polimeraze RNK ali transkripcijskih faktorjev na promotor. S tem inhibira izražanje določenega gena brez spreminjanja genoma. To strategijo urav-

navanja izražanja genov so poimenovali CRISPR interferenca (CRISPRi) (M. H. Larson in sod., 2013).

S kombinacijo usmerjevalne sgRNK, katalitično neaktivne dCas in efektorskih domen, ki lahko delujejo kot represorji (CRISPRi) ali aktivatorji (CRISPRa) izražanja genov, so dosegli tarčne spremembe kromatinskih oznak na izbranih mestih v genomu (Kungulovski in Jeltsch, 2016). Transkripcijski aktivatorji delujejo tako, da privabijo modulatorje kromatina, ki povzročijo dekonenzacijo kromatina, kopičenje histonskih oznak (npr. acetilacija histona H3 na mestu lizina 27 ali trimetilacija histona H3 na mestu lizina 4) ter vezavo polimeraze RNK II, da se začne prepisovanje mRNK. Transkripcijski represorji delujejo tako, da vežejo inhibitorne transkripcijske faktorje ali encime za modifikacijo histonov (npr. histonske metiltransferaze, ki povečajo trimetilacijo histona H3 na mestu lizina 9), kar povzroči lokalno kondenzacijo kromatina (Pei in sod., 2020).

#### 4.4 SKUPINA 4 - NGT, KI PREUREJAJO RNK

##### 4.4.1 Od PAM neodvisna RNK-interferenca posredovana s CRISPR-Cas

Čeprav so v zadnjih letih razvili številna orodja CRISPR, ki ciljajo in cepijo RNK, se pri rastlinah uporabljata zgolj CRISPR-Cas13a in CRISPR-Cas13d (Broothaerts in sod., 2021). Cas13a potrebuje CRISPR-RNK (crRNA) s sekundarno strukturo RNK v obliki lasnične zanke ter vmesnikom dolžine 22-28 nukleotidov za prepoznavo tarčne RNK (Abudayyeh in sod., 2017). Cepitev tarčne RNK je izven mesta vezave crRNK, pri tem pa imajo različne variante Cas13a različne preference za cepitev za določenimi nukleotidi.

Cas13d je najmanjša in za preurejanje RNK najučinkovitejša ribonukleaza iz družine Cas13 (Zhang in sod., 2018). Tudi Cas13d je sestavljena iz dveh režnjev, prvi (angl. recognition, REC) je namenjen prepoznavi in vezavi crRNK, drugi (angl. nuclease, NUC) pa cepitvi RNK. Kompleks Cas13-crRNK je katalitično neaktiven, dokler ne veže tarčne enoverižne RNK (Gupta in sod., 2022). Poleg majhnosti je prednost tega sistema tudi to, da ne potrebuje motiva ob protovmesniku ter da ni opisanih neželenih učinkov izven tarčne RNK ali toksičnosti. Pri rastlinah se na primer uporablja za razvoj odpornosti proti RNK virusom (Zhan in sod., 2023).

## 5 Z NGT SPREMENJENE LASTNOSTI RAS-

## TLIN IN NJIHOVA UPORABA

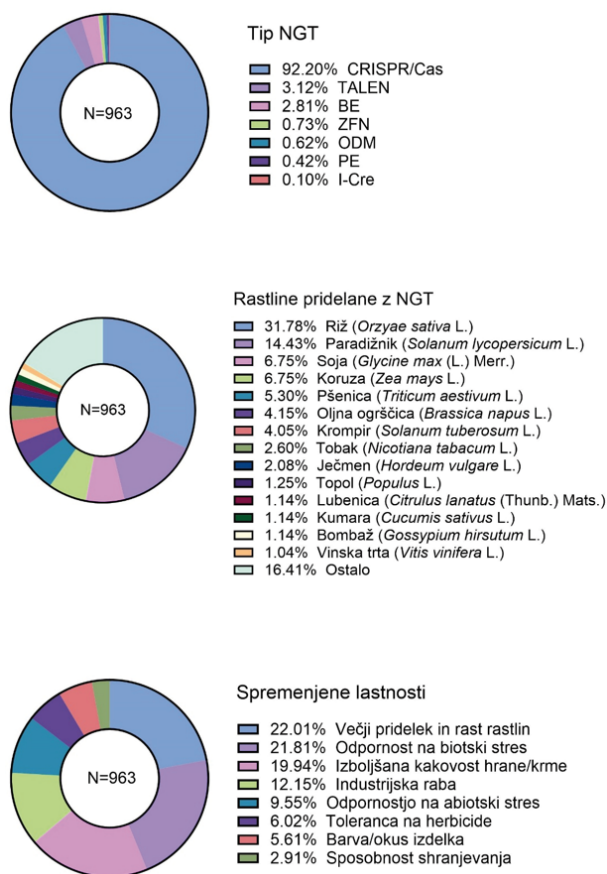
EU-SAGE je mreža znanstvenikov iz 134 evropskih inštitutov in društev povezanih z rastlinami, ki so združili moči, da bi zagotovili ustrezne informacije o preurejanju genomov rastlin ter spodbujali razvoj evropskih politik in politik držav članic EU, ki omogočajo uporabo NGT za trajnostno kmetijstvo in pridelavo hrane (Dima in sod., 2020). Objavili so prosto dostopno interaktivno podatkovno zbirko o genomsko preurejenih rastlinah (Dima in sod., 2022).

