



**BF**

UNIVERZA V LJUBLJANI  
Biotehniška fakulteta

**ZBORNİK RAZŠIRJENIH SEMINARJEV ŠTUDENTOV  
BIOTEHNOLOGIJE PRI PREDMETU  
BIOTEHNOLOGIJA RASTLIN (2023/24)**

Ljubljana, 2024

Naslov publikacije: Zbornik razširjenih seminarjev študentov biotehnologije pri predmetu Biotehnologija rastlin (2023/24)

Urednica: Zlata Luthar

Tehnična urednica: Zlata Luthar

© Univerza v Ljubljani, 2024. Vse pravice pridržane.

Založila in izdala: Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

Za založbo in izdajatelja: Marina Pintar, dekanja Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

Oblikovanje in prelom: Zlata Luthar

Ljubljana, 2024

Publikacija je v digitalni obliki prosto dostopna na:  
<https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=166069>

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani  
[COBISS.SI](https://nuk.ub.uni-lj.si/)-ID **219912195**  
ISBN 978-961-6379-90-8 (PDF)

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TRANSGENO CEPIVO PROTI KORONA VIRUSU SARS-COV-2<br>Eva Hartman                                        | 4   |
| PROTITUMORSKO DELOVANJE NEKATERIH RASTLINSKIH BIOAKTIVNIH<br>UČINKOVIN<br>Gaja Piškurič               | 20  |
| IZBOLJŠAVA RNA TEHNOLOGIJ Z NANODELCI ZA UČINKOVITO<br>PROTIVIRUSNO ZAŠČITO RASTLIN<br>Lovro Laporšek | 35  |
| PRIOBIVANJE ANTIGENOV ZA CEPIVA PROTI HEPATITISU B S TRANGENIMI<br>RASTLINAMI<br>Nika Kuhar           | 52  |
| GLIFOSAT: NEDOLŽEN HERBICID ALI GROŽNJA?<br>Mojca Rob                                                 | 70  |
| GENSKE BANKE KOT NAČIN OHRANJANJA OGROŽENIH RASTLINSKIH<br>GENSKIH VIROV<br>Ema Parkelj               | 83  |
| ENDOFITI KOT INOVATIVNA REŠITEV V KMETIJSTVU<br>Blaž Pavlič, Anže Vozelj in Tjaša Lukan               | 100 |

## TRANSGENO CEPIVO PROTI KORONA VIRUSU SARS-COV-2

Eva Hartman

### IZVLEČEK

Korona virus SARS-CoV-2, ki je povzročitelj korona virusne bolezni COVID-19, se je prvič pojavil decembra 2019 v Wuhanu na Kitajskem, od koder se je hitro razširil po vsem svetu ter povzročil pandemijo. Kot odgovor na globalno krizo so raziskovalci začeli intenzivno proučevati učinkovito zaščito proti novemu virusu SARS-CoV-2 z namenom zaježitve širjenja. Enega izmed inovativnih načinov so predstavljali rastlinski sistemi, kjer se transgene rastline uporablja kot biotovarne za proizvodnjo številnih aktivnih snovi, kot so cepiva, monoklonska protitelesa, terapevtski proteini, industrijski encimi itd. Transgene rastline so uspešna alternativa klasičnim metodam, saj omogočajo varno, stroškovno učinkovito in obsežno ter hitro prilagodljivo proizvodnjo, ob pojavu različnih mutiranih sevov SARS-CoV-2 virusa, kot so Alfa, Beta, Gamma, Delta in Omikron. Ti so zaradi svojih mutacij dodatno otežili doseganje zadostne imunosti z obstoječimi cepivi, medtem ko imajo rastlinski proizvodni sistemi zmožnost hitre prilagoditve in proizvodnje novih antigenov. Kljub pomislekom javnosti pred uporabo transgenih rastlin, je bilo leta 2022 že odobreno prvo cepivo na osnovi gensko spremenjenih rastlin imenovano Covifenz. Proizvedlo ga je kanadsko podjetje Medicago, cepivo pa temelji na tehnologiji virusu podobnih delcev (VLP), ki posnemajo strukturo virusa, ne da bi vsebovali njegov genski zapis, kar omogoča varnejši način sprožitve imunskega odziva. Nenaden porast obolelih z novim virusom je zahteval tudi hitrejši razvoj cepiv, kar lahko v običajnih okoliščinah traja več kot 10 let. Čeprav so bile nekatere faze testiranja nekoliko pospešene, so bile med procesom upoštewane vse smernice za zagotavljanje varnosti in učinkovitosti.

**Ključne besede:** transgeno cepivo, korona virusna bolezen, antigen, virus SARS-CoV-2, mutirani sevi

### Transgenic vaccine against corona virus SARS-CoV-2

#### Abstract

Corona virus disease (COVID-19) first emerged in December 2019 in Wuhan, China, from where it quickly spread worldwide, causing a pandemic. In response to the global crisis, researchers began intensively studying effective protection against the new SARS-CoV-2 virus to curb its spread. One of the innovative approaches involved plant systems, where transgenic plants are used as biofactories for producing various active substances such as vaccines, monoclonal antibodies, therapeutic proteins, industrial enzymes etc. Transgenic plants offer a viable alternative to traditional methods, providing a safe, cost-effective, and scalable production method. Moreover, with the emergence of different mutated SARS-CoV-2 variants like Alpha, Beta, Gamma, Delta, and Omicron, which due to their mutations made it more challenging to achieve adequate immunity with existing vaccines. Plant-based systems have the ability to quickly adapt and produce new antigens. Despite public concerns over the use of transgenic plants, the first plant-based vaccine, Covifenz, was approved in 2022 and was

developed by the Canadian company Medicago. The vaccine is based on virus-like particle (VLP) technology, which mimics the virus's structure without containing its genetic material, allowing for a safer way to trigger an immune response. Sudden increase in the number of people infected with the new virus also required a rapid development of vaccines, which under normal circumstances could take over 10 years. Although some phases of testing were somewhat accelerated, all safety and efficacy guidelines were followed during the process.

**Key words:** transgenic vaccine, corona virus disease, antigen, virus SARS-CoV-2, mutated strains

## 1 UVOD

Korona virus SARS-CoV-2 se je prvič pojavil konec leta 2019 in se zelo hitro razširil po vsem svetu. Povzročil je že mnogo smrti, a se kljub njegovemu pojenjanju in pojavljanju mutantov z manj hudimi poteki bolezni, še vedno pojavljajo primeri s tragičnimi izidi. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (ang. World Health Organization – WHO) je bilo do konca leta 2023 zabeleženih 776 milijonov okužb, od tega 7,1 milijona smrtnih primerov (Number ..., 2024a, 2024b). Prvi primer korona virusne bolezni je bil potrjen decembra 2019 v mestu Wuhan na Kitajskem, medtem ko so bili prvi trije evropski primeri potrjeni 24. januarja 2020 v Franciji, kamor so ga prinesli turisti, ki so bivali v Wuhanu na Kitajskem (Bernard Stoecklin in sod., 2020). Močno je bila prizadeta tudi Slovenija, kjer se je prvi primer pojavil 4. marca 2020, do konca leta 2023 pa se je pojavilo 1,4 milijona okužb in 10 tisoč smrtnih primerov (Hočevar Grom in sod., 2023; Number ..., 2024a, 2024b).

Virus se širi z manjšimi delci iz izdihanega zraka, znanih kot aerosoli, ki zlahka ostanejo v zraku in predstavljajo tveganje za izpostavljenost ter posledično okužbo. Kapljice aerosola lahko padejo neposredno na naše sluznice ali oči ter nato vstopijo v celice ali pa padejo na tla, od koder jih prenesemo z dotikanjem okuženih površin. Simptomi okužbe so vidni po približno šestih dneh, z razvojem mutiranih sevov pa se je inkubacijska doba postopoma krajšala in pri sevu Omicron znašala le še 3 – 4 dni (Wu in sod., 2022). Okuženi posamezniki so kazali simptome kašlja, glavobola, vročine, motenj ali izgube voha in okusa, težav z dihanjem, utrujenosti, bolečin v mišicah. Ti se med osebami razlikujejo, zaradi česar lahko bolezen poteka v blažji ali hujši obliki, ki je za nekatere tudi smrtonosna. Za hitro odkritje okužb je bila ključnega pomena detekcija bolezni COVID-19. Med različnimi metodami sta bili najbolj razširjeni testiranje z verižno reakcijo s polimerazo (ang. polymerase chain reaction - PCR) in hitri antigenski testi (Logar, 2020).

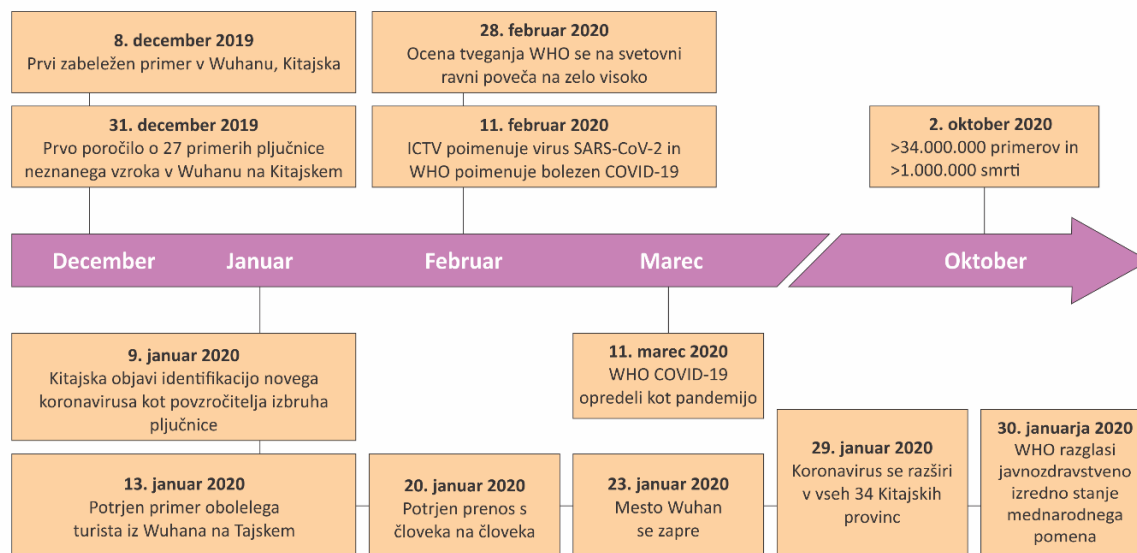
Da bi se pandemija v doglednem času končala, je bilo potrebno doseči imunost večjega dela populacije na virus SARS-CoV-2. To je bilo najučinkovitejše storiti z modifikacijo obstoječih preverjenih cepiv. V manj kot 12 mesecih po začetku pandemije so bila razvita prva cepiva, kot so Pfizer-BioNTech, Moderna, AstraZeneca in Johnson & Johnson (Soheili in sod., 2023). Glavne izzive v postopku cepljenja so predstavljali neravnovesje v dostopu cepiv, pojav novih sevov ter zadržki javnosti pred sprejemom novih vakcin, a se je v prvi polovici leta 2021 cepljenje kljub temu razširilo po vsem svetu (Hassan in sod., 2021). Trenutno naj bi število

vseh prejetih odmerkov cepiv proti SARS-CoV-2 že presegalo 13 milijard (COVID-19 ..., 2024a).

Medtem ko so bila prva cepiva že v uporabi, pa so se druga še zmeraj razvijala, saj so temeljila na različnih tehnologijah. Eden izmed inovativnih pristopov, ki se je razvil v nadaljevanju pandemije, so bila rastlinska cepiva, ki so nudila cenovno ugodnejšo in obsežno proizvodnjo. Prvi primer takšnega cepiva, ki je bilo odobreno za uporabo, je bil Covifenz podjetja Medicago Inc. Čeprav se kljub dobrim lastnostim in statistiki ni pretirano razširilo po svetu, je odprlo poglede ljudi na nove tehnike pridelave, ki se jih lahko v prihodnosti prenese tudi na cepiva proti drugim boleznim (Government of Canada, 2023).

## 2 KORONA VIRUSNA BOLEZEN COVID-19

Korona virusna bolezen (COVID-19) je nalezljiva bolezen, ki jo povzroča hud akutni respiratorni sindrom korona virus 2 (SARS-CoV-2). Prvi primer je bil zabeležen decembra 2019 v mestu Wuhan na Kitajskem, kjer se je sprva pojavilo povečano število bolnikov s pljučnico, katerih povzročitelja niso poznali. Kasneje je bilo z uporabo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) ugotovljeno, da je podobnost novo izoliranega virusa več kot 85 % z dvema koronavirusoma, ki izhajata iz netopirja in 80 % z virusom SARS Corona-Virus (SARS-CoV). Zaradi česar se predvideva, da bi bili lahko netopirji prvotni gostitelj tega virusa (Lu in sod., 2020). Sprva so ga zato začasno poimenovali novi koronavirus 2019 (2019-nCoV), nato ga je Mednarodni odbor za taksonomijo virusov (ang. The International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) preimenoval v SARS-CoV-2, Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization - WHO) pa je bolezen določila kot COVID-19.



Slika 1: Časovni pregled pojavnosti in poteka koronavirusne bolezni v prvih mesecih po njenem odkritju. Do oktobra 2020 je bilo po vsem svetu zabeleženih že več kot 30 milijonov okužb in več kot 1 milijon smrtnih izidov (prirejeno po Hu in sod., 2021)

Visoka učinkovitost prenosa virusa in številna mednarodna potovanja so omogočila hitro širjenje nove bolezni po vsem svetu, zato je WHO 11. marca 2020 izbruh razglasila kot pandemijo (Slika 1) (Hu in sod., 2021).

## 2.1 STRUKTURA KORONA VIRUSA SARS-COV-2

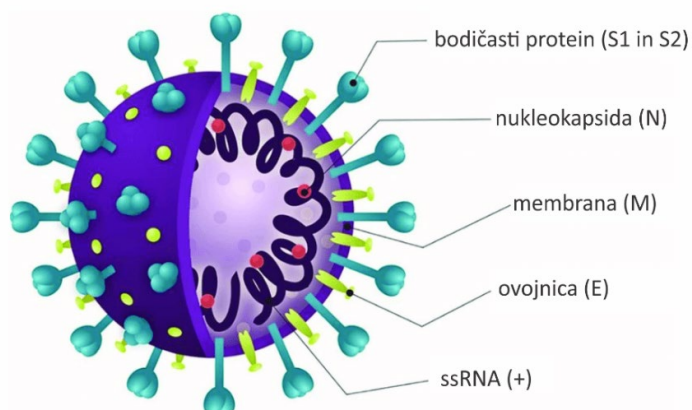
Koronavirusi so RNA virusi z ovojnico, ki so uvrščeni v družino Coronaviridae, ime pa so dobili zaradi videza podobnega kroni, ki ga pod elektronskim mikroskopom ustvarijo proteini S (Kumar in sod., 2021). Stare koronaviruse poznamo že od leta 1960 in povzročajo le blažje prehlade, SARS-CoV-2 pa sodi v skupino novih koronavirusov, ki so zaradi višje smrtnosti v zadnjih desetletjih povzročili večje izbruhe pandemij. Mednje uvrščamo tudi SARS-CoV, ki je leta 2002 povzročil epidemijo SARS (hud akutni respiratorni sindrom) in MERS-CoV, ki je bil aktiven leta 2012 in povzročil MERS (bližnjevzhodni respiratorni sindrom) (King, 2020).

SARS-CoV-2 je RNA virus premera 80 do 120 nm (Tai in sod., 2021). Njegov genom je sestavljen iz enoverižne pozitivne RNA (+ssRNA) velikosti približno 30 kb, zaradi česar spada med ene izmed največjih RNA genomov med virusi (Zhou in sod., 2020). Kodira štiri strukturne in šestnajst nestrukturnih proteinov. Strukturni proteini, kot je nukleokapsida, lahko vežejo RNA in jo tako stabilizirajo znotraj virusa, preostali pa so vgrajeni v virusno ovojnico. Nestrukturni proteini, ki jih kodira virus, se le izražajo v okuženih celicah in niso vključeni v delec viriona. Slednji predstavljajo različne encime in transkripcijske faktorje, ki jih virus uporablja za razmnoževanje, kot so virusna proteaza in replikaza RNA (Pellenz, 2022).

### 2.1.1 Strukturni proteini SARS-CoV-2

Med strukturne proteine so uvrščeni proteini v obliki bodic - S, ovojnica - E, membrana - M in nukleokapsida - N (Slika 2) (Ren in sod., 2020). Za dokončanje infekcijskega dogodka so potrebni vsi štirje, kar vključuje vstop v gostiteljske celice, replikacijo virusnega genoma, pakiranje, sestavljanje, transport in sproščanje virusnih delcev (Rahman in sod., 2021).

Glavna beljakovinska komponenta SARS-CoV-2 znotraj viriona je nukleokapsidni protein, ki je odgovoren za vezavo genomske RNA znotraj viriona in njeno pakiranje v kompleks ribonukleoproteina (RNP) (Supekar in sod., 2020). Beljakovine S, M in E pa skupaj tvorijo virusno ovojnico. Ključni sklop beljakovin v zunanji membrani je znan kot proteini S, ki omogočajo vstop virusa v gostiteljske celice. Sestavljeni so iz dveh podenot S1 in S2. Prva vsebuje receptor vezavno domeno (RBD), ki se poveže z receptorjem ACE2 (angiotenzinska konvertaza 2) na površini gostiteljskih celic, S2 pa deluje kot fuzijski protein, ki pomaga pri fuziji viriona s celično membrano sesalcev (Walls in sod., 2020). Ovojnica je skupina razmeroma majhnih virusnih proteinov, ki pomagajo pri sestavljanju in sproščanju virionov, medtem ko je membrana pomembna za oblikovanje in stabilnost virusnega delca ter pakiranje RNA (Nal in sod., 2005).



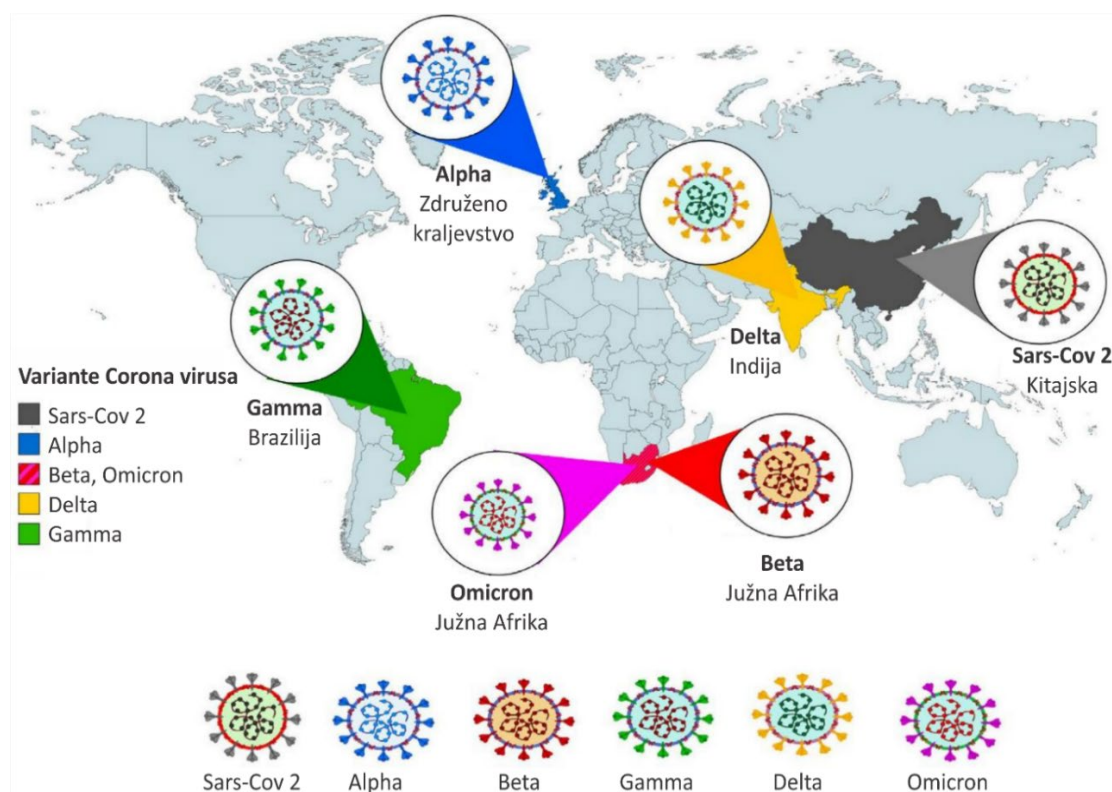
Slika 2: Struktura virusa SARS-CoV-2, ki ga tvorijo predvsem strukturni proteini, kot so bodičasti proteini (S), membrana (M), ovojnica (E) in nukleokapsida (N). Proteini S, M in E so vgrajeni v virusno ovojnico, protein N pa interagira z virusno RNA v jedru viriona (prirejeno po Priyadarshi in sod., 2022)

### 2.1.2 Sevi SARS-CoV-2

Virusi se spreminjajo in razvijajo, ko se skozi čas širijo med ljudmi. Ko se te spremembe znatno razlikujejo od predhodno odkritega virusa, so le-te znane kot novi sevi. Za identifikacijo različic znanstveniki mapirajo genetski zapis virusov (mu določijo nukleotidno zaporedje, ga sekvencirajo) in nato poiščejo razlike med njimi, da ugotovijo, ali so se spremenili. Večina sprememb nima večjih vplivov na lastnosti virusa, nekatere pa lahko vplivajo na lastnosti, kot so enostavnost širjenja, resnost bolezni, učinkovitost cepiv, terapevtskih zdravil, diagnostičnih orodij ali drugih javnozdravstvenih in socialnih ukrepov (COVID-19 ..., 2024b).

Mutirane različice virusa so se pojavile tudi med pandemijo COVID-19, saj se SARS-CoV-2 prav tako prilagaja z genetsko evolucijo in razvojem mutacij. Pomembnejši sevi so bili razdeljeni v tri kategorije in sicer različica pod nadzorom (ang. variant under monitoring - VUM), različica zanimanja (ang. variant of interest - VOI) in različica zaskrbljenosti (ang. variant of concern - VOC) (COVID-19 ..., 2024b). Od začetka pandemije je bilo identificiranih pet VOC SARS-CoV-2: Alpha, Beta, Gamma, Delta in Omicron (Slika 3) (Saberian in sod., 2022).

Konec decembra 2020 je Združeno kraljestvo poročalo o pojavu prve nove različice SARS-CoV-2, imenovane Alpha, ki je bila prvič zaznana v septembru. Le-ta naj bi bila za 43 - 90 % bolj prenosljiva kot divji tip, zato se je hitro razširila tudi po drugih državah (Davies in sod., 2021). Ena izmed mutacij, ki je to omogočila, se nahaja v proteinu S in povečuje njegovo sposobnost vezave na ACE2 receptorje na človeških celicah (Liu in sod., 2021). Povzročila je težjo obliko bolezni, kar je posledično vodilo v večje število hospitalizacij in povečano smrtnost (Grint in sod., 2021).



Slika 3: Geografski izvor prvotnega virusa SARS-CoV-2 in njegovih mutiranih različic, ki so bile klasificirane kot različice zaskrbljenosti (VOC) (prirejeno po Andre in sod., 2023)

Nov val okužb je oktobra 2020 v Južni Afriki povzročil Beta sev (Tegally in sod., 2021). Ta različica je imela povečano tveganje prenosa in zmanjšano nevtralizacijo z monoklonsko protitelesno terapijo, rekonvalescentnimi serumi ter serumi po cepljenju (Wang in sod., 2021). Mutacija v proteinu S prav tako pomaga virusu pri izogibanju imunskemu odzivu tudi pri tistih, ki so že bili cepljeni (Zhou in sod., 2021). Beta različica ima 21 mutacij, od tega 9 v proteinu S. Tri mutacije se nahajajo na receptor vezavni domeni (RBD) in tako kot pri alpha sevu povečujejo vezavno afiniteto za receptorje ACE2 (Tegally in sod., 2021).

Gamma sev, ki izvirno prihaja iz Brazilije je bil prvič identificiran na Japonskem, kamor so ga prinesli brazilski turisti januarja 2020. Ljudje, ki so bili, prej okuženi z drugimi sevi, naj ne bi bili imuni na to različico (Mohammadi in sod., 2021). Prav tako ima nekaj enakih mutacij v proteinih S kot sevi Alpha in Beta, kar ji omogoča lažjo pritrditev na človeške celice, a je kljub temu nekoliko manj prenosljiva od njiju (Duong, 2021).

Delta sev se je prvotno začel širiti decembra 2020 v Indiji (ECDC, 2021). Ta različica je znana po svoji visoki prenosljivosti, ki je približno 60 % večja kot pri Alpha sevu in bistveno višja od izvirnega seva SARS-CoV-2. Tudi cepiva so bila proti sevu Delta nekoliko manj učinkovita kot proti Alpha (Burki, 2021). Delta sev prav tako zmanjšuje učinkovitost imunskega odziva zaradi specifičnih mutacij v proteinu S. Mutacije izboljšujejo sposobnost virusa, da se izogne nevtralizirajočim protitelesom, ki jih telo proizvaja po naravni okužbi ali cepljenju. Ker protitelesa težje nevtralizirajo virus, imunski sistem manj učinkovito preprečuje okužbo, kar privede do lažjega širjenja (Greaney in sod., 2022).

Novembra 2021 je bil v Južni Afriki ponovno odkrit nov sev SARS-CoV-2, in sicer Omicron. Je najbolj mutiran izmed vseh znanih različic, saj njegov protein S vsebuje več kot 30 mutacij, medtem ko so jih njegovi predhodniki imeli le okoli 10. Poleg tega je Omicron precej odporen na nevtralizirajočo aktivnost cepiv, rekonvalescentni serum in večino terapij s protitelesi (Fan in sod., 2022). Ta različica ima največ subvariant v primerjavi z drugimi sevi, kar je prispevalo k njenemu hitremu širjenju (Muthusami in Saritha, 2023).

### **3 RASTLINSKI SISTEMI ZA PRIDOBIVANJE AKTIVNIH SNOVI**

Vse večje povpraševanje po različnih farmacevtskih izdelkih in njihovi proizvodnji s čim manjšimi vložki, nas je pripeljalo do uporabe številnih sistemov. Enega izmed teh predstavljajo tudi rastline, ki se uporabljajo kot biotovarne za sintezo številnih aktivnih snovi, kot so cepiva, monoklonska protitelesa, terapevtski proteini, industrijski encimi... (Sethi in sod., 2021). Celoten postopek proizvodnje je znan kot rastlinsko molekularno kmetovanje (ang. plant molecular farming - PMF). Ponuja varno, stroškovno učinkovito in razširljivo proizvodnjo, kar zagotavlja hitro ter globalno uporabo bioloških zdravil in drugih rekombinantnih proteinov (Zahmanova in sod., 2023).

Transgene rastline torej nastanejo z gensko modifikacijo, namen njihove pridelave pa je pridobiti vrsto, sorto z idealnimi lastnostmi ter visokim in kakovostnim pridelkom. Proces vključuje inženiring rastlin za izražanje terapevtskih beljakovin, protiteles in encimov, ki sicer niso naravno oz. endogeno prisotni ter omogoča natančen nadzor nad izražanjem genov, optimizacijo presnovnih poti in prilagajanjem lastnosti za izpolnjevanje terapevtskih, industrijskih ali kmetijskih potreb (Zahmanova in sod., 2023).

#### **3.1 PREDNOSTI RASTLINSKIH SISTEMOV**

Rastline so prednostna platforma predvsem zato, ker predstavljajo varnejšo alternativo tradicionalnim metodam, saj ne vsebujejo patogenih organizmov, ki bi lahko ogrozili človeško zdravje. Med proizvodnjo zato ni tveganja za kontaminacijo z virusi ali prioni, kar povečuje varnost končnega proizvoda (Sharma in sod., 2021). Gojimo jih na prostem ali v enostavnih rastlinjakih, ki uporabljajo poceni in nezahtevno opremo. To med drugim omogoča velik obseg proizvodnje, saj je pridelava enostavna. Ker njihovo gojenje ne zahteva sterilnega okolja ali dragih medijev je postopek stroškovno učinkovit in ugoden (Márquez-Escobar in sod., 2016). Rastline imajo tudi evkariontsko endomembrano (organeli, kot so jedro, endoplazemski retikulum, golgijev aparat, vezikli...), ki jim omogoča izvajanje posttranslacijskih modifikacij, ki so pomembne za delovanje, strukturo in stabilnost beljakovin. Vključujejo procese, kot so glikozilacija, fosforilacija in druge kemične spremembe, ki nastopijo po sintezi beljakovin. To je pomembno, saj pravilne posttranslacijske modifikacije zagotovijo ustrezno farmakološko aktivnost rekombinantnih proteinov, da so le-ti učinkoviti kot cepiva ali terapevtski proteini (Esqueda in Chen, 2021).

Ena izmed prednosti rastlinskih sistemov je prav tako proizvodnja peroralnih cepiv. Rastline v tem primeru delujejo kot bioreaktorji za proizvodnjo antigenov ali terapevtskih proteinov,

njihove užitne dele pa se nato uporabi kot zdravilo. Ta način ne zahteva uporabe injekcij, zato ni potrebe po usposobljenem zdravstvenem osebju, ne prihaja do bolečin ob vbodu in reakcij na vbodnem mestu ter omogoča lažjo distribucijo (Márquez-Escobar in sod., 2016).

### 3.2 POMANKLJIVOSTI IN IZZIVI RASTLINSKIH SISTEMOV

Kljub številnim dobrim lastnostim rastlinskih sistemov, pa je potrebno omeniti tudi njihovo negativno plat in izzive, s katerimi se je potrebno spopasti. Za razvoj cepiva je na primer zelo pomembna izbira antigena in rastlinskega ekspresijskega gostitelja. Izbran antigen mora sprožiti ustrezen imunski odziv v telesu, prav tako pa mora biti združljiv z izbranimi gostiteljskimi rastlinami, da ga le-te lahko izražajo. V procesu proizvodnje cepiva lahko nato pride do problemov v količini in kakovosti antigena v vsakem odmerku cepiva, ki se seveda ne sme razlikovati, saj lahko to vodi do neučinkovitega ali prekomernega imunskega odziva. Proizveden odmerek se lahko razlikuje že znotraj rastlin iste vrste, zaradi različnih velikosti in zrelosti sadežev ali rastlin, do razlik pa lahko pride tudi med različnimi generacijami (Laere in sod., 2016).