Glede na razdelitev NGT v štiri skupine (slika 2 in (Broothaerts in sod., 2021)), pri preurejanju genomov rastlin prevladujejo NGT iz skupine 1 in 2. Ker je preurejanje genomov s sistemom CRISPR-Cas poce-

ni, hitro in učinkovito, je tudi daleč najpogostejše in v uporabi pri kar 92 % rastlin (Slika 4, zgoraj). S približno 3 % ji sledita tehniki TALEN in BE. Epigenetske tehnike (skupina 3) in tehnike za preurejanje RNK (skupina 4) so bile do sedaj uporabljene le v začetnih fazah raziskav in razvoja (za dokazovanje koncepta) (Parisi in Rodriguez, 2021).

NGT so bile uporabljene za preurejanje genomov pri 72 različnih rastlinskih vrstah (<https://www.eu-sage.eu/genome-search>, Februar 2025). Največ raziskav in razvoja NGT je bilo narejenih na rižu (*Oryza sativa* L.), paradižniku (*Solanum lycopersicum* L.), koruzi (*Zea mays* L.), soji (*Glycine max* (L.) Merr.) in pšenici (*Triticum aestivum* L.) (Slika 4, sredina). Izboljšave z NGT so uvedli tudi pri manj pomembnih poljščinah, sadju in širokem spektru zelenjadnic, kot tudi pri industrijsko pomembnih in okrasnih rastlinah (Parisi in Rodriguez, 2021). Večino rastlin s preurejenim genomom so požlahtnili na Kitajskem in v ZDA, čeprav tovrstne raziskave potekajo po vsem svetu (Dima in sod., 2022). V Evropi največ primerov uporabe NGT pri rastlinah prihaja iz Nemčije in Francije.

Leta 2021 je bilo za poljske poskuse odobrenih 117 primerov rastlin s preurejenim genomom, ki se lahko pojavijo na trgu do leta 2030 ter 292 primerov v zgodnji fazi razvoja (za dokazovanje koncepta) (Parisi in Rodriguez, 2021). Spekter uporabe NGT glede lastnosti in vrste rastline je zelo raznolik (Slika 4, spodaj). Najpogosteje so bile izboljšane: (i) agronomске pomembne lastnosti (22 %), kot so večji pridelek (boljša fotosintetska aktivnost, več cvetov, semen, plodov in/ali večja masa) in rast rastlin (izboljšana oblika - habitus, rastni vzorec), da se poveča produktivnost in izogne izgubam pred spravilom pridelka; (ii) odpornost na bolezni in škodljivce (22 %), da se zmanjša potreba po uporabi fitofarmaceutskih sredstev; (iii) kakovost rastlin za pridelavo hrane in krme (20 %) (na primer vsebnost vitaminov, toksičnih snovi, škroba, olja, proteinov, vlaknin, alergenov); (iv) ter lastnosti povezane z industrijsko rabo (12 %) (proizvodnja biogoriv, učinkovitejša raba dušika) (Dima in sod., 2022) Poleg tega se NGT uporabljajo tudi kot orodje za žlahtnjenje in sicer za spreminjanje reproduktivnih lastnosti (sterilnost, samoinkompatibilnost, apomiksis), zgodnejše cvetenje, povečanje ali zmanjšanje genetske rekombinacije, indukcijo haploidov in podvojenih haploidov (Parisi in Rodriguez, 2021). V preglednici 2 je seznam rastlin s preurejenim genomom, ki so že na trgu ali so prejele vse potrebne odobritve, vendar še niso na voljo potrošnikom, saj strategija trženja takih rastlin še ni izdelana (Polidoros in sod., 2024).



Slika 4: Podatkovna zbirka rastlin s preurejenim genomom EU-SAGE (Dima in sod., 2022), spremenjene lastnosti in uporabljene NGT

Podatki pridobljeni na: <https://www.eu-sage.eu/genome-search> (Februar 2025)

Figure 4: EU-SAGE Database of genome-edited crop plants (Dima in sod., 2022), modified traits and NGT used

Data retrieved from: <https://www.eu-sage.eu/genome-search> (February 2025)

**Preglednica 2:** Seznam rastlin s preurejenim genomom odobrenih za prodajoPodatki pridobljeni na: <https://crispr-gene-editing-regs-tracker.geneticliteracyproject.org/united-states-crops-food> (Februar 2025)**Table 2:** The list of genome-edited crops approved for saleData retrieved from: <https://crispr-gene-editing-regs-tracker.geneticliteracyproject.org/united-states-crops-food> (February 2025)