Cilj cepiv na rastlinski osnovi je izdelava stabilnih in učinkovitih cepiv, ki so varna ter hkrati zmanjšajo stroške proizvodnje, zato je med proizvodnjo potrebno delovanje v skladu s postopki dobre proizvodne prakse (GMP). Upoštevanje teh standardov, je včasih težavno, saj je potreben dober nadzor nad gojenjem, predelavo, izolacijo in čiščenjem, kar je lahko bolj zapleteno kot pri tradicionalnih proizvodnih metodah oziroma sistemih. Možna kompleksnost pridobivanja in prečiščevanja aktivnih snovi iz rastlin ali potreba po dodatnih postopkih pa lahko tudi podaljša čas proizvodnje in poveča stroške (Laere in sod., 2016).

## 4 PROIZVODNJA TANSGENEGA CEPIVA PROTI SARS-CoV-2

Proizvodnja cepiv na osnovi rastlin vključuje več korakov, ki so ključnega pomena, da dobimo kakovosten končni produkt. Na začetku je zelo pomembna izbira antigena. Pri izdelavi covid cepiva je bil najpogostejše izbran antigen protein S, ki omogoča virusu, da se veže na človeške celice, zaradi česar predstavlja idealno tarčo za protitelesa, ki jih sproži cepivo. Ta nato blokirajo vezavo v receptorskih mestih človeških in virusnih celic ter tako preprečijo okužbo. Protein S je prav tako močno imunogen, zato lahko v telesu sproži učinkovit imunski odziv (Sharma in sod., 2021). Ob izbiri antigena, je pomembna tudi izbira pravilne rastlinske platforme. Pogosto se izbira različne sorte tobaka, krompirja, koruze, paradižnika, alge in številne druge (Rybicki, 2010). V primeru covida je bil največ uporabljen tobak vrste *Nicotiana benthamiana* (Song in sod., 2022). Ko se pripravi nukleotidno zaporedje oziroma gensko sekvenco, ki kodira predhodno izbran antigen, je potrebno le še določiti ustrezno metodo vstavljanja gena v plazmid in izvesti transformacijo posredno ali neposredno. Poznamo dva načina za izražanje transgena v rastlinah in sicer stabilno ter prehodno transformacijo. Kot najbolj potencialne metode za pridobivanje cepiva rastlinskega izvora proti covidu sta se izkazali posredni metodi transformacije z *Agrobacterium tumefaciens* in virusom podobni delci (VLP) (Sharma in sod., 2021).

Po tem koraku transformirane rastline gojimo v kontroliranih razmerah, da zagotovimo optimalno izražanje antigena. Ko rastline dosežejo določeno stopnjo rasti, se jih pobere, in ciljni antigen se ekstrahira iz rastlinskega materiala. Pridobljen antigen gre skozi postopek čiščenja, da se odstranijo nečistoče, kar zajema na primer postopke filtracije, kromatografije in centrifugiranja. Očiščen antigen se nato pripravi v obliki cepiva. V tem koraku se lahko prečiščen antigen združi še z adjuvansom, ki poveča imunski odziv, da je končno cepivo bolj učinkovito (Sharma in sod., 2021).

Pomembna stopnja pri proizvodnji cepiv so tudi testiranja, ki so potrebna, da se oceni varnost, učinkovitost in stabilnost pripravljenega cepiva. Začne se s predkliničnimi študijami na živalih. V predkliničnih testiranjih cepiva proti covidu so bile kot modeli izbrane manjše živali, kot so miši, hrčki in dihurji, saj te predstavljajo nekaj prednosti, kot so lažja oskrba, nižji stroški za vzdrževanje, dostopnost in sposobnost manipulacije na genetskem nivoju (Sharma in sod., 2021). Temu sledijo klinična preizkušanja na ljudeh. Ta vsebujejo tri faze, in sicer I. faza, ki potrdi imunogenost cepiva, II. faza, ki določa ustrezne sheme odmerjanja in imunizacije ter III. faza, ki preizkuša učinkovitost in varnost pri večjem krogu udeležencev. Da se odkrije tako kratkoročne kot dolgoročne učinke, lahko vsaka faza traja več let, nadaljnja farmakovigilanca, ki predstavlja IV. pomarketiško fazo, pa se izvaja tudi po tem, ko cepivo pride na trg (Calvo Fernández in Zhu, 2021).

Celotni postopki priprave cepiva lahko trajajo tudi 10 let ali več, zaradi hitrega izbruha covidu pa je bilo potrebno najti in pripraviti novo zaščito pred virusom v zelo kratkem času. Zaradi takojšnje potrebe se je proces testiranja pospešilo z vzporednim izvajanjem nekaterih faz in skrajšanjem dolžine vsake faze. Da so bili vsi postopki kljub temu dosledno izpeljani, je ameriška zvezna Uprava za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration - FDA) objavila sprejemljive smernice za načrtovanje testiranj za pospešen razvoj cepiva, s čimer so cepiva lahko postala dostopna še pred popolno odobritvijo. Testiranj v III. fazi namreč ni bilo potrebno dokončati, podatke o primernosti cepiva pa so znanstveniki pridobivali sproti med IV. fazo ter iz dodatnih rezultatov faze III. (Calvo Fernández in Zhu, 2021). Sprejete olajšave so omogočile, da je razvoj varnih in učinkovitih cepiv proti COVID-19 potekal le 12 mesecev in ne 5–10 let, kot je to običajno za ostala cepiva (Saville in sod., 2022).

#### 4.1 STABILNA IN PREHODNA TRANSFORMACIJA

Stabilna transformacija je postopek, pri katerem se tuja DNA trajno vključi v genom gostiteljske celice. Vnesena DNA se nato podvojuje skupaj z genomom gostiteljske celice med celično delitvijo in se tako prenaša na potomce ter postane del njihovega dednega zapisa – takšne transformirane celične linije se zato lahko vzdržuje in razmnožuje skozi več generacij. To je uporabno predvsem pri dolgoročnih študijah, kjer je potrebno trajno izražanje vnesenega gena. Želene gene je možno vnesti v rastlino posredno s pomočjo gram negativne bakterije *Agrobacterium tumefaciens* ali neposredno z biolističnim pristopom, elektroporacijo, polietilen glikolom itd. Prehodna transformacija pa je postopek, pri katerem se tuja DNA ne integrira v genom gostiteljske celice in se izraža le začasno. Tuja DNA ostane v celici le za omejen čas, zaradi česar se to metodo uporablja za kratkoročne študije. Med metode predhodne

transformacije uvrščamo na primer elektroporacijo in transformacijo s pomočjo virusov (Mason in Arntzen, 1995).

Kot najbolj potencialni metodi pridobivanja rastlinskega cepiva proti covidu sta se izkazali metodi transformacije z *Agrobacterium tumefaciens* in VLP. Pri transformaciji z *Agrobacterium tumefaciens*, lahko s pomočjo Ti plazmida vnesemo željen gen v gostiteljsko celico, tako da gene, zapisane na T-DNA, zamenjamo z našimi želenimi geni in tako spremenjene Ti plazmide uporabimo kot vektorje za dostavo oziroma vnos ustreznih genov v rastlinski genom (Sharma in sod., 2021). Virusom podobni delci pa ponujajo varen in cenovno ugoden način proizvodnje cepiv, saj ti ne vsebujejo nalezljivega virusnega genomskega zapisa, a še vedno povzročijo zelo močan imunski odziv. Zaradi tega so dober vir za pripravo cepiva proti covidu (Sharma in sod., 2021).

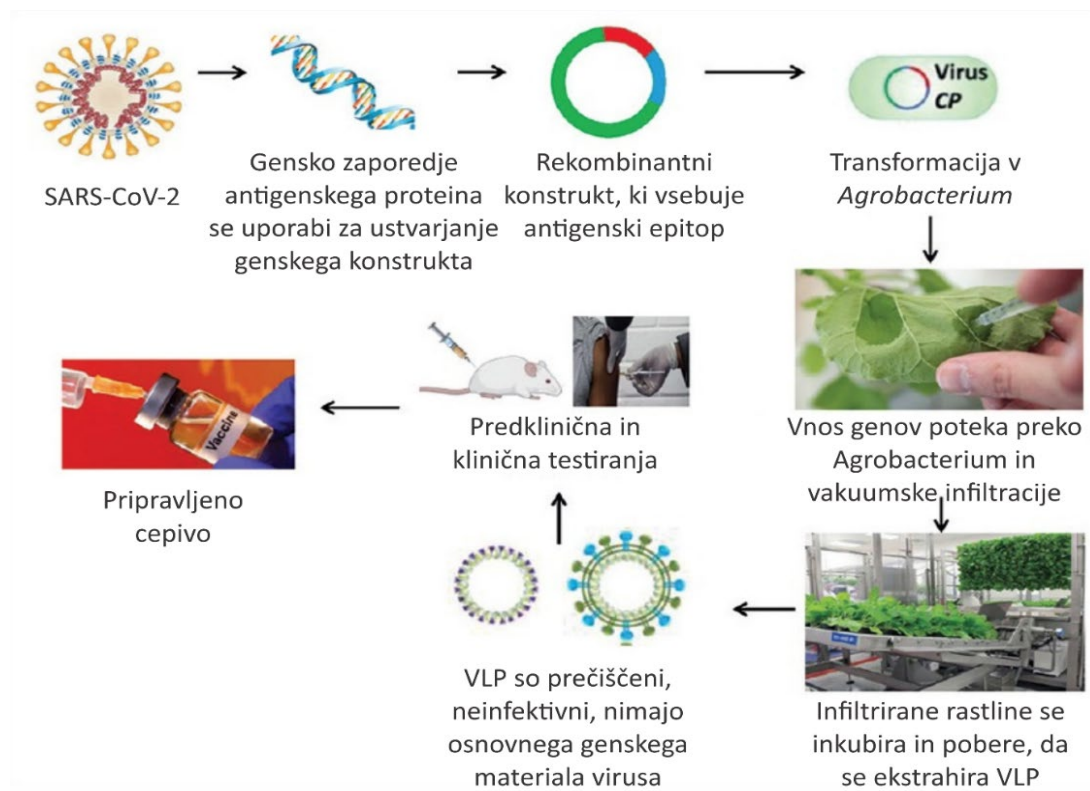
## 5 MEDICAGOVO CEPIVO COVIFENZ PROTI COVID-19

Virusom podobne delce (VLP) je za pripravo covid cepiva uporabljalo biofarmacevtsko podjetje Medicago Inc., ki deluje v Kanadi in je razvilo tudi prvo rastlinsko pridobljeno cepivo proti covidu imenovano Covifenz. Za povečanje učinkovitosti se uporablja skupaj z adjuvansom podjetja GlaxoSmithKline (GSK), kar je bilo odobreno 24. februarja 2022 za uporabo v Kanadi (Government of Canada, 2023).

Za pripravo cepiva so bili uporabljeni listi tobaka vrste *Nicotiana benthamiana* kot bioreaktorji za sintezo proteina S. Ta predstavlja VLP kot kandidat za cepivo COVID-19 VLP (CoVLP). Rekombinantni CoVLP posnema strukturo virusa SARS-CoV-2 in omogoča, da ga naš imunski sistem prepozna ter se nanj odzove na enak način, kot bi se odzval na pravi virus. Ker so VLP neinfektivni, z njimi dosežemo močan imunski odziv, ne da bi bili direktno izpostavljeni virusu (Slika 4) (Sharma in sod., 2021).

Covifenz zahteva cepljenje z dvema odmerkoma v razmaku 21 dni in je namenjeno osebam nad 18 let. Klinična preskušanja so pokazala, da je bilo v začetku prvega tedna po drugem odmerku cepivo 71 % učinkovito pri zaščiti udeležencev, starih od 18 do 64 let. Imunski odziv na cepivo za starostno skupino 65 let in več pa je bil prav tako primerljiv z imunskim odzivom skupine od 18 do 64 let (Government of Canada, 2023).

Kljub dobri statistiki, je bilo cepivo 31. marca 2023 odpoklicano, saj je japonski lastnik podjetja, Mitsubishi Chemical Group prenehal financirati nadaljnje dejavnosti podjetja. Presodili so, da niso več sposobni vlagati v komercializacijo njihovih produktov in se zato odločili prekiniti vse svoje dejavnosti z Medicagom. Čeprav zaprtje naj ne bi bilo neposredno povezano s cepivom proti COVID-19, sta upadanje povpraševanja po novih cepivih in visoka konkurenca morda imeli nekoliko vpliv na potek dogodkov (CBC News, 2023).



Slika 4: Potek uporabe rastlin za proizvodnjo antigenih virusnih proteinov, ki se sestavijo v virusu podobne delce (VLP) in se po čiščenju lahko uporabljajo kot cepiva proti SARS-CoV-2 (prirejeno po Sharma in sod., 2021).

## 6 ZAKLJUČEK

Korona virus SARS-CoV-2 je v zelo kratkem času povzročil globalno zdravstveno krizo, kar je sprožilo intenzivno raziskovanje in razvoj novih terapevtskih pristopov. Pri tem je pomagalo predhodno poznavanje koronavirusov, kamor spada tudi SARS-CoV-2. Je RNA virus, ki kodira štiri strukturne proteine, in sicer bodičaste proteine -S, ovojnico - E, membrano - M in nukleokapsido - N. Izmed teh je bil za pripravo cepiv največ uporabljen protein S, saj lahko protitelesa, ki jih sproži cepivo ciljajo in blokirajo vezavo med človeškimi in virusnimi celicami, ki se vzpostavi preko njegove receptor vezavne domene, ter tako preprečijo okužbo. Prav tako je močno imunogen, zato lahko v telesu sproži učinkovit imunski odziv.

Prva cepiva so bila pripravljena za uporabo že po manj kot enem letu od izbruha SARS-CoV-2. Za enega izmed inovativnejših pristopov so se izkazali rastlinski sistemi za proizvodnjo aktivnih snovi, ki temeljijo na uporabi transgenih rastlin kot bioreaktorjev. Omogočajo pripravo cepiv, monoklonskih protiteles, terapevtskih proteinov ali industrijskih encimov. Transformirane rastline se uporablja predvsem v želji po pridobitvi vrste z idealnimi lastnostmi in visokim donosom, kar pohitri celoten proces proizvodnje. Ena izmed večjih prednosti rastlinskih sistemov je, da ne predstavljajo tveganja za prenos patogenov, ki bi lahko ogrozili človeško zdravje, saj le-ti niso prisotni v rastlinah. Kanadsko podjetje Medicago je kot prvo poslalo na trg svoje rastlinsko cepivo, imenovano Covifenz. Za pripravo so uporabili liste tobaka, v katere so s pomočjo transformacije vnesli gensko sekvenco antigena za SARS-CoV-

2 in tako pridobili virusom podobne delce (VLP). Ti so bili uporabljeni za pripravo cepiva ter omogočili varno in učinkovito sprožitev imunskega odziva brez uporabe živega virusa.

Med pandemijo smo bili priča dobremu sodelovanju raziskovalcev po vsem svetu, ki so s svojimi raziskavami v zelo kratkem času omogočili učinkovito zaščito proti novemu virusu, ki je bila dostopna po vsem svetu. V času omejenih zalog je bil zagotovljen enakopraven dostop do cepiv vsem državam in skupinam prebivalstva, tudi tistim z nižjimi ekonomskimi viri. Pri tem so imele vlogo tudi različne tehnike proizvodnje cepiv, saj so bila nekatera cepiva, ki so se pogosto uporabljala po svetu precej draga. Koncept cepiva na rastlinski osnovi je zato pritegnil vse večjo pozornost, saj je omogočal enostavnejši in cenejši pristop ter hitro prilagodljivost potrebam. Z optimizacijo rastlinskih sistemov se lahko doseže njihovo širšo uporabo ter vlogo pri obvladovanju prihodnjih podobnih pandemij in drugih nalezljivih bolezni.