Lastnost	Opis (NGT)	Država (leto)	Podjetje
Voščena koruza	Koruza z veliko vsebnostjo škroba (CRISPR)	Japonska (2024)	Corteva Agriscience
Solata, ki ne porjavi	'GreenVenus', romanska solata, ki ne porjavi	ZDA (2024)	Intrexon
Pšenica odporna na glive	Pšenica odporna na pepelasto plesen ( <i>Blumeria gramininis</i> Speer.)	Kitajska (2024)	Suzhou, Chinese Academy of Sciences
Zelena gorčica	'Conscious Greens', blažja in manj grenka zelena gorčica (CRISPR-Cas12a)	ZDA (2023) dostopno na trgu	Pairwise
Banana, ki ne porjavi	Banana z upočasnjenim rjavenjem za podaljšanje roka uporabnosti (CRISPR)	Filipini (2023)	Tropic Biosciences
GABA paradižnik	'Sicilian Rouge', paradižnik z večjo vsebnostjo GABA, znižuje krvni tlak (CRISPR)	Japonska (2021) dostopno na trgu	Sanantech Seed
Sojino olje z visoko vsebnostjo oleina	'Calyno', Sojino olje z manj nasičenimi maščobami in brez trans maščob (TALEN)	ZDA (2019) dostopno na trgu	Calyxt
Jabolka, ki ne porjavijo	'ArticApple', jabolka, ki ne porjavijo (sorte Golden, Granny, Fuji, Gala, Honey) (RNKi)	Kanada (2017) dostopno na trgu ZDA (2015) dostopno na trgu	Okanagan Speciality Fruits
Krompir, ki ne porjavi	'White Russet Potato', krompir, ki ne porjavi, odporen na plesni, z manj sladkorji in akrilamida (RNKi)	ZDA (2015) dostopno na trgu Kanada (2015) dostopno na trgu	Simplot
Oljna ogrščica	Oljna ogrščica odporna na herbicide (ODM)	ZDA (2014) Kanada (2013)	Cibus

## 6 ZAKONODAJNA UREDITEV Z NGT PRIDELANIH RASTLIN IN NJIHOVIH PRODUKTOV V EU

Evropska unija ima vzpostavljen strog pravni okvir, ki zagotavlja, da razvoj moderne biotehnologije in zlasti GSO poteka pod varnimi pogoji. Namenjen je: (i) zaščiti zdravja ljudi in živali ter okolja z uvedbo ocene varnosti po najvišjih možnih standardih na ravni EU, preden se kateri koli GSO da na trg; (ii) uvedbi usklajenih postopkov za oceno tveganja in odobritev GSO, ki bodo učinkoviti, časovno omejeni in pregledni; (iii) zagotavljanju jasnega označevanja GSO, ki se dajejo na trg, da bi potrošnikom in strokovnjakom (npr. kmetom in upravljavcem prehranske verige) omogočili ozaveščeno izbiro; ter (iv) zagotavljanju sledljivost GSO, danih na trg. Trenutno veljavni pravni akti o GSO, ki uresničujejo te cilje so: (i) Direktiva EU o namernem sproščanju gensko spremenjenih organizmov v okolje (Directive 2001/18/EC); (ii)

Uredba EU o gensko spremenjenih živilih in krmi (Regulation (EC) 1829/2003); (iii) Direktiva EU o spremembi Direktive 2001/18/ES glede možnosti držav članic, da omejijo ali prepovejo gojenje gensko spremenjenih organizmov (GSO) na svojem ozemlju (Directive (EU) 2015/412); (iv) Uredba EU o sledljivosti in označevanju gensko spremenjenih organizmov ter sledljivosti živil in krme, proizvedenih iz gensko spremenjenih organizmov (Regulation (EC) 1830/2003); (v) Direktiva EU o uporabi gensko spremenjenih mikroorganizmov v zaprtih sistemih (prenovitev) (Directive 2009/41/EC); ter (vi) Zakon o gensko spremenjenih organizmih in dajanju izdelkov na trg, ki ureja področje GSO v Sloveniji (in implementira Direktivo 2001/18).

Po Direktivi 2001/18/EC (Direktiva - 2001/18 - EN - EUR-Lex, b. d.) je GSO definiran kot "organizem, razen človeka, pri katerem je bil genski material spremenjen na način, ki ne nastane naravno s križanjem in/ali naravno rekombinacijo". Ali se rastline pridelane z NGT obrav-

navajo kot GSO, je odvisno od interpretacije te definicije (Katsarova, 2024). Pri običajni razlagi te opredelitve kot procesa, torej zadostuje že sama uporaba tehnike genskega spreminjanja, da se dobljeni organizem šteje za GSO. Pri razlagi, ki temelji na produktu, pa mora nastali organizem vsebovati novo kombinacijo genskega materiala, da se šteje za GSO. Tretja možna razlaga združuje obe merili. V aneksih te direktive so opredeljene tehnike, ki povzročijo genske spremembe (Aneks IA, 1. del), tehnike, za katere se ne šteje, da lahko povzročijo genske spremembe (Aneks IA, 2. del) ter tehnike, ki povzročijo genske spremembe, vendar je nastali organizem izključen iz te direktive (Člen 3 in Aneks IB). Taki tehniki sta mutagenaza in celična fuzija. Poleg tega je v direktivi zapisano (preambula 17), da se direktiva ne bi smela uporabljati za organizme, pridobljene z nekaterimi tehnikami genskega spreminjanja, ki se običajno uporabljajo v številnih aplikacijah in imajo dolgo zgodovino varnosti.