## 7 VIRI

- Andre M., Lau L. S., Pokharel M. D., Ramelow J., Owens F., Souchak J., Akkaoui J., Ales E., Brown H., Shil R., Nazaire V., Manevski M., Paul N. P., Esteban-Lopez M., Ceyhan Y., El-Hage N. 2023. From Alpha to Omicron: How Different Variants of Concern of the SARS-Coronavirus-2 Impacted the World. *Biology*, 12, 9: 1267, <https://doi.org/10.3390/biology12091267>
- Bernard Stoecklin S., Rolland P., Silue Y., Mailles A., Campese C., Simondon A., Mechain M., Meurice L., Nguyen M., Bassi C., Yamani E., Behillil S., Ismael S., Nguyen D., Malvy D., Lescure F. X., Georges S., Lazarus C., Tabai A., Stempfelet M., Enouf V., Coignard B., Levy-Bruhl D., Investigation team. 2020. First cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in France: surveillance, investigations and control measures. *Euro Surveillance : European Communicable Disease Bulletin*, 25, 6: 2000094, <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000094>
- Burki T. K. 2021. Lifting of COVID-19 restrictions in the UK and the Delta variant. *The Lancet Respiratory Medicine*, 9, 8: e85., [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00328-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00328-3)
- Calvo Fernández E., Zhu L. Y. 2021. Racing to immunity: Journey to a COVID-19 vaccine and lessons for the future. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 87, 9: 3408–3424, <https://doi.org/10.1111/bcp.14686>
- CBC News. 2023. Quebec-based COVID-19 vaccine maker Medicargo to shut down, <https://www.cbc.ca/news/canada/montreal/covid-vaccine-maker-medicargo-shuts-down-1.6735521> (16. avg. 2024)
- COVID-19 vaccination, 2024a. World data WHO, <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases> (17. avg. 2024)
- COVID-19 variants of concern (VOCs). 2024b. Reported to WHO, <https://data.who.int/dashboards/covid19/variants> (4. avg. 2024)
- Davies N. G., Abbott S., Barnard R. C., Jarvis C. I., Kucharski A. J., Munday J. D., Pearson C. A. B., Russell T. W., Tully D. C., Washburne A. D., Wenseleers T., Gimma A., Waites W., Wong K. L. M., van Zandvoort K., Silverman J. D., CMMID COVID-19 Working Group, COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Diaz-Ordaz K., Keogh R., Eggo R. M., Funk S., Jit M., Atkins K. E., Edmunds W. J. 2021. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*, 372, 6538: eabg3055, <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>

- Duong D. 2021. Alpha, Beta, Delta, Gamma: What's important to know about SARS-CoV-2 variants of concern?. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 193, 27: E1059–E1060, <https://doi.org/10.1503/cmaj.1095949>
- Esqueda A., Chen Q. 2021. Development and expression of subunit vaccines against viruses in plants. *Viruses as Therapeutics*, 2021, Humana, New York: 25–38, [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1012-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1012-1_2)
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.617 variants in India and situation in the EU/EEA, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-emergence-sars-cov-2-b1617-variants> (6. avg. 2024)
- Fan Y., Li X., Zhang L., Wan S., Zhang L., Zhou F. 2022. SARS-CoV-2 Omicron variant: recent progress and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7, 1: 141, <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00997-x>
- Government of Canada. 2023. Medicago Covifenz COVID-19 vaccine, <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/covid19-industry/drugs-vaccines-treatments/vaccines/medicago.html> (14. avg. 2024)
- Greaney A. J., Eguia R. T., Starr T. N., Khan K., Franko N., Logue J. K., Lord S. M., Speake C., Chu H. Y., Sigal A., Bloom J. D. 2022. The SARS-CoV-2 Delta variant induces an antibody response largely focused on class 1 and 2 antibody epitopes. *PLOS Pathogens*, 18, 6: e1010592, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010592>
- Grint D. J., Wing K., Williamson E., McDonald H. I., Bhaskaran K., Evans D., Evans S. J., Walker A. J., Hickman G., Nightingale E., Schultze A., Rentsch C. T., Bates C., Cockburn J., Curtis H. J., Morton C. E., Bacon S., Davy S., Wong A. Y., Mehrkar A., Tomlinson L., Douglas I. J., Mathur R., Blomquist P., MacKenna B., Ingelsby P., Croker R., Parry J., Hester F., Harper S., DeVito N. J., Hulme W., Tazare J., Goldacre B., Smeeth L., Eggo R. M. 2021. Case fatality risk of the SARS-CoV-2 variant of concern B.1.1.7 in England, 16 November to 5 February. *Euro Surveillance : European Communicable Disease Bulletin*, 26, 11: 2100256, <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.11.2100256>
- Hassan F., London L., Gonsalves G. 2021. Unequal global vaccine coverage is at the heart of the current covid-19 crisis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 375: n3074, <https://doi.org/10.1136/bmj.n3074>
- Hočevar Grom A., Jeriček Klanšek H., Zdravec K., Brovč M., Ahačič E., Šinko M. 2023. Pandemija covida-19 v Sloveniji. Pandemija covida-19 v Sloveniji. Izsledki presečnih raziskav SI-PANDA 2021 o doživljanju, (duševnem) zdravju, življenjskem slogu, cepljenju in dostopnosti do zdravstvenega sistema. Hočevar Grom A., Jeriček Klanšek H., Belščak Čolaković A., Rehberger M., Lavtar D. Ljubljana, Nacionalni inštitut za javno zdravje: 355, [https://nijz.si/wp-content/uploads/2023/11/Monografija\\_Panda\\_16\\_11\\_23\\_končna\\_obl.pdf](https://nijz.si/wp-content/uploads/2023/11/Monografija_Panda_16_11_23_končna_obl.pdf)
- Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z. L. 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 3: 141–154, <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- King A. 2020. An uncommon cold. *New Scientist*, 246, 3280: 32-35, [https://doi.org/10.1016/S0262-4079\(20\)30862-9](https://doi.org/10.1016/S0262-4079(20)30862-9)
- Kumar A., Singh R., Kaur J., Pandey S., Sharma V., Thakur L., Sati S., Mani S., Asthana S., Sharma T. K., Chaudhuri S., Bhattacharyya S., Kumar N. 2021. Wuhan to World: The COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11: 596201, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.596201>

- Laere E., Ling A. P. K., Wong Y. P., Koh R. Y., Lila M. A. M., Hussein S. 2016. Plant-Based Vaccines: Production and Challenges. *Journal of Botany*, 2016: 4928637, <https://doi.org/10.1155/2016/4928637>
- Liu Y., Liu J., Plante K. S., Plante J. A., Xie X., Zhang X., Ku Z., An Z., Scharton D., Schindewolf C., Menachery V. D., Shi P. Y., Weaver S. C. 2021. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission. *bioRxiv: the preprint server for Biology*, <https://doi.org/10.1101/2021.03.08.434499>
- Logar M. 2020. Koronavirusna bolezen 2019 ali covid-19. Kaj je dobro vedeti? Ljubljana, Lek farmacevtska družba d.d., [https://lek.si/media/witlof/attachments/2021/01/12/16/21/49/Koronavirus\\_SARS-CoV-2\\_kljucne\\_informacije\\_WEB.pdf](https://lek.si/media/witlof/attachments/2021/01/12/16/21/49/Koronavirus_SARS-CoV-2_kljucne_informacije_WEB.pdf) (17. avg. 2024)
- Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N. Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W. J., Wang D., Xu W., Holmes E. C., Gao G. F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395, 10224: 565-574, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Márquez-Escobar V. A., Rosales-Mendoza S., Beltrán-López J. I., González-Ortega O. 2016. Plant-based vaccines against respiratory diseases: current status and future prospects. *Expert Review of Vaccines*, 16, 2: 137–149, <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1232167>
- Mason H. S., Arntzen C. J. 1995. Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends in Biotechnology*, 13, 9: 388-392, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88986-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88986-6)
- Mohammadi M., Shayestehpour M., Mirzaei H. 2021. The impact of spike mutated variants of SARS-CoV2 [Alpha, Beta, Gamma, Delta, and Lambda] on the efficacy of subunit recombinant vaccines. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 25, 4: 101606, <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101606>
- Muthusami R., Saritha K. 2023. Exploratory analysis of SARS-CoV-2 omicron variant and its subvariant propagation: global predominance of BA.1\*, BA.2\*, BA.5\*, BE.1\*, and BQ.1\*. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 89: 664–672, <https://doi.org/10.1007/s43538-023-00176-8>
- Nal B., Chan C., Kien F., Siu L., Tse J., Chu K., Kam J., Staropoli I., Crescenzo-Chaigne B., Eseriou N., van der Werf S., Yuen K. Y., Altmeyer R. 2005. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *The Journal of General Virology*, 86, 5: 1423–1434, <https://doi.org/10.1099/vir.0.80671-0>
- Number of COVID-19 cases. 2024a. Reported to WHO, <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases> (17. avg. 2024)
- Number of COVID-19 deaths. 2024b. Reported to WHO, <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths> (17. avg. 2024)
- Pellenz S. 2022. Handbook SARS-CoV-2: Key Aspects of COVID-19 and Comprehensive Overview of Related Research Reagents. *Antibodies online*, <https://www.antibodies-online.com/resources/16/5501/sars-cov-2-handbook/> (2. avg. 2024)
- Priyadarshi R., Purohit S. D., Roy S., Ghosh T., Rhim J. W., Han S. S. 2022. Antiviral Biodegradable Food Packaging and Edible Coating Materials in the COVID-19 Era: A Mini-Review. *Coatings*, 12, 5: 577, <https://doi.org/10.3390/coatings12050577>

- Rahman M. S., Hoque M. N., Islam M. R., Islam I., Mishu I. D., Rahaman M. M., Sultana M., Hossain M. A. 2021. Mutational insights into the envelope protein of SARS-CoV-2. *Gene Reports*, 22: 100997, <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100997>
- Ren L. L., Wang Y. M., Wu Z. Q., Xiang Z. C., Guo L., Xu T., Jiang Y. Z., Xiong Y., Li Y. J., Li X. W., Li H., Fan G. H., Gu X. Y., Xiao Y., Gao H., Xu J. Y., Yang F., Wang X. M., Wu C., Chen L., Liu Y. W., Liu B., Yang J., Wang X. R., Dong J., Li L., Huang C. L., Zhao J. P., Hu Y., Cheng Z. S., Liu L. L., Qian Z. H., Qin C., Jin Q., Cao B., Wang J. W. 2020. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chinese Medical Journal*, 133, 9: 1015-1024, <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722>
- Rybicki E. P. 2010. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 5: 620–637, <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00507.x>
- Saberian M., Karimi E., Khademi Z., Movahhed P., Safi A., Mehri-Ghahfarrokhi A. 2022. SARS-CoV-2: phenotype, genotype, and characterization of different variants. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27, 1: 50, <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00352-6>
- Saville M., Cramer J. P., Downham M., Hacker A., Lurie N., Van der Veken L., Whelan M., Hatchett R. 2022. Delivering Pandemic Vaccines in 100 Days - What Will It Take?. *The New England Journal of Medicine*, 387, 2: e3, <https://doi.org/10.1056/NEJMp2202669>
- Sethi L., Kumari K., Dey N. 2021. Engineering of Plants for Efficient Production of Therapeutics. *Molecular Biotechnology*, 63, 12: 1125–1137, <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00381-0>
- Sharma P., Mondal H., Mondal S., Majumder R. 2021. Plant-based Vaccines: Potentiality against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 5, 4: 366-373, [https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj\\_185\\_21](https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_185_21)
- Soheili M., Khateri S., Moradpour F., Mohammadzadeh P., Zareie M., Mortazavi S. M. M., Manifar S., Kohan H. G., Moradi Y. 2023. The efficacy and effectiveness of COVID-19 vaccines around the world: a mini-review and meta-analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22, 1: 42, <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00594-y>
- Song S. J., Kim H., Jang E. Y., Jeon H., Diao H. P., Khan M. R. I., Lee M. S., Lee Y. J., Nam J. H., Kim S. R., Kim Y. J., Sohn E. J., Hwang I., Choi J. H. 2022. SARS-CoV-2 spike trimer vaccine expressed in *Nicotiana benthamiana* adjuvanted with Alum elicits protective immune responses in mice. *Plant Biotechnology Journal*, 20, 12: 2298–2312, <https://doi.org/10.1111/pbi.13908>
- Supekar N. T., Shajahan A., Gleinich A. S., Rouhani D., Heiss C., Azadi P. 2020. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Is Decorated With Multiple N- And O- Glycans. *bioRxiv preprint*, <https://doi.org/10.1101/2020.08.26.269043>
- Tai L., Zhu G., Yang M., Cao L., Xing X., Yin G., Chan C., Qin C., Rao Z., Wang X., Sun F., Zhu Y. 2021. Nanometer-resolution in situ structure of the SARS-CoV-2 postfusion spike protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118, 48: e2112703118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2112703118>
- Tegally H., Wilkinson E., Giovanetti M., Iranzadeh A., Fonseca V., Giandhari J., Doolabh D., Pillay S., San E. J., Msomi N., Mlisana K., von Gottberg A., Walaza S., Allam M., Ismail A., Mohale T., Glass A. J., Engelbrecht S., Van Zyl G., Preiser W., Petruccione F., Sigal A., Hardie D., Marais G., Hsiao N. Y., Korsman S., Davies M. A., Tyers L., Mudau I., York D., Maslo C., Goedhals D., Abrahams S., Laguda-Akingba O., Alisoltani-Dehkordi A., Godzik A., Wibmer C. K., Sewell B. T., Lourenço J., Alcantara L. C. J., Pond S. L. K., Weaver S., Martin D., Lessells R. J., Bhiman J. N., Williamson C., de Oliveira T. 2021. Detection of a

- SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*, 592, 7854: 438–443, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>
- Walls A. C., Park Y. J., Tortorici M. A., Wall A., McGuire A. T., Veesler, D. 2020. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181, 2: 281–292.e6., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang P., Casner R. G., Nair M. S., Wang M., Yu J., Cerutti G., Liu L., Kwong P. D., Huang Y., Shapiro L., Ho D. D. 2021. Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. *Cell Host & Microbe*, 29, 5: 747–751.e4., <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.007>
- Wu Y., Kang L., Guo Z., Liu J., Liu M., Liang W. 2022. Incubation Period of COVID-19 Caused by Unique SARS-CoV-2 Strains: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Network Open*, 5, 8: e2228008, <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.28008>
- Zahmanova G., Aljabali A. A. A., Takova K., Minkov G., Tambuwala M. M., Minkov I., Lomonosoff G. P. 2023. Green Biologics: Harnessing the Power of Plants to Produce Pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 24: 17575, <https://doi.org/10.3390/ijms242417575>
- Zhou D., Dejnirattisai W., Supasa P., Liu C., Mentzer A. J., Ginn H. M., Zhao Y., Duyvesteyn H. M. E., Tuekprakhon A., Nutalai R., Wang B., Paesen G. C., Lopez-Camacho C., Slon-Campos J., Hallis B., Coombes N., Bewley K., Charlton S., Walter T. S., Skelly D., Lumley S. F., Dold C., Levin R., Dong T., Pollard A. J., Knight J. C., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S., James W., Carroll M. W., Klenerman P., Barnes E., Dunachie S. J., Fry E. E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D. I., Screaton G. R. 2021. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell*, 184, 9: 2348–2361.e6., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.037>
- Zhou P., Yang X. L., Wang X. G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H. R., Zhu Y., Li B., Huang C. L., Chen H. D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R. D., Liu M. Q., Chen Y., Shen X. R., Wang X., Zheng X. S., Zhao K., Chen Q. J., Deng F., Liu L. L., Yan B., Zhan F. X., Wang Y. Y., Xiao G. F., Shi Z. L. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579, 7798:270–273, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

## PROTITUMORSKO DELOVANJE NEKATERIH RASTLINSKIH BIOAKTIVNIH UČINKOVIN

Gaja Piškurič

### IZVLEČEK

Nekatere rastlinske bioaktivne učinkovine imajo pomembno protitumorsko vlogo pri zdravljenju rakavih obolenj. Vključene so v številne predklinične in klinične študije, nekatere pa so že odobrene s strani Uprave za hrano in zdravila (Food and Drug Administration - FDA). Delujejo tarčno, ker so vključene v številne celične signalne poti in lahko preko različnih mehanizmov izzovejo programirano celično smrt tumorskih celic. Nekatere od njih, kot so: kurkumin, paklitaksel, kamptotekin, homoharingtonin in rožmarinska kislina, imajo temeljito proučene mehanizme protitumorskega delovanja. V programirano celično smrt (apoptozo) rakavih celic vodi tarčno delovanje omenjenih rastlinskih bioaktivnih učinkovin, ki negativno deluje na mikrotubule in encime: topoizomerozo I, DNA metiltransferazo, telomerozo in heksokinazo II. Poleg tega interagirajo s CD44 receptorjem, onemogočajo podaljševanje v procesu sinteze beljakovin zaradi vezave na mesto A v veliki ribosomalni podenoti, povzročijo dvig proapoptotičnih proteinov in zmanjšanje vsebnosti antiapoptotičnih proteinov idr. Za izboljšanje na področju zdravljenja rakavih obolenj z rastlinskimi bioaktivnimi učinkovinami je potrebno izvesti še mnogo raziskav in optimizirati parametre farmakokinetike, vodotopnosti, stabilnosti v *in vivo* sistemu, biološke razpoložljivosti in absorpcije. Trenutno so zelo perspektivne in nudijo dragocen, obsežen in raznolik vir mehanizmov za supresijo tumorogeneze in možnosti povečanja izbire na področju bioloških zdravil.