Leta 2018 je Sodišče EU razsodilo, da so organizmi, pridobljeni z usmerjeno mutagenozo, GSO - ker mutagenaza spremeni genski material organizma na način, ki se ne pojavi v naravi - in zato za take organizme veljajo pravila EU o odobritvi, sledljivosti in označevanju (EUR-Lex - 62016CJ0528 - EN - EUR-Lex, b. d.). Glede vprašanja, ali se zakonodaja EU o GSO uporablja za organizme, pridobljene z NGT, je Sodišče EU menilo, da so tveganja, povezana z uporabo teh tehnik, podobna tveganjem pri transgenezi - vnosu tujega gena v organizem -, saj neposredna sprememba genskega materiala organizma z mutagenozo omogoča doseganje enakih učinkov. Pri tem je izvzelo sorte, ki so bile pridobljene s „tehnikami mutagenoze, ki se običajno uporabljajo v številnih aplikacijah in imajo dolgo zgodovino varnosti“. Evropska komisija je nato leta 2021 objavila študijo o statusu novih genomskih tehnik v skladu s pravom EU, ki je ugotovila, da so organizmi, pridobljeni z NGT, zlasti z usmerjeno mutagenozo, cisgenezo in intragenezo, GSO (EC study..., 2025.)

Na podlagi opravljenih strokovnih študij in poročil Evropske agencije za varnost hrane (EFSA) (Mullins in sod., 2022) ter Skupnega raziskovalnega središča (JRC) (Broothaerts in sod., 2021) je Evropska komisija leta 2023 predložila predlog Uredbe o rastlinah, pridobljenih z nekaterimi novimi genomske tehniki, ter hrani in krmi iz njih (COM (2023) 411) (Polfjärd, 2025), katere cilj je ohraniti visoko raven varovanja zdravja ljudi in hkrati spodbujati razvoj sort uspešnih v boju proti podnebnim spremembam in zmanjšujejo uporabo pesticidov. V predlogu uredbe in njenih dopolnitvah sta opredeljeni dve kategoriji rastlin (Kahrman in Leggewie, 2024):

(i) rastline NGT kategorije 1 vključujejo rastline, ki so enakovredne rastlinam, ki jih je možno pridobiti s klasičnim žlahtnjenjem, pod pogojem, da se od starševskih rastlin ne razlikujejo za več kot 20 nukleotidnih spre-

memb, kot so tarčne substitucije in insercije nukleotidov, ali delecije poljubnega števila nukleotidov. Mutacije v intronih in regulatornih zaporedjih so izključene iz tega obsega. Med te spremembe sodijo tudi insercije, substitucije, inverzije ali translokacije zaporedja DNK, ne glede na velikost, če ta zaporedja že obstajajo v genskih virih žlahtniteljev in pod pogojem, da ne povzročijo prekinitve endogenih genov ter da ne nastane himeren protein. Za te rastline zakonodaja o GSO ne velja, zato postopek odobritve z oceno tveganja ni potreben. Toda namerno sproščanje in dajanje takih rastlin na trg je dovoljeno šele po uradni potrditvi statusa kategorije 1. V primeru namernega sproščanja je za to pristojen ustrezen organ članice EU, medtem ko dajanje na trg potrdi EFSA (angl. European Food Safety Authority). Zaradi zagotavljanja transparentnosti so uradno priznane rastline NGT kategorije 1 navedene v javno dostopni zbirki EU-SAGE, potrebno pa je tudi označevanje vseh izdelkov iz teh rastlin, vključno z razmnoževalnim materialom. Poleg tega se v ekološki pridelavi teh rastline ne sme uporabljati.

(ii) rastline NGT kategorije 2 so vse ostale rastline pridobljene z NGT, za katere velja zakonodaja o GSO. Zanje je potrebno izdelati oceno tveganja za zdravje ljudi, živali in okolje, pred dajanjem na trg je potrebno pozitivno mnenje EFSA, prav tako mora biti zagotovljeno ustrezno sledenje in označevanje kot GSO. To velja tudi za hrano ali krmo pridelano iz teh rastlin.

Predlog nove uredbe je 7. februarja 2024 v Evropskem parlamentu podprlo 307 poslancev, proti jih je bilo 263 in 41 se jih je vzdržalo (Katsarova, 2024) in je trenutno v javni razpravi.

## 7 KAKŠNA JE PERSPEKTIVA RASTLIN PRIDELANIH Z NGT?

Osnutek uredbe o NGT je sprožil veliko razprav (Kahrman in Leggewie, 2024). Negativne kritike prihajajo predvsem iz okoljskih nevladnih organizacij in delov živilskega sektorja: Friends of the Earth v Evropi menijo, da je ogrožena narava, podobno tudi IFOAM Organics Europe meni, da je osnutek „korak nazaj za biološko varnost, svobodo izbire in obveščenost potrošnikov“, medtem ko Evropsko združenje industrije brez GSO poudarja tveganja za proizvodnjo brez GSO. Pesticide Action Network Europe meni, da predlog „krši previdnostno načelo“ in „ni v skladu z obljubami evropskega zelenega dogovora“, saj bodo nove tehnike „koristile le semenski industriji, kmetje, državljeni in okolje pa bodo ostali nezaščiteni“.

Priznane znanstvene organizacije in semenarska podjetja imajo do osnutka uredbe zelo pozitiven odnos: Evropska organizacija za znanost o rastlinah pozdravlja

osnutek predloga kot „uravnotežen kompromis“ in podpira večino njegove vsebine (*Feedback ...*, 2025.). Podobno Euroseeds meni, da sta predlog in NGT priložnost za večjo odpornost in trajnost pri varni proizvodnji hrane (*Planting ...*, 2025).

Evropski parlament je predlagal, da se v predlog uredbe uvede tudi člen, v skladu s katerim rastline NGT ne bodo patentirane (*New Genomic Techniques...*, 2024). Ta pristop naj bi bil nujen, saj bi v nasprotnem primeru multinacionalna semenarska podjetja lahko imela še večjo moč in monopol nad dostopom do semen. Z družbeno-ekonomskega vidika je predlog smiseln, vendar ga je potrebno obravnavati v okviru Evropske patentne konvencije in upoštevati, da patentiranje izdelka ni odvisno od tega, ali je njegova uporaba dovoljena. Po drugi strani patentni strokovnjaki opozarjajo, da brez ustreznega varstva podjetja morda ne bodo mogla vlagati v razvoj NGT (*European Parliament ...*, 2025).

## 8 ZAKLJUČEK

Prilagajanje rastlin zahtevam ljudi je nekaj, kar počnemo že od začetka kmetijstva. Še naprej se bodo razvijale nove tehnike žlahtnjenja in gojenja rastlin, zato je le vprašanje časa, kdaj bo tehnologija, s katero je rastlina pridobila določeno lastnost, postala drugotnega pomena glede na pomen same lastnosti, ki jo je rastlina pridobila (*New report...*, 2023.). Napredne NGT na eni strani prinašajo številne koristi za potrošnike, saj naslavljajo nekatere ključne izzive kmetijstva povezane s prilagajanjem na podnebne spremembe, z zdravjem in prehransko varnostjo, ter okoljsko trajnostjo in diverzifikacijo kmetijstva. Tveganja nove tehnologije so znanstveno dokazano primerljiva s tistimi, ki jih prinašajo že uveljavljene metode žlahtnjenja (Mullins in sod., 2024). Po drugi strani se potencialne koristi tehnologije upravljajo zaradi neuspešnega obravnavanja regulativnega, pravnega in trgovinskega okvira ter večinoma negativnega sprejemanja družbe, verjetno predvsem na račun strahu in nerazumevanja.

## 9 LITERATURA

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., Belanto, J. J., Verdine, V., Cox, D. B. T., Kellner, M. J., Regev, A., Lander, E. S., Voytas, D. F., Ting, A. Y., & Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550(7675), 280–284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Bruentnell, T. P., Citovsky, V., Conrad, L. J., Gelvin, S. B., Jackson, D. P., Kausch, A. P., Lemaux, P. G., Medford, J. I., Orozco-Cárdenas, M. L., Tricoli, D. M., Van Eck, J., Voytas, D. F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z. J., & Neal Stewart, C. (2016). Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *The Plant Cell*, 28(7), 1510–1520. <https://doi.org/10.1105/TPC.16.00196>
- Anderson, E. M., Haupt, A., Schiel, J. A., Chou, E., Machado, H. B., Strezoska, Ž., Lenger, S., McClelland, S., Birmingham, A., Vermeulen, A., & Smith, A. V. B. (2015). Systematic analysis of CRISPR-Cas9 mismatch tolerance reveals low levels of off-target activity. *Journal of Biotechnology*, 211, 56–65. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2015.06.427>
- Anzalone, A. V., Koblan, L. W., & Liu, D. R. (2020). Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology*, 38(7), 824–844. <https://doi.org/10.1038/S41587-020-0561-9>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Arnould, S., Delenda, C., Grizot, S., Desseaux, C., Pâques, F., Silva, G. H., & Smith, J. (2011). The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. *Protein Engineering, Design and Selection*, 24(1–2), 27–31. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/GZQ083>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1138140>
- Becker, S., & Boch, J. (2021). TALE and TALEN genome editing technologies. *Gene and Genome Editing*, 2, 100007. <https://doi.org/10.1016/J.GGEDIT.2021.100007>
- Berg, P., & Mertz, J. E. (2010). Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology. *Genetics*, 184(1), 9. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.109.112144>
- Broothaerts, W., Jacchia, S., Angers, A., Petrillo, M., Querci, M., Savini, C., Van den Eede, G., & Emons, H. (2021). *New Genomic Techniques: State-of-the-Art Review*. <https://doi.org/10.2760/710056>
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H., & Gao, C. (2019). CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 667–697. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>
- Cheng, K., Xu, Y., Yang, C., Ouellette, L., Niu, L., Zhou, X., Chu, L., Zhuang, F., Liu, J., Wu, H., Charron, J. B., & Luo, M. (2020). Histone tales: lysine methylation, a protagonist in *Arabidopsis* development. *Journal of Experimental Botany*, 71(3), 793–807. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ435>
- Cheng, X., Li, H., Tang, Q., Zhang, H., Liu, T., & Wang, Y. (2024). Trends in the global commercialization of genetically modified crops in 2023. *Journal of Integrative Agriculture*, 23(12), 3943–3952. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2024.09.012>
- Cody, W. B., & Scholthof, H. B. (2019). Plant Virus Vectors 3.0: Transitioning into synthetic genomics. *Annual Review of*