**Ključne besede:** bioaktivne učinkovine, kurkumin, paklitaksel, kamptotekin, homoharingtonin, rožmarinska kislina, rakava obolenja, zdravljenje, protitumorsko delovanje, apoptoza

### Antitumor activity of some plant bioactive compounds

#### Abstract

Some plant bioactive compounds have an important antitumor role in the treatment of cancer. They are included in numerous preclinical and clinical studies and some have already been approved by the Food and Drug Administration (FDA). They act in a targeted manner because they are involved in several cellular signaling pathways, thus inducing programmed cell death of tumor cells through various mechanisms. Some of them, such as: curcumin, paclitaxel, camptothecin, homoharringtonine and rosmarinic acid, have thoroughly studied mechanisms of antitumor action. Programmed cell death (apoptosis) of cancer cells is led by the targeted action of the aforementioned plant bioactive compounds, which negatively affects microtubules and enzymes: topoisomerase I, DNA methyltransferase, telomerase, and hexokinase II. In addition, they interact with CD44 receptors, prevent prolongation in protein synthesis due to binding at site A in the large ribosomal subunit, cause an increase of pro-apoptotic proteins and reduction of anti-apoptotic proteins etc. To improve cancer treatment with plant bioactive compounds, many more studies are needed to optimize the parameters of pharmacokinetics, water solubility,

stability in *in vivo* systems, bioavailability and absorption. Currently they are very promising and provide a valuable, extensive and diverse source of mechanisms for tumorigenesis suppression as well as many possibilities to increase choices in the field of biologic drugs.

**Key words:** bioactive compounds, curcumin, paclitaxel, camptothecin, homoharringtonine, rosmarinic acid, cancer diseases, treatment, antitumor activity, apoptosis

## 1 UVOD

Rastline so pomemben vir zdravju koristnih snovi, spekter njihove uporabe v humani medicini pa je zelo obsežen in raznolik. V večini primerov, ko govorimo o rastlinskih bioaktivnih in za človeka zdravih komponentah, gre za sekundarne metabolite, ki jih rastline sintetizirajo v procesih sekundarnega metabolizma. To so organske molekule, ki so razdeljene v skupine na osnovi biosinteznih poti, v katerih se sintetizirajo oziroma glede na strukturne podobnosti.

Med predstavnike sekundarnih metabolitov so uvrščeni alkaloidi, flavonoidi, terpenoidi, polifenoli in še mnogi drugi. Ti imajo kot antimitotiki v zadnjem obdobju pomembno vlogo pri zdravljenju rakavih obolenj, saj med drugim vplivajo na dinamiko (de)polimerizacije mikrotubulov ter tako inhibirajo postopke mitoze, vplivajo na kontrolne točke in potek celičnega cikla ter ga v določeni fazi ustavijo, inhibirajo postopke angiogeneze, izzovejo procese apoptoze rakavih celic ter inducirajo procese avtofagocitoze. Učinki rastlinskih bioaktivnih učinkovin pa rezultirajo v skupnem, željenem cilju, kar je seveda supresija tumorigeneze.

Odkrivanje novih rastlinskih biološko aktivnih molekul, njihova izolacija, preučevanje in nenazadnje uporaba pomembno pripomorejo k zmanjševanju oziroma omejevanju problematike rakavih obolenj, ki sodijo med najbolj razširjene bolezni današnjega sveta in so uvrščena med bolezni, ki najpogosteje vodijo v smrt. Zavedanje pomembnosti razumevanja in razvoja postopkov zdravljenja rakavih obolenj je ključno za kakovostno in zdravo življenje celotne družbe.

S pomočjo biološko aktivnih molekul rastlinskega izvora lahko zdravimo različne oblike raka, kot so rak: debelega črevesja, jajčnikov, dojk, danke, ledvic, mehurja, limfom ter mnoge druge.

## 2 RASTLINSKE BIOAKTIVNE UČINKOVINE

Rastlinske bioaktivne učinkovine kot tipični produkt sekundarnega metabolizma za rast, razvoj in reprodukcijo rastlin niso bistvenega pomena, saj je za osnovne življenjske funkcije rastlin odgovoren primarni metabolizem. Vsekakor pa jim sinteza in skladiščenje bioaktivnih učinkovin nudi mnoge prilagoditvene prednosti v okolju, saj jih lahko obvarujejo pred neugodnimi okoljskimi razmerami, kot so ekstremne temperature in slanost, z njimi se lahko branijo pred rastlinojedci, bakterijskimi in glivnimi patogeni, virusnimi in viroidnimi obolenji, kot tudi varujejo svoja rastišča pred vdorom in rastjo konkurenčnih rastlin, da jih le-te ne morejo izriniti. Da rastlina s transpiracijo ne izgubi sintetiziranih bioaktivnih učinkovin, so hidrofobne narave. Že od nekdaj so bile predmet zanimanja v okviru zdravljenja različnih

humanih bolezenskih stanj v tradicionalni medicini, v zadnjem času pa se skuša mehanizme njihovega delovanja čim bolj poglobljeno preučiti in razumeti. Spekter uporabe rastlinskih bioaktivnih učinkovin je izredno širok, saj delujejo protimikrobno, protivnetno, antioksidativno, pripomorejo k celjenju ran imajo dokazane zdravilne učinke na različne oblike raka (Ramakrishna in sod., 2021). V nadaljevanju sledi predstavitev petih izbranih rastlinskih bioaktivnih učinkovin.

## 2.1 KURKUMIN

Kurkumin je polifenol, pridobljen iz korenike kurkume (*Curcuma longa*) in je široko uporabljen ter močno uveljavljen v tradicionalni kitajski medicini. Študije so pokazale, da kurkumin deluje protivnetno, antioksidativno, ima raznovrstne farmakološke učinke ter kar je najpomembneje, ima visok protitumorski potencial. Kurkumin za zdravljenje rakavih obolenj ni odobren s strani Uprave za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration - FDA), zaradi njegovega protitumorskega potenciala pa se izvajajo mnoge predklinične in klinične študije. V nadaljevanju sem se osredotočila na raziskave, vezane na uporabo kurkumina za zdravljenje raka debelega črevesa in danke (kolorektalni rak).

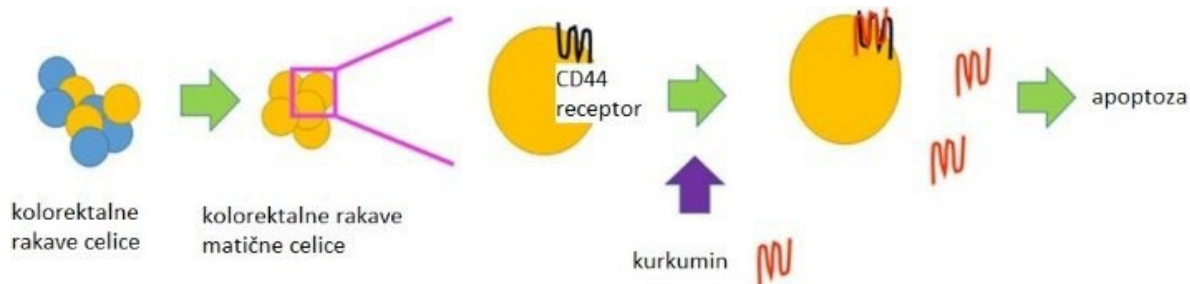
Predklinične študije potrjujejo, da kurkumin inhibira celično proliferacijo z zaustavitvijo celičnega cikla v fazi G2/M in delno tudi v fazi G1 (Lim in sod., 2014). Dokazano je, da uporaba kurkumina v rakavih kolorektalnih celicah (kot tudi pri drugih rakavih celicah) vodi v apoptozo zaradi povečanega nastajanja reaktivnih kisikovih zvrsti. Visoka raven reaktivnih kisikovih zvrsti, kot so: hidroksi radikal, superanionski radikal ter vodikov peroksid, pripelje do porušanja integritete mitohondrijske membrane in uničenja DNA, kar na koncu rezultira v apoptozi rakavih kolorektalnih celic. Inducirano je izražanje proteina P53, ki vodi v povišanje vsebnosti proteina BAX (pro-apoptotični protein) in zmanjšanje vsebnosti BCL-2 proteina (anti-apoptotični protein), kar rezultira v kasnejšem sproščanju citokroma C in aktivaciji kaspaze 3, slednja pa je odgovorna za apoptozo (Ismail in sod., 2019).

Li in sod. (2007) so v predklinični študiji primerjali protitumorsko delovanje kurkumina v liposomski obliki in standardnega kemoterapevtskega sredstva oksaliplatina pri kolorektalnem raku. Pri s kurkuminom napolnjenih liposomih je bilo vzpostavljeno razmerje 10:1 (lipidi : kurkumin). Študija je pokazala, da je liposomski kurkumin induciral od odmerka odvisno inhibicijo rasti rakavih celic in apoptozo *in vitro*, v *in vivo* pa inhibicijo rasti tumorja ter antiangiogeni učinek. Liposomski kurkumin je povzročil večji antiproliferativni učinek kot oksaliplatin v rakavi kolorektalni celični liniji LoVo in rakavi celični liniji debelega črevesa Colo25 (Wong in sod., 2019).

Heksokinaza je ključni encim, ki katalizira prvi korak pri glikolizi, saj prenese fosfatno skupino iz molekule ATP na glukozo, da nastane glukoz-6-fosfat. Ugotovljeno je bilo, da se heksokinaza II veže na mitohondrije tako, da interagira z napetostno odvisnimi anionskimi kanali (ang. VDAC) in ta interakcija je pomembna za mitohondrijsko homeostazo. Rakave celice se intenzivneje vključujejo v glikolizo za pridobivanje energije v obliki ATP, zato se v rakavih celicah znatno poveča odstotek vezave heksokinaze na mitohondrije, in sicer približno

80% encimov heksokinaza II je v interakciji z mitohondriji. Iz tega vidika je heksokinaza II pomembna tarča v procesu razvoja zdravil proti raku, pri čemer se mnoge študije osredotočajo na kurkumin. V celičnih linijah HCT116 in HT29 človeškega kolorektalnega raka je kurkumin zmanjšal izražanje in aktivnost heksokinaze II (HKII) in povzročil disociacijo omenjenega encima od mitohondrijev, kar je rezultiralo v mitohondrijsko posredovani apoptozi (Wang in sod., 2015).

Znano je, da ima celični glikoproteinski receptor CD44 pomembno vlogo pri adheziji rakavih celic in širjenju raka v debelem črevesu, kar potrjuje kritično vlogo CD44 receptorja pri razvoju kolorektalne epitelne neoplazije. Prekomerna ekspresija CD44 receptorja na kolorektalnih matičnih celicah predstavlja pomemben indikator, ki opozarja, da gre za zgodnji dogodek v procesu nastajanja rakavih celic debelega črevesa in danke. Abnormalna ekspresija CD44 receptorja je lahko povezana z oddaljenimi metastazami kolorektalnega raka (O'Brien in sod., 2009). Pri regulaciji omenjenih kolorektalnih rakavih matičnih celic s prekomerno zastopanostjo receptorja CD44 ima pomembno vlogo kurkumin. Kurkumin se veže na transmembranski glikoproteinski receptor CD44 na celični membrani kolorektalnih rakavih matičnih celic, interakcija kurkumina s CD44 receptorjem pa blokira transport glutamina v omenjene celice. Posledica je nizka raven glutamina in indukcija apoptoze celic (Huang in sod., 2016). Opisani mehanizem prikazuje Slika 1.



Slika 1: Signalizacija apoptoze kolorektalnih rakavih matičnih celic preko interakcije kurkumina z receptorjem CD44 (prirejeno po Huang in sod., 2016)

## 2.2 PAKLITAKSEL

Paklitaksel nedvomno sodi med najpomembnejše kemoterapevtike rastlinskega izvora, saj je njegov mehanizem delovanja stabiliziranja mikrotubulov zelo dobro preučen. S strani FDA je odobren za zdravljenje širokega spektra rakavih obolenj, kot so rak dojke, jajčnikov ter pljuč, kot tudi za zdravljenje Kaposijevega sarkoma. V okviru nenamenske uporabe (ang. off-label use) pa je uveljavljen pri zdravljenju raka endometrija, materničnega vratu, prostate, glave in vratu, kot tudi pri zdravljenju sarkoma, limfoma in levkemije (Weaver, 2014).