- Phytopathology*, 57, 211–230. <https://doi.org/10.1146/anurev-phyto-082718-100301>
- Crow, J. F. (1998). 90 Years Ago: The beginning of hybrid maize. *Genetics*, 148(3), 923–928. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.3.923>
- Demirer, G. S., Silva, T. N., Jackson, C. T., Thomas, J. B., W. Ehrhardt, D., Rhee, S. Y., Mortimer, J. C., & Landry, M. P. (2021). Nanotechnology to advance CRISPR–Cas genetic engineering of plants. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 243–250. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00854-y>
- Dima, O., Bocken, H., Custers, R., Inzé, D., & Puigdomenech, P. (2020). *Genome Editing for Crop Improvement. Symposium summary*. <https://doi.org/10.26356/gen-editing-crop>
- Dima, O., Heyvaert, Y., & Inzé, D. (2022). Interactive database of genome editing applications in crops and future policy making in the European Union. *Trends in Plant Science*, 27(8), 746–748. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.05.002>
- Direktiva - 2001/18 - EN - EUR-Lex. (b. d.). Pridobljeno 29. marec 2025, s <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX:32001L0018&qid=1743268939349>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR–Cas9. *Science*, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Duffin, J., & Mach, B. (2022). A brief history of the discovery of gene cloning in 1975. *Perspectives in Biology and Medicine*, 65(3), 442–457. <https://doi.org/10.1353/PBM.2022.0036>
- EC study on new genomic techniques - European Commission. (b. d.). Pridobljeno 28. februar 2025, s [https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms/new-techniques-biotechnology/ec-study-new-genomic-techniques\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms/new-techniques-biotechnology/ec-study-new-genomic-techniques_en)
- EUR-Lex - 62016CJ0528 - EN - EUR-Lex. (b. d.). Pridobljeno 29. marec 2025, s <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX:62016CJ0528>
- European Parliament votes for a regulation on NGT plants supporting the ban on plant patents. (b. d.). Pridobljeno 28. februar 2025, s <https://patentepi.org/en/epi/news/3a640142-e6c7-4f73-ae7b-5aaff964b1cb>
- Feedback from: European Plant Science Organisation. (b. d.). Pridobljeno 28. februar 2025, s [https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/13119-Legislation-for-plants-produced-by-certain-new-genomic-techniques/F3442539\\_en](https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/13119-Legislation-for-plants-produced-by-certain-new-genomic-techniques/F3442539_en)
- Gallego-Bartolomé, J. (2020). DNA methylation in plants: mechanisms and tools for targeted manipulation. *New Phytologist*, 227(1), 38–44. <https://doi.org/10.1111/nph.16529>
- Gao, C. (2021). Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 184(6), 1621–1635. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.01.005/ASSET/E6F75B4F-FF29-4C98-9BC4-B6968A427ECA/MAIN.ASSETS/GR4.JPG>
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., & Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551(7681), 464–471. <https://doi.org/10.1038/nature24644>
- Gupta, R., Ghosh, A., Chakravarti, R., Singh, R., Ravichandiran, V., Swarnakar, S., & Ghosh, D. (2022). Cas13d: A new molecular scissor for transcriptome engineering. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 866800. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.866800/PDF>
- He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z. X., Liu, H. K., & Li, Z. (2014). Genotyping-by-sequencing (GBS), An ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in Plant Science*, 5(SEP), 107179. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00484/BIBTEX>
- Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, E., Hernalsteens, J.-P., Van Montagu, M., & Schell, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal*, 2(6), 987–995. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01532.x>
- Herrera-Estrella, L., Simpson, J., & Martínez-Trujillo, M. (2005). Transgenic Plants: An Historical Perspective. V *Transgenic Plants* (Let. 286, str. 003–032). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:003>
- Iriarte, J., Elliott, S., Maezumi, S. Y., Alves, D., Gonda, R., Robinson, M., Gregorio de Souza, J., Watling, J., & Handley, J. (2020). The origins of Amazonian landscapes: Plant cultivation, domestication and the spread of food production in tropical South America. *Quaternary Science Reviews*, 248, 106582. <https://doi.org/10.1016/J.QUASCI-REV.2020.106582>
- Jankowicz-Cieslak, J., Mba, C., & Till, B. J. (2016). Mutagenesis for crop breeding and functional genomics. *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols*, 3–18. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45021-6\\_1/TABLES/1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45021-6_1/TABLES/1)
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829/SUPPL\\_FILE/JINEK.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829/SUPPL_FILE/JINEK.SM.PDF)
- Kahrmann, J., & Leggewie, G. (2024). European commission's plans for a special regulation of plants created by new genomic techniques. *European Papers - A Journal on Law and Integration*, 9(1), 21–38. <https://doi.org/10.15166/2499-8249/740>
- Katsarova, I. (2024). *Plants obtained by certain new genomic techniques*. <http://www.europarl.europa.eu/thinktank>
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., Feldblyum, T., Nierman, W., Benito, M. L., Lin, X., Town, C. D., Venter, J. C., Fraser, C. M., Tabata, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., ... Somerville, C. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420–424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>
- Kungulovski, G., & Jeltsch, A. (2016). Epigenome editing: State of the art, concepts, and perspectives. *Trends in Genetics*, 32(2), 101–113. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2015.12.001/ASSET/F135D4A1-9922-4F04-BAB8-E7F1F01CB15A/MAIN.ASSETS/GR4.SML>
- Larson, G., Piperno, D. R., Allaby, R. G., Purugganan, M. D., Andersson, L., Arroyo-Kalin, M., Barton, L., Vigueira, C. C., Denham, T., Dobney, K., Doust, A. N., Gepts, P., Gilbert, M. T. P., Gremillion, K. J., Lucas, L., Lukens, L., Marshall, F.