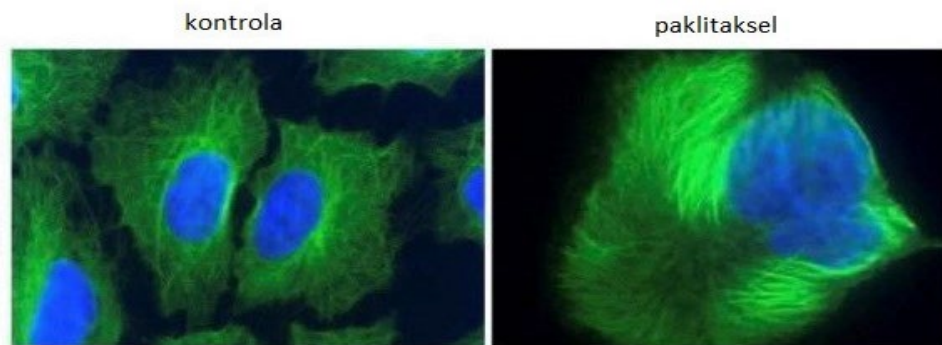
Paklitaksel je predstavnik družine taksanov, ki pa se je v kontekstu kemoterapevtskega zdravljenja izkazala kot najpomembnejša skupina rastlinskih sekundarnih metabolitov. Uporaba taksanov v splošnem rezultira v najučinkovitejših protitumorskih terapijah, zlasti pa je njihova uporaba nepogrešljiva pri zdravljenju trojno negativnega raka dojke. Leta 1971 so Wani in sod. pridobili omenjeno bioaktivno učinkovino, poznano tudi pod imenom taksol, iz

izvlečka lubja pacifiške zimzelene tise *Taxus brevifolia* s severozahodnega Pacifika. Kmalu po odkritju so bile opisane protitumorske lastnosti učinkovine, zlasti njeno antilevkemično delovanje (Wani in sod., 1971). Nekaj let pozneje so Schiff in sod. (1979) odkrili, da taksol s stabilizacijo celičnih mikrotubulov znatno zmanjša delitev celic humane rakave celične linije HeLa.

Ekstrakcija paklitaksela iz vzorcev tise *T. brevifolia* je bila izvedena s pomočjo etanola z razdelitvijo etanolnega ostanka med vodo in kloroformom. Za čiščenje in izolacijo je bilo potrebno veliko število Craigovih protitočnih porazdelitev, pri katerih je zadnja vključevala 400-cevno Craigovo protitočno porazdelitev. S to metodo je bilo izolirano približno 0,5 grama učinkovine (Wani in sod., 1971) iz začetnih 12 kg na zraku posušenega stebela in lubja *T. brevifoliae*. Dobljeni izkoristek je bil približno 0,004 %. Vsi izvedeni koraki so bili spremljani z *in vivo* biološkim testom za ugotavljanje inhibicije tumorja, imenovanega Walker-256 intramuskularni podganji karcinosarkom. Višja očiščenost paklitaksela se je odražala v povečanem protitumorskem delovanju pri nižjih odmerkih. Koraki izolacije so bili zahtevni, a je blaga protitočna porazdelitvena metodologija preprečila izgube in spremembe bioaktivne učinkovine (Wani in Horwitz, 2014).

Takoj za uspešno izolacijo paklitaksela v čisti obliki je sledilo raziskovanje njegove strukture z razpoložljivimi spektroskopskimi metodami. Metode ultravijolične, infrardeče ter masne spektrometrije so bile v poznih šestdesetih letih prejšnjega stoletja v precej napredni razvojni fazi, spektroskopija z jedrsko magnetno resonanco pa je bila v primerjavi s sedanjo sofisticirano opremo in postopki relativno primitivna (Wani in Horwitz, 2014). Določitev strukture paklitaksela se je izkazala za izjemno težko nalogo. S kombinacijo masne spektrometrije in elementarne analize je bila določena molekulska formula zdravila paklitaksel;  $C_{47}H_{51}NO_{14}$  (Wani in sod., 1971). Na osnovi podatkov  $^1H$ -NMR spektrometrije in biogenetskih analiz je paklitaksel definiran kot diterpenoid s taksanskim skeletom, na katerega je pritrjenih več estrov (Wani in Horwitz, 2014).

Izjemno pomemben mehanizem delovanja paklitaksela je vezava na beta-tubuline v strukturi celičnega citoskeleta iz mikrotubulov in s tem stabilizacija mikrotubulov, ki onemogoča njihovo depolimerizacijo na osnovne gradbene elemente, alfa-tubuline in beta-tubuline. Pri hitro delečih rakavih celicah preprečevanje depolimerizacije mikrotubulov zaradi paklitaksela predstavlja moteno dinamiko izgradnje in razgradnje mikrotubulov, ta dinamika pa je nedvomno ključna v kontekstu uspešnosti procesov celičnih delitev (mitoze), signalizacije ter transporta znotrajceličnih komponent. S preprečitvijo depolimerizacije mikrotubulov je celica obsojena na smrt, saj mikrotubuli med mitozo niso več sposobni ustrezno razdeliti in premakniti sestrskih kromatid kromosomov, kot to poteka v nemoteni celici (Gallego-Jara in sod., 2020). Iz Slike 2 so razvidni obširni snopi mikrotubulov pri A549 celični liniji (humane epitelne celice pljučnega karcinoma), zdravljeni s paklitakselom, v primerjavi s kontrolo, pri kateri nemoteno poteka mitoze. Kromosomi so obarvani modro.



Slika 2: Delovanje paklitaksela na mikrotubule (zeleno) in neuspešen premik sestrskih kromatid kromosomov (modro) pri celični liniji A459 v primerjavi s kontrolo (prirejeno po Wani in Horwitz, 2014)

Kot že rečeno je paklitaksel izredno učinkovito protitumorsko sredstvo, problem pa je aplikacija zdravila, saj gre za učinkovino s slabo topnostjo v vodnem mediju. Pri uveljavljenem intravenskem dajanju zdravila gre za formulacijo v nevodnem nosilcu, ki vsebuje Cremophor EL (polietoksilirano ricinusovo olje) in etanol v razmerju 1:1. Ta mešanica se za aplikacijo zdravila razredči s fiziološko raztopino ali raztopino dekstroze in je v zaprtih vialah stabilna 5 let pri 4 °C. Takšna formulacija lahko povzroči alergijske reakcije in precipitacijo pri vodni razredčitvi. Neželeni učinki, ki jih povzroča Cremophor EL, pa vključujejo preobčutljivostne reakcije, nefrotoksičnost in nevrotoksičnost. Slabost je predvsem v tem, da je količina Cremophorja, potrebnega za dostavo zahtevanih odmerkov paklitaksela, znatno višja kot pri uporabi s katerim koli drugim zdravilom na trgu. Zaradi izpostavljenega problema ter številnih drugih omejitev je ključen razvoj alternativnih formulacij paklitaksela z dobro topnostjo v vodi in hkrati brez kakršnih koli stranskih učinkov. Gre za uporabo različnih pristopov, ki vključujejo sotopila, emulzije, micele, liposome, ciklodekstrine, neliposomske lipidne nosilce (mikrosfere, nanokapsule) in mnoge druge (Singla in sod., 2002).

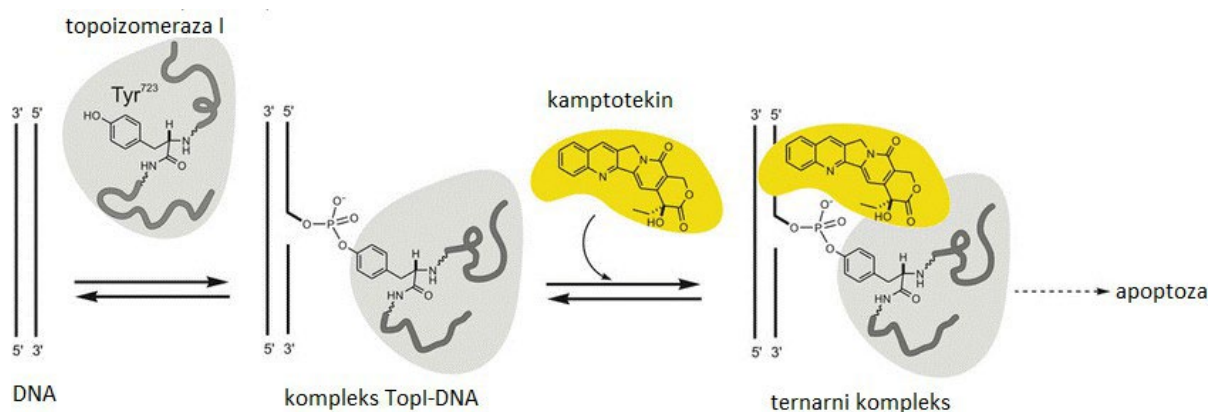
### 2.3 KAMPTOTEKIN

Kamptotekin (CPT) je pentaciklični monoterpenski alkaloid, izoliran iz lubja in stebela kitajskega drevesa *Camptotheca acuminata*, ki je znano pod različnimi imeni: srečno drevo, drevo raka, drevo življenja, drevo veselja in izvira iz južne ter osrednje Kitajske (Li in sod., 2017). Ugotovljeno je bilo, da se kamptotekin kopiči tudi v naslednjih rastlinah; *Nothapodytes nimmoniana*, *N. foetida*, *Tabernaemontana heyneana*, *Chonemorpha grandiflora*, *Ophiorrhiza pumila* in *O. rugosa* var. *prostrata* (Kulkarni in sod., 2010). Za pridobitev zadostnih količin kamptotekina za klinično uporabo so se poslužili mnogih tehnik ekstrakcije. Poleg klasičnih ekstrakcijskih tehnik, kot so dinamična maceracija, Soxhlet in ultrazvočna ekstrakcija, za katere so značilni časovno zelo zamudni postopki in nizka učinkovitost, so se kasneje usmerili k učinkovitejšim in hitrejšim ekstrakcijskim metodologijam, kot je ekstrakcija s pomočjo mikrovalov, ekstrakcija s kolonsko kromatografijo ter pospešena ekstrakcija s topilom (Upadhyia in sod., 2014). Izkoristek, pridobljen z omenjenimi ekstrakcijskimi tehnikami, bi bil za vedno večje svetovno povpraševanje s strani farmacevtske industrije po kamptotekinu prenizek, zato je želja po pridobitvi višjega izkoristka vodila v

razvoj alternativnih tehnik, kot sta uporaba celičnih kultur ter sinteza. Poleg problematike nizkega izkoristka pri pridobivanju kamptotekina, bi zaradi povečane uporabe divjih populacij *C. acuminata* in *Nothapodytes nimmoniana* postali ogroženi vrsti (Kulkarni in sod., 2010).

Protirakavo delovanje kamptotekina je bilo potrjeno v *in vitro* raziskavi na modelnih miših z levkemijo (Martino in sod., 2017). V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja je bil klinično odobren za zdravljenje raka želodca in mehurja ter nekaterih vrst levkemije (Li in sod., 2017). Kljub široki terapevtski uporabi tekom let, pa je njegova učinkovitost omejena zaradi slabe vodotopnosti, hitre hidrolize laktonskega obroča *in vivo*, visoke toksičnosti za sesalske celice ter pojava pridobljene odpornosti. Vodotopnost so si tekom kliničnih preskušanj prizadevali povečati z uporabo natrijeve karboksilatne soli, vendar se je uporaba soli izkazala za neučinkovito rešitev, saj se izloča skozi ledvice, kar povzroči hemoragični cistitis, mielosupresijo in gastrointestinalno toksičnost. Omenjene omejitve so izzvale potrebo po razvoju derivatov kamptotekina z izboljšano farmakokinetiko in farmakokinetičnimi parametri (Li in sod., 2006). Analoga kamptotekina, ki sta trenutno odobrena s strani FDA in se uporabljata za zdravljenje rakavih obolenj, sta topotekan in irinotekan. Topotekan se uporablja za zdravljenje raka jajčnikov, materničnega vratu ter drobnoceličnega pljučnega raka. Irinotekan se uporablja za zdravljenje metastatskega kolorektalnega raka in je na seznamu esencialnih zdravil Svetovne zdravstvene organizacije (ang. World Health Organisation - WHO). Tako zdravljenje s topotekanom kot tudi z irinotekanom poteka v obliki intravenskega dajanja zdravila (Martino in sod., 2017).

V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je bil odkrit mehanizem delovanja kamptotekina, ki povzroča inhibicijo encima topoizomeraza I (TopI), ki je ključnega pomena za podvojevanje oziroma replikacijo DNA. Encim TopI je odgovoren za razvitje superzvite oblike DNA zaradi sposobnosti regulacije topologije DNA. Z inhibicijo delovanja encima TopI bo superzvita oblika DNA motila delovanje DNA polimeraze. Natančneje je bilo ugotovljeno, da kamptotekin inhibira kompleks TopI-DNA in ne prostega encima TopI (Li in sod., 2017). Izraženost encima TopI je v rakavih celicah bistveno višja v primerjavi z zdravimi celicami, kar omogoča tarčno selektivnost. Kamptotekin se integrira v kompleks TopI-DNA in tvori ternarni kompleks. V normalnih fizioloških okoliščinah se ravnotežje med nevezano topoizomerozo I in TopI-DNA kompleksom premakne na stran prostega encima, pod vplivom kamptotekina pa se to ravnovesje močno premakne v smeri tvorbe ternarnega kompleksa, kar zmanjša količino prostega encima TopI in tako sčasoma zavre njegovo delovanje (Martino in sod., 2017). Formirani ternarni kompleks velja za oviro replikacijskih vilic DNA. V strukturi replikacijskih vilic nastane dvoverižni zlom in nepovratna zaustavitev replikacije DNA v fazi S/G2 celičnega cikla. Celice v S fazi pa so do 1000-krat občutljivejše na inhibitorje topoizomeraze I kot v fazah G1 ali G2/M, zato se kamptotekin obravnava kot citotoksično sredstvo, specifično za celice v S fazi. Tretiranje rakavih celic s kamptotekinom zavira sintezo DNA kot tudi sintezo RNA, vključno z ribosomsko RNA, s tem pa je proliferacija celic ustavljena, celice so obsojene na apoptozo (Khawwa in sod., 2021). Mehanizem delovanja kamptotekina prikazuje Slika 3, kjer je kamptotekin obarvan rumeno, topoizomeraza I pa sivo.



Slika 3: Mehanizem inhibicijskega delovanja kamptotekina (rumeno) na encim topoizomeraza I (sivo), kar vodi v apoptozo (prirejeno po Kacprzak, 2013)

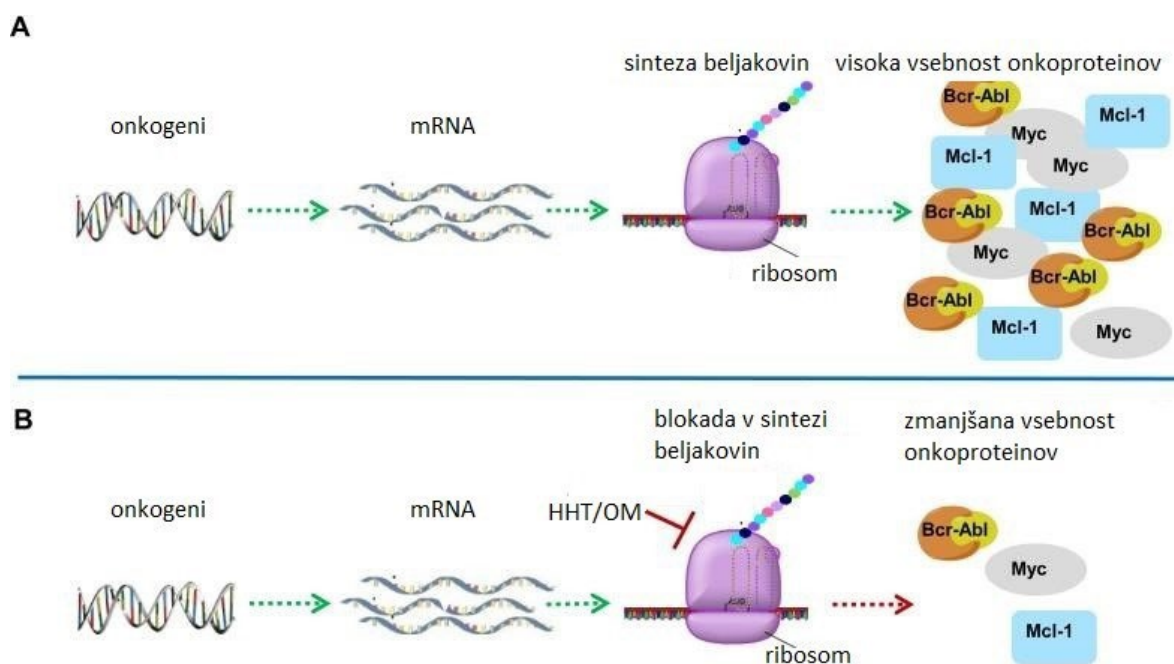
## 2.4 HOMOHARINGTONIN

V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so skupne raziskave kitajskih in ameriških znanstvenikov privedle do ekstrakcije aktivnih spojin iz lubja rodu iglavcev *Cephalotaxus* (slivova tisa). Izvlečki semen *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* na vodni osnovi in pozneje na alkoholni osnovi so v študiji *in vitro* izkazali učinkovito delovanje proti levkemičnim celicam (Khatua in sod., 2024).

Homoharingtonin (HHT) je eden izmed predstavnikov alkaloidov, pridobljenih iz listov, lubja in semen različnih vrst rodu *Cephalotaxus*, kot so *C. harringtonia*, *C. hainanensis*, *C. qinensis*, *C. furtenei* in *C. griffithii*. Kitajski znanstveniki so izvedli raziskavo, ki je potrdila antilevkemično delovanje homoharingtonina pri bolnikih z akutno mieloično levkemijo (AML) in kronično mieloično levkemijo (CML) (Lü in Wang, 2014). Naravno pridobivanje in čiščenje homoharingtonina je povzročilo veliko škodo okolju zaradi zmanjševanja številčnosti omenjenih vrst oziroma genske erozije (Lü in Wang, 2014), poleg tega so si prizadevali za boljšo biološko učinkovitost ter očiščenost zdravila, kar je vodilo v razvoj polsintezne oblike homoharingtonina. Leta 2011 je bil na trgu predstavljen polsintetični derivat omacetaksin mepesukcinat (OM), znan pod komercialnim imenom Synribo, katerega odlikuje 99,7 % čistost (Khatua in sod., 2024), poleg tega pa ima odlično biološko učinkovitost s subkutano uporabo oziroma podkožno aplikacijo (Lü in Wang, 2014). Evropska agencija za zdravila (ang. European Medicines Agency - EMA) in FDA sta odobrili subkutano uporabo omacetaksin mepesukcinata za zdravljenje odraslih bolnikov s kronično mieloično levkemijo v kronični ali pospešeni fazi, ki so intolerantni ali odporni na dva ali več zaviralcev tirozin kinaze (Khazir in sod., 2014).

Glavni mehanizem delovanja homoharingtonina (posledično omacetaksina) je zaviranje procesa podaljševanja pri sintezi beljakovin oziroma prevajanja mRNA v zaporedje aminokislin. Mesto A v veliki ribosomalni podenoti je ključno za dodajanje novih aminokislin preko tRNA k že obstoječi aminokislinski verigi, kar je ob prisotnosti homoharingtonina onemogočeno, saj le-ta tekmuje s tRNA za vezavo na A mesto. Omenjena blokada v sintezi

beljakovin povzroči zmanjšanje vsebnosti beljakovin, zlasti tistih s kratkim razpolovnim časom, celice, odvisne od teh beljakovin pa so tako podvržene apoptozi. Kratkoživi proteini, ključni za preživetje rakavih celic, so na primer Mcl-1, Ciklin D1, c-Myc, XIAP in beta-katenin. Za kronično mieloično levkemijo (CML) je značilno izražanje onkogenega BCR-ABL, ki vodi v nastanek fuzijskega onkoproteina BCR-ABL. Gre za konstantno aktivno tirozin kinazo, ki aktivira več znotrajceličnih signalnih poti, kot so RAS, RAF, MYC in STAT, ta aktivacija pa prispeva k genomski nestabilnosti, nenormalni celični proliferaciji in širjenju celične populacije CML. Tretiranje rakavih celic s homoharingtoninom oziroma omacetaksinom med drugim zmanjša vsebnost tudi BCR-ABL proteina (Winer in DeAngelo, 2018). Opisani mehanizem prikazuje Slika 4.



Slika 4: Mehanizem delovanja homoharingtonina/omacetaksina vodi v zmanjšanje vsebnosti onkoproteinov – B in neprekinjena sinteza onkoproteinov v odsotnosti homoharingtonina/omacetaksina - A (prirejeno po Gandhi in sod., 2014)

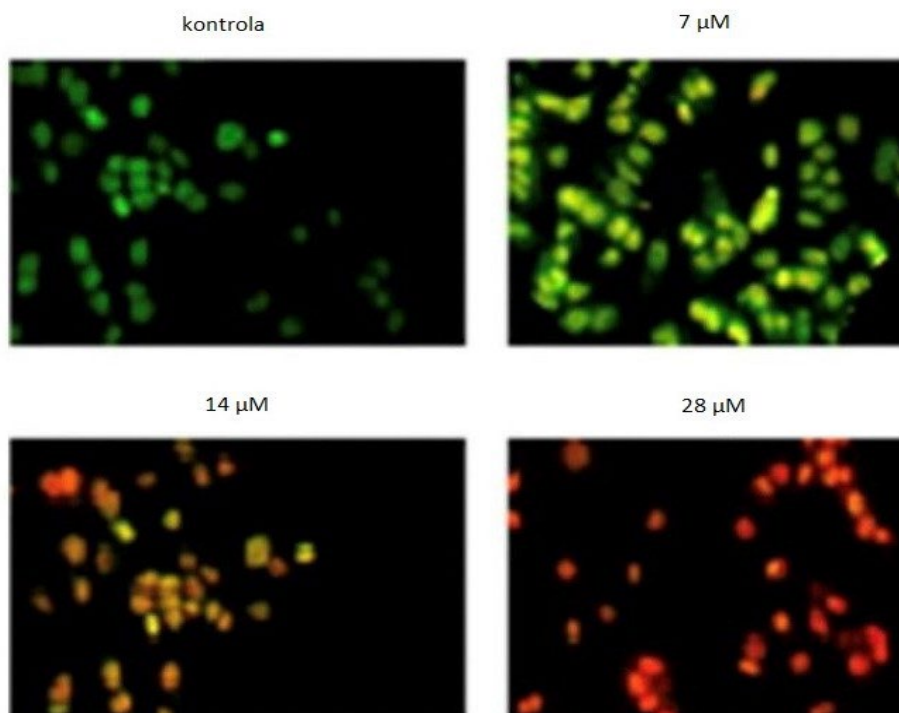
Že dolgo je znano, da se kromosomske telomere tekom celičnih delitev skrajšujejo, za rakave celice pa je značilna proliferativna nesmrtnost zaradi intenzivne aktivnosti telomeraz. V kontekstu zdravljenja rakavih obolenj se zato raziskave osredotočajo na odkrivanje inhibitorjev telomeraz. Xie in sod. (2006) so preučevali inhibicijo aktivnosti telomeraz na celični liniji HL60 (akutna mieloična levkemija) po dodatku homoharingtonina. Dodani so bili različni odmerki (0-500  $\mu\text{g/mL}$ ), celice pa so bile inkubirane 48 ur. Aktivnost telomeraz se je zmanjšala z  $1,056 \pm 0,107$  na  $0,067 \pm 0,023$ , pri čemer je bila inhibicija aktivnosti telomeraz odvisna od časa in odmerka.

## 2.5 ROŽMARINSKA KISLINA

Rožmarinska kislina (RA) je polifenolna kislina, prvič izolirana in identificirana v rožmarinu (*Rosmarinus officinalis*). Kot aktivna sestavina zdravilnih rastlin iz družin ustnatnic

(Lamiaceae) in srhkolistovk (Boraginaceae) je bila najdena in izolirana tudi iz žajblja (*Salvia officinalis*), vrtnega timijana (*Thymus vulgaris*), poprove mete (*Mentha piperita*), navadnega gabeza (*Symphium officinale*) in melise (*Melissa officinalis*). Rožmarinska kislina za zdravljenje rakavih obolenj s strani FDA ni odobrena, zaradi njenega protitumorskega potenciala pa je pomemben predmet raziskav. Pomemben mehanizem delovanja rožmarinske kisline je inhibicija encima DNA metiltransferaza (DNMT). Številni geni, kot so geni, ki sodelujejo pri kontroli celičnega cikla, vnetnem in stresnem odzivu, popravljanju DNA in apoptozi, so utišani zaradi epigenetskega procesa, imenovanega hipermetilacija DNA, ki jo vrši DNMT. Hipermetilacija tumor zavirajočih genov (ang. tumor suppressor genes) predstavlja eno izmed inaktivacijskih poti, ki vodi v karcinogenezo. Ob aktivni DNA metiltransferazi je več tumor zavirajočih genov podvrženih hipermetilaciji promotorja in s tem ne pride do transkripcije teh genov (njihovo utišanje), kar posledično vodi v razvoj tumorjev. DNA metiltransferaze, ki uporabljajo S-adenozil-l-metionin (SAM) kot donor metilne skupine, katalizirajo metilacijo DNA. S pomočjo analiz z različnimi stopnjami selektivnosti do nemetiliranih in hemimetiliranih DNA substratov je bilo ugotovljeno, da pri ljudeh obstaja veliko DNMT encimov. DNMT1 je zadolžen za vzdrževanje metilacijskih vzorcev DNA med celičnimi delitvami in ima boljšo selektivnost do hemimetiliranih substratov DNA. Najučinkovitejši modulator aktivnosti DNA metiltransferaze (do 88% supresija) je rožmarinska kislina (Messeha in sod., 2020).

V eksperimentalni študiji so Jin in sod. (2020) dokazali, da rožmarinska kislina zavira rast celične linije Hep-G2 človeškega raka jeter. Hep-G2 celice so bile tretirane v rangi od 0 do 320  $\mu\text{M}$ , pri čemer je srednja inhibitorna koncentracija ( $\text{IC}_{50}$ ) znašala 14  $\mu\text{M}$ . Tretiranje celic z rožmarinsko kislino je rezultiralo v zmanjšani viabilnosti celic, zavirani celični migraciji in v indukciji apoptoze, kar dokazujejo visoke vrednosti kaspaze-3 ter kaspaze-9, ki imata ključno vlogo pri apoptozi. Za vizualizacijo apoptotičnih rakavih jetrnih celic Hep-G2 je bil izveden test obarvanja z barvilom akridin oranž/etidijev bromid (AO/EB). Celice pri celični gostoti  $2 \times 10^5$  celic/ml so bile gojene 24 ur v ploščah s šestimi vdolbinicami in nato izpostavljene različnim koncentracijam rožmarinske kisline, in sicer: 0, 7, 14 in 28  $\mu\text{M}$  ter inkubirane 24 ur. Nato so 20  $\mu\text{l}$  celične kulture z različnimi koncentracijami rožmarinske kisline nanесли na štiri ločena objektna stekelca in dodali 20  $\mu\text{l}$  barvila AO/EB, sledilo je opazovanje apoptotičnih sprememb pod fluorescenčnim mikroskopom. Rezultati barvanja kažejo, da se je število celic z oranžno/rdečo fluorescenco (apoptotične celice) znatno povečalo s povečevanjem koncentracije RA, netretirane celice oziroma kontrola (0  $\mu\text{M}$  RA) pa so fluorescirale zeleno, torej pri njih do apoptoze ni prišlo (Slika 5). Z uporabo pretočne citometrije so kvantificirali odstotek celic, ki so bile podvržene apoptozi pri vsaki testirani koncentraciji rožmarinske kisline. Višanje koncentracije RA je povečalo odstotek apoptotičnih celic s 5,54 % pri kontroli (0  $\mu\text{M}$  RA) na 5,83 % pri 7  $\mu\text{M}$  RA, na 11,63 % pri 14  $\mu\text{M}$  RA in na 24,68 % pri 28  $\mu\text{M}$  RA.



Slika 5: Test obarvanja celic rakave celične linije Hep-G2 z barvilom akridin oranž/etidijev bromid (AO/EB) po tretiranju s štirimi različnimi koncentracijami (0, 7, 14 in 28  $\mu\text{M}$ ) rožmarinske kisline, ki kaže koncentracijsko odvisnost apoptotičnih celic (rdeče-oranžno) v primerjavi z netretirano kontrolo (zeleno) (prirejeno po Jin in sod., 2020)

Sik in sod. (2020) so v primerjalni študiji metod ekstrakcije rožmarinske kisline iz listov šestih rodovno različnih rastlin ugotavljali optimalne pogoje za doseganje najvišje učinkovitosti ekstrakcije RA. Optimalni parametri različnih ekstrakcijskih metod so bili naslednji: 120 min pri 25 °C za maceracijo z mešalno ekstrakcijo (MAC), 15 min pri vrelišču za ekstrakcijo s toplotnim refluksom (HRE) in 5 min pri 50 °C in 80 °C za ekstrakcijo s pomočjo mikrovalov (MAE). Izkazalo se je, da je mešano topilo  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}(\text{etanol})\text{-H}_2\text{O-HCl}$  (70:29:1, v/v/v) najboljše za vsako izmed uporabljenih metod. Iz vidika izkoristkov je bila metoda MAC najprimernejša za rastline rodov *Melissa officinalis* L. ( $30,0 \pm 0,2$  mg/g), *Mentha piperita* L. ( $16,2 \pm 0,6$  mg/g), *Rosmarinus officinalis* L. ( $9,2 \pm 0,2$  mg/g) in *Salvia officinalis* L. ( $19,6 \pm 0,3$  mg/g) medtem ko je bila metoda HRE najprimernejša za rastline rodov *Thymus vulgaris* L. ( $15,3 \pm 1,2$  mg/g) in *Origanum vulgare* L. ( $40,1 \pm 1,0$  mg/g).

### 3 OMEJITVE RASTLINSKIH BIOAKTIVNIH UČINKOVIN OD ODKRITJA DO UPORABE

Kljub dokazanemu protitumorskemu delovanju oziroma visokemu potencialu za zdravljenje rakavih obolenj, se je za zagotovitev varnega in učinkovitega zdravljenja potrebno spopasti z mnogimi izzivi, ki jih rastlinske bioaktivne učinkovine prinašajo. Med drugim je odobritev zdravil na rastlinski osnovi za komercializacijo omejena tudi zaradi nezadostne količine virov za njihovo pridobivanje. Ker nekaterih bioaktivnih učinkovin trenutno še ni možno sintetizirati v polsintezni obliki, z umetnim *in vitro* gojenjem, npr. mikropropagacijo ali s pomočjo

genskega inženiringa, to povečuje odvisnost od naravnih virov, ki pa lahko vodi v gensko erozijo. Izumrlo naj bi skoraj 25000 rastlin, s čimer smo postavljeni pred bioetično dilemo, povezano s pridobivanjem bioaktivnih spojin rastlinskega izvora. Prav tako na področju zdravljenja rakavih obolenj z rastlinskimi bioaktivnimi učinkovinami še vedno primanjkuje kliničnih podatkov in rezultatov ter poglobljenega razumevanja mehanizmov delovanja. Rastlinske bioaktivne učinkovine lahko povzročajo razne stranske učinke ob njihovi uporabi, problematična je slaba vodotopnost, absorpcija ter biološka razpoložljivost (ang. bioavailability) v telesu (Esmeeta in sod., 2022).