- B., Olsen, K. M., Pires, J. C., ... Fuller, D. Q. (2014). Current perspectives and the future of domestication studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(17), 6139–6146. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1323964111/SUPPL\\_FILE/PNAS.201323964SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1323964111/SUPPL_FILE/PNAS.201323964SI.PDF)
- Larson, M. H., Gilbert, L. A., Wang, X., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature Protocols*, 8(11), 2180–2196. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.132>
- Li, B., Sun, C., Li, J., & Gao, C. (2024). Targeted genome-modification tools and their advanced applications in crop breeding. *Nature Reviews Genetics*, 25(9), 603–622. <https://doi.org/10.1038/s41576-024-00720-2>
- Louwaars, N. P. (2018). Plant breeding and diversity: A troubled relationship? *Euphytica*, 214(7), 114. <https://doi.org/10.1007/S10681-018-2192-5>
- Mak, A. N. S., Bradley, P., Bogdanove, A. J., & Stoddard, B. L. (2012). TAL effectors: function, structure, engineering and applications. *Current opinion in structural biology*, 23(1), 93. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2012.11.001>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnys, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., ... Koonin, E. V. (2019). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Maluszynski, M. (2001). Officially released mutant varieties - The FAO/IAEA database. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(3), 175–177. <https://doi.org/10.1023/A:1010652523463/METRICS>
- Marcaida, M. J., Muñoz, I. G., Blanco, F. J., Prieto, J., & Montoya, G. (2009). Homing endonucleases: from basics to therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 67(5), 727. <https://doi.org/10.1007/S00018-009-0188-Y>
- Marks, R. A., Hotaling, S., Frandsen, P. B., & VanBuren, R. (2021). Representation and participation across 20 years of plant genome sequencing. *Nature Plants*, 7(12), 1571–1578. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01031-8>
- McCutcheon, S. R., Rohm, D., Iglesias, N., & Gersbach, C. A. (2024). Epigenome editing technologies for discovery and medicine. *Nature Biotechnology*, 42(8), 1199–1217. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02320-1>
- Mehta, A., & Haber, J. E. (2014). Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9), a016428–a016428. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016428>
- Mittelsten Scheid, O. (2022). Mendelian and non-Mendelian genetics in model plants. *The Plant Cell*, 34(7), 2455. <https://doi.org/10.1093/PLCELL/KOAC070>
- Muller, H. J. (1928). The Production of Mutations by X-Rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 14(9), 714–726. <https://doi.org/10.1073/PNAS.14.9.714>
- Mullins, E., Bresson, J., Dalmay, T., Dewhurst, I. C., Epstein, M. M., Firbank, L. G., Guerche, P., Hejatko, J., Moreno, F. J., Naegeli, H., Nogué, F., Serrano, J. J. S., Savoini, G., Veromann, E., Veronesi, F., Casacuberta, J., Dumont, A. F., Genaro, A., Lenzi, P., ... Rostoks, N. (2022). Updated scientific opinion on plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal*, 20(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7621>
- Mullins, E., Bresson, J. L., Dalmay, T., Dewhurst, I. C., Epstein, M. M., Firbank, L. G., Guerche, P., Hejatko, J., Moreno, F. J., Naegeli, H., Nogué, F., Rostoks, N., Sanchez Serrano, J. J., Savoini, G., Veromann, E., Veronesi, F., Casacuberta, J., Afonso, A., Lenzi, P., ... Raffaello, T. (2024). Scientific opinion on the ANSES analysis of Annex I of the EC proposal COM (2023) 411 (EFSA-Q-2024-00178). *EFSA Journal*, 22(7). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2024.8894>
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261–285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
- New Genomic Techniques: MEPs want to ban all patents for NGT plants | News | European Parliament.* (b. d.). Pridobljeno 28. februar 2025, s <https://www.europarl.europa.eu/news/en/press-room/20240122IPR17027/new-genomic-techniques-meps-want-to-ban-all-patents-for-ngt-plants>
- New report details the €3 trillion cost of Europe saying „no to science“ on gene editing - Alliance for Science.* (b. d.). Pridobljeno 28. februar 2025, s <https://allianceforscience.org/blog/2023/10/new-report-details-the-e3-trillion-cost-of-europe-saying-no-to-science-on-gene-editing/>
- O’Leary, N. A., Cox, E., Holmes, J. B., Anderson, W. R., Falk, R., Hem, V., Tsuchiya, M. T. N., Schuler, G. D., Zhang, X., Torcivia, J., Ketter, A., Breen, L., Cothran, J., Bajwa, H., Tinné, J., Meric, P. A., Hlavina, W., & Schneider, V. A. (2024). Exploring and retrieving sequence and metadata for species across the tree of life with NCBI Datasets. *Scientific Data*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03571-y>
- Osakabe, Y., & Osakabe, K. (2015). Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant and Cell Physiology*, 56(3), 389–400. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu170>
- Parisi, C., & Rodriguez, C. E. (2021). Current and future market applications of new genomic techniques. *Office of the ...*, 49. [https://doi.org/10.2760/02472\(online\)](https://doi.org/10.2760/02472(online))
- Pei, W. Di, Zhang, Y., Yin, T. L., & Yu, Y. (2020). Epigenome editing by CRISPR/Cas9 in clinical settings: possibilities and challenges. *Briefings in Functional Genomics*, 19(3), 215–228. <https://doi.org/10.1093/BFGP/ELZ035>
- Pixley, K. V., Falck-Zepeda, J. B., Paarlberg, R. L., Phillips, P. W. B., Slamet-Loedin, I. H., Dhugga, K. S., Campos, H., & Guttersen, N. (2022). Genome-edited crops for improved food security of smallholder farmers. *Nature Genetics*, 54(4), 364–367. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01046-7>
- Planting the seeds of tomorrow: European Commission unveils game-changing proposals for plant breeding innovation - Euroseeds.* (b. d.). Pridobljeno 28. februar 2025, s <https://euroseeds.eu/news/planting-the-seeds-of-tomorrow-european-commission-unveils-game-changing-proposals-for-plant-breeding-innovation/>

- Polidoros, A., Nianiou-Obeidat, I., Tsakirpaloglou, N., Petrou, N., Deligiannidou, E., & Makri, N. M. (2024). Genome-editing products line up for the market: Will Europe harvest the benefits from science and innovation? *Genes*, *15*(8), 1014. <https://doi.org/10.3390/GENES15081014/S1>
- Polfjård, J. (2025, januar 29). *Poročilo o predlogu uredbe Evropskega parlamenta in Sveta o rastlinah, pridobljenih z nekaterimi novimi genomskimi tehnikami, ter hrani in krmi iz njih ter o spremembi Uredbe (EU) 2017/625 | A9-0014/2024 | Evropski parlament*. [https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-9-2024-0014\\_SL.html](https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-9-2024-0014_SL.html)
- Sauer, N. J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Walker, K. A., Beetham, P. R., Schöpke, C. R., & Gocal, G. F. W. (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(2), 496–502. <https://doi.org/10.1111/pbi.12496>
- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, *550*(7676), 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>
- Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J., & Olsson, O. (2012). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International Journal of Plant Genomics*, *2011*, 314829. <https://doi.org/10.1155/2011/314829>
- Stadler, L. J. (1928). Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science*, *68*(1756), 186–187. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.68.1756.186/ASSET/EDED47C6-CE8A-4246-AFCE-8CA501699FA8/ASSETS/SCIENCE.68.1756.186.FP.PNG>
- Sun, L., Lai, M., Ghouri, F., Nawaz, M. A., Ali, F., Baloch, F. S., Nadeem, M. A., Aasim, M., & Shahid, M. Q. (2024). Modern plantbreeding techniques in crop improvement and genetic diversity: From molecular markers and gene editing to artificial intelligence—A critical review. *Plants*, *13*(19), 2676. <https://doi.org/10.3390/PLANTS13192676>
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, *37*(2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/S12033-007-0031-3/METRICS>
- Ueda, M., & Seki, M. (2020). Histone modifications form epigenetic regulatory networks to regulate abiotic stress response. *Plant Physiology*, *182*(1), 15–26. <https://doi.org/10.1104/PP.19.00988>
- Vasudevan, S. N., Pooja, S. K., Raju, T. J., & Damini, C. S. (2023). Cisgenics and intragenics: boon or bane for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1275145. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1275145/BIBTEX>
- Veillet, F., Perrot, L., Chauvin, L., Kermarrec, M. P., Guyon-Debast, A., Chauvin, J. E., Nogué, F., & Mazier, M. (2019). Transgene-Free Genome Editing in Tomato and Potato Plants Using Agrobacterium-Mediated Delivery of a CRISPR/Cas9 Cytidine Base Editor. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS20020402>
- Wang, F., Li, C. H., Liu, Y., He, L. F., Li, P., Guo, J. X., Zhang, N., Zhao, B., & Guo, Y. D. (2024). Plant responses to abiotic stress regulated by histone acetylation. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1404977. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2024.1404977/PDF>
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, *171*(4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Wu, H., Awan, F. S., Vilarinho, A., Zeng, Q., Kannan, B., Phipps, T., McCuiston, J., Wang, W., Caffall, K., & Altpeter, F. (2015). Transgene integration complexity and expression stability following biolistic or Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *51*(6), 603–611. <https://doi.org/10.1007/S11627-015-9710-0/TABLES/4>
- Zhan, X., Liu, W., Nie, B., Zhang, F., & Zhang, J. (2023). Cas13d-mediated multiplex RNA targeting confers a broad-spectrum resistance against RNA viruses in potato. *Communications Biology*, *6*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05205-2>
- Zhang, C., Konermann, S., Brideau, N. J., Lotfy, P., Wu, X., Novick, S. J., Strutzenberg, T., Griffin, P. R., Hsu, P. D., & Lyumkis, D. (2018). Structural basis for the RNA-guided ribonuclease activity of CRISPR-Cas13d. *Cell*, *175*(1), 212–223.e17. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.09.001>