Rastlinske bioaktivne učinkovine morajo dosegati kriterije podobnosti kemijsko sintetiziranim zdravilom, vendar se od njih ločijo v mnogih kemijskih lastnostih. Imajo več kiralnih centrov, sterično kompleksno strukturo, večje število kisikovih atomov, večje število donorjev vodikove vezi, večjo molekulsko maso, večjo raznolikost v sistemu obročev, značilna je strukturna rigidnost. Omenjene značilnosti so v nasprotju z značilnostmi idealnega zdravila, ki ga odlikuje manjša molekulska masa, sterično stabilna in manj rigidna struktura, 5 ali manj donorjev vodikove vezi ter 10 ali manj akceptorjev vodikove vezi. Številne rastlinske bioaktivne učinkovine so biološko učinkovite in izkazujejo impresivne rezultate, ki se tičejo absorpcije, porazdelitve, metabolizma, izločanja in toksičnosti, vendar zaradi neizpolnjevanja omenjenih kriterijev podobnosti zdravilu (ang. drug-likeness) ne bodo prišla v II. fazo kliničnega preskušanja. Gre za glavni dejavnik, ki upočasnjuje razvoj na področju rastlinskih bioaktivnih učinkovin (Esmeeta in sod., 2022).

Veliko težavo pri bioaktivnih učinkovinah rastlinskega izvora predstavlja njihova biološka razpoložljivost. Absorpcija teh učinkovin preko črevesja ni dobro raziskana, v sistemski tekočini niso ustrezno topne zaradi česar je njihova biološka moč vprašljiva, poleg tega niso vse stabilne v sistemskem okolju, kar preprečuje njihovo dostopnost rakavim celicam na terapevtskih ravneh oziroma v terapevtskih koncentracijah. V okviru tovrstne problematike so izjemnega pomena napredne metodologije, kot je inkapsulacija zdravil v mikro in nanokapsulah z uporabo liposomov in micel za boljšo biološko razpoložljivost rastlinskega zdravila. V zadnjem obdobju je bilo veliko zdravil kombiniranih z nano polimeri, nano miceli ter nanokonjugati za tarčno dostavo zdravil v rakave celice, na ta način pa se je lažje spopasti s problemi, ki se nanašajo na razpolovni čas zdravila ter njegovo koncentracijo v krvi. Za dostavo zdravil se aktivno uporabljajo delci hitozana, hialuronski delci, nanodelci silicijevega dioksida ter nanodelci zlata. Omenjeni pristopi, ki jih nudi nanotehnologija, so pomembni tako pri konvencionalnem zdravljenju raka, kot v razvoju in raziskavah uporabe rastlinskih bioaktivnih učinkovin, tudi v namene bioloških zdravil (Esmeeta in sod., 2022).

#### **4 ZAKLJUČEK**

Narava pozna mehanizme za zdravljenje rakavih obolenj, na nas pa je, da jih znamo preučiti, razumeti in nenazadnje izkoristiti sebi v prid. Zaradi mnogih omejitev na poti od odkritja do uporabe varnega, učinkovitega in kakovostnega zdravila, ki vsebuje rastlinsko bioaktivno učinkovino, je potrebno izvesti še mnogo študij na tem področju, nujna je optimizacija mnogih parametrov.

Menim, da so rastlinske bioaktivne učinkovine nepogrešljive tudi v okviru razvoja kemijsko sintetiziranih zdravil proti raku, saj predstavljajo osnovno spojino, temelj, ki nam da splošno, grobo idejo o končni strukturi zdravilne molekule, vodi v nadaljnji razmislek o spremembah molekule, zamenjavi funkcionalnih skupin ipd. Rastlinske bioaktivne učinkovine tako vodijo v razvoj uveljavljenih, s strani FDA odobrenih polsinteznih in sinteznih oblik zdravil; kamptotekin je spodbudil razvoj svojega polsinteznega analoga irinotekana, kot tudi sinteznega analoga topotekana, homoharingtonin pa svojega polsinteznega analoga omacetaksina.

Pregled izbranih rastlinskih bioaktivnih učinkovin; kurkumina, paklitaksela, kamptotekina, homoharingtonina in rožmarinske kisline nam je omogočil razumevanje njihove neposredne vključenosti v številne signalne poti in njihovo regulacijo. Spoznali smo, da preko številnih mehanizmov rastlinske bioaktivne učinkovine delujejo zelo tarčno ter uspešno vodijo v supresijo nastajanja rakavih celic in v njihovo apoptozo.

Kljub izjemnim napredkom in obsežnemu znanju na področju znanosti ter dovršenim postopkom kemijske sinteze zdravil menim, da protitumorski potencial rastlinskih bioaktivnih učinkovin od nekdaj je in vedno bo predmet zanimanja. Verjamem, da se bodo na tem področju dogajali pomembni premiki, ki bodo privedli v nove in nove odobritve zdravil na rastlinski osnovi, ki bodo v pomoč pri razširitvi bioloških zdravil.

## 5 VIRI

- Esmeeta A., Adhikary S., Dharshnaa V., Swarnamughi P., Maqsummiya Z. U., Banerjee A., Pathak S., Duttaroy A. K. 2022. Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113384, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113384>
- Gandhi V., Plunkett W., Cortes J. E. 2014. Omacetaxine: a protein translation inhibitor for treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research*, 20, 7: 1735- 1740, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-1283>
- Gallego-Jara J., Lozano-Terol G., Sola-Martínez R. A., Cánovas-Díaz M., Puente T. de D. 2020. A compressive review about Taxol®: History and future challenges. *Molecules*, 25, 24: 5986, <https://doi.org/10.3390/molecules25245986>
- Huang Y. T., Lin Y. W., Chiu H. M., Chiang B. H. 2016. Curcumin induces apoptosis of colorectal cancer stem cells by coupling with CD44 marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 11: 2247-2253, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05649>
- Ismail N. I., Othman I., Abas F., Lajis N. H., Naidu R. 2019. Mechanism of apoptosis induced by curcumin in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 10: 2454, <https://doi.org/10.3390/ijms20102454>
- Jin B., Liu J., Gao D., Xu Y., He L., Zang Y., Li N., Lin D. 2020. Detailed studies on the anticancer action of rosmarinic acid in human Hep-G2 liver carcinoma cells: evaluating its effects on cellular apoptosis, caspase activation and suppression of cell migration and invasion. *Journal of BUON*, 25, 3: 1383-1389, <https://www.jbuon.com/archive/25-3-1383.pdf> (3.7.2024)
- Kacprzak K. M. 2013. Chemistry and biology of camptothecin and its derivatives. V: *Natural Products*. Ramawat K. G., Merillon J. M. (ur.). Berlin, Springer: 643-682, [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_26)

- Khazir J., Mir B. A., Pilcher L., Riley D. L., 2014. Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters*, 7: 173-181, <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.11.010>
- Khaiwa N., Maarouf N. R., Darwish M. H., Alhamad D. W. M., Sebastian A., Hamad M., Omar H. A., Orive G., Al-Tel T. H. 2021. Camptothecin's journey from discovery to WHO Essential Medicine: Fifty years of promise. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 223: 113639, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113639>
- Khatua S., Nandi S., Nag A., Sen S., Chakraborty N., Naskar A., Güner E. S., Calina D., Acharya K., Rad J. S. 2024. Homoharringtonine: updated insights into its efficacy in hematological malignancies, diverse cancers and other biomedical applications. *European Journal of Medical Research*, 29, 269, <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01856-x>
- Kulkarni A. V., Patwardhan A. A., Lele U., Malpathak N. P. 2010. Production of camptothecin in cultures of *Chonemorpha grandiflora*. *Pharmacognosy Research*, 2, 5: 296-299, <https://doi.org/10.4103/0976-4836.72327>
- Li Q. Y., Zu Y. G., Shi R. Z., Yao L. P. 2006. Review camptothecin: Current perspectives. *Current Medical Chemistry*, 13, 17: 2021-2039, <https://doi.org/10.2174/092986706777585004>
- Li L., Ahmed B., Mehta K., Kurzrock R. 2007. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 4: 1276-1282, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0556>
- Li F., Jiang T., Li Q., Ling X. 2017. Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: Did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer?. *American Journal of Cancer Research*, 7, 12: 2350-2394
- Lim T. G., Lee S. Y., Huang Z., Lim D. Y., Chen H., Jung S. K., Bode A. M., Lee K. W., Dong Z. 2014. Curcumin suppresses proliferation of colon cancer cells by targeting CDK2. *Cancer Prevention Research*, 7, 4: 466-474, <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0387>
- Lü S., Wang J. 2014. Homoharringtonine and omacetaxine for myeloid hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*, 7, 2, <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-2>
- Martino E., Volpe S. D., Terribile E., Benetti E., Sakaj M., Centamore A., Sala A., Collina S. 2017. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, 4: 701-707, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.085>
- Messeha S. S., Zarmouh N. O., Asiri A., Soliman K. F. A. 2020. Rosmarinic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 885: 173419, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173419>
- O'Brien C. A., Kreso A., Dick J. E. 2009. Cancer stem cells in solid tumors: An overview. *Seminars in Radiation Oncology*, 19, 2: 71-77, <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2008.11.001>
- Ramakrishna W., Kumari A., Rahman N., Mandave P. 2021. Anticancer activities of plant secondary metabolites: Rice callus suspension culture as a new paradigm. *Rice Science*, 28, 1: 13-30, <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2020.11.004>
- Schiff P. B., Fant J., Horwitz S. B. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277: 665-667, <https://doi.org/10.1038/277665a0>
- Singla A. K., Garg A., Aggarwal D. 2002. Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 235, 1-2: 179-192, [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00986-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00986-3)

- Sik B., Hanczné E. L., Kapcsándi V., Ajtony Z. 2020. Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six Lamiaceae plants as determined by HPLC-DAD measurement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 184: 113173, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113173>
- Upadhyaya V., Pai S. R., Sharma A. K., Hegde H. V., Kholkute S. D., Joshi R. K. 2014. Compound specific extraction of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* and piperine from *Piper nigrum* using accelerated solvent extractor. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014, 1: 932036, <https://doi.org/10.1155/2014/932036>
- Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93, 9: 2325- 2327, <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>
- Wani M. C., Horwitz S. B. 2014. Nature as a remarkable chemist: A personal story of the discovery and development of Taxol®. *Anticancer Drugs*, 25, 5: 482-487, <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000063>
- Wang K., Fan H., Chen Q., Ma G., Zhu M., Zhang X., Zhang Y., Yu J. 2015. Curcumin inhibits aerobic glycolysis and induces mitochondrial-mediated apoptosis through hexokinase II in human colorectal cancer cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs*, 26, 1: 15- 24, <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000132>
- Weaver B. A. 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 25, 18: 2677-2681, <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0916>
- Winer E. S., DeAngelo D. J. 2018. A review of Omacetaxine: A chronic myeloid leukemia treatment resurrected. *Oncology and Therapy*, 6, 1: 9-20, <https://doi.org/10.1007/s40487-018-0058-6>
- Wong K. E., Ngai S. C., Chan K. G., Lee L. H., Goh B. H., Chuah L. H. 2019. Curcumin nanoformulations for colorectal cancer: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 10: 152, <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00152>
- Xie W. Z., Lin M. F., Huang H., Cai Z. 2006. Homoharringtonine-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells is associated with down-regulation of telomerase. *The American Journal of Chinese Medicine*, 34, 2: 233-244, <https://doi.org/10.1142/S0192415X06003795>

## IZBOLJŠAVA RNA TEHNOLOGIJ Z NANODELCI ZA UČINKOVITO PROTIVIRUSNO ZAŠČITO RASTLIN

Lovro Laporšek

### IZVLEČEK

Trajnostna kmetijska pridelava se sooča z mnogimi izzivi, med njimi tudi z napadi virusov, ki negativno vplivajo na kakovost in količino pridelka. V iskanju možnih rešitev so se pojavile tehnologije na osnovi RNA interference in CRISPR/Cas. RNA interferenca je mehanizem, ki razreže virusno dvoverižno RNA in tako onespособi razmnoževanje virusa, s CRISPR/Cas pa se lahko izzove mutacije v dovzetnostnih genih gostiteljske rastline ter s tem onemogoči tarčo virusa, ali pa se povzroči prelome virusne DNA ali RNA. Najobetavnejša tehnologija je gotovo SIGS, ki deluje na osnovi RNA interference. Gre za netransgeno metodo, ki je tudi cenovno ugodna, a je potrebno optimizirati sam privzem oziroma vstop teh molekul v rastlinske celice in povečati stabilnost malih RNA po površinski aplikaciji na rastline. Pri tem so v pomoč nanodelci, ki so sposobni zaščite malih RNA, hkrati pa jim je zaradi njihove majhnosti omogočen vstop v celice. Pred komercializacijo pa bo potrebno opraviti izbor neškodljivih nanodelcev, ki ne povzročajo toksičnih učinkov na rastline in okolje.

**Ključne besede:** rastline, virusi, zaščita, RNA interferenca, HIGS, SIGS, CRISPR/Cas, obstojnost malih RNA, privzem malih RNA, nanodelci, RNA nanotehnologije

### Improving RNA technologies with nanoparticles for effective plant antiviral protection

#### Abstract

Sustainable agricultural production faces many challenges, including viral attacks that significantly affect the quality and quantity of the crop. In the search for possible solutions, technologies based on RNA interference and CRISPR/Cas have emerged. RNA interference is a mechanism that cuts viral double-stranded RNA and thus disables the virus's reproduction, while CRISPR/Cas can induce mutations in the susceptibility genes of the host plant, thereby eliminating the virus target, or vaccinate viral DNA or RNA. The most promising technology is undoubtedly SIGS, which operates on the basis of RNA interference. It is a non-transgenic method that is also cost-effective, but the uptake or entry of these molecules into plant cells and the stability of small RNAs after surface application to plants need to be optimized. Nanocarriers, which can protect small RNAs and allow entry into cells due to their small size, are helpful in this regard. However, the selection of harmless nanocarriers that do not cause toxic effects on plants and the environment will be necessary before commercialization.

**Key words:** plants, viruses, protection, RNA interference, HIGS, SIGS, CRISPR/Cas, stability of small RNAs, uptake of small RNAs, nanoparticles, RNA nanotechnologies

## 1 UVOD

Trajnostna kmetijska pridelava je vedno bolj ogrožena zaradi večjih ekoloških dejavnikov, mednje spadajo tudi virusi. Rastlinski virusi lahko imajo negativne učinke na prihodnjo kmetijsko pridelavo v mnogih državah. V sodobni kmetijski praksi so samo konvencionalne tehnike žlahtnjenja rastlin nezadostne za doseganje trajnostne osnove in za povečanja prehranskih zahtev prebivalstva (Dormatey in sod., 2020). Pojav genskega inženiringa, ki neposredno spreminja genetske informacije organizma z uporabo sodobne biotehnologije, pa je bistveno pospešil postopek in učinkovitost žlahtnjenja (Zhao in sod., 2019). Za odpornost proti virusom lahko uporabimo raznovrstne nekodirajoče RNA (ncRNA). Za nadzor rastlinskih virusov se lahko uporablja metodologija na osnovi RNA interference (RNAi) z uporabo dvoverižnih RNA in majhnih RNA, kot so umetne mikroRNA. Za zaviranje rastlinskih virusov pa obstaja tudi sistem urejanja genov CRISPR/Cas. Za samo stabilnost in privzem RNA pa nam v veliki meri pomagajo tudi nanodelci oziroma RNA nanotehnologije.

## 2 MALE RNA V PROTIVIRUSNI OBRAMBI

### 2.1 MALA INTERFERENČNA RNA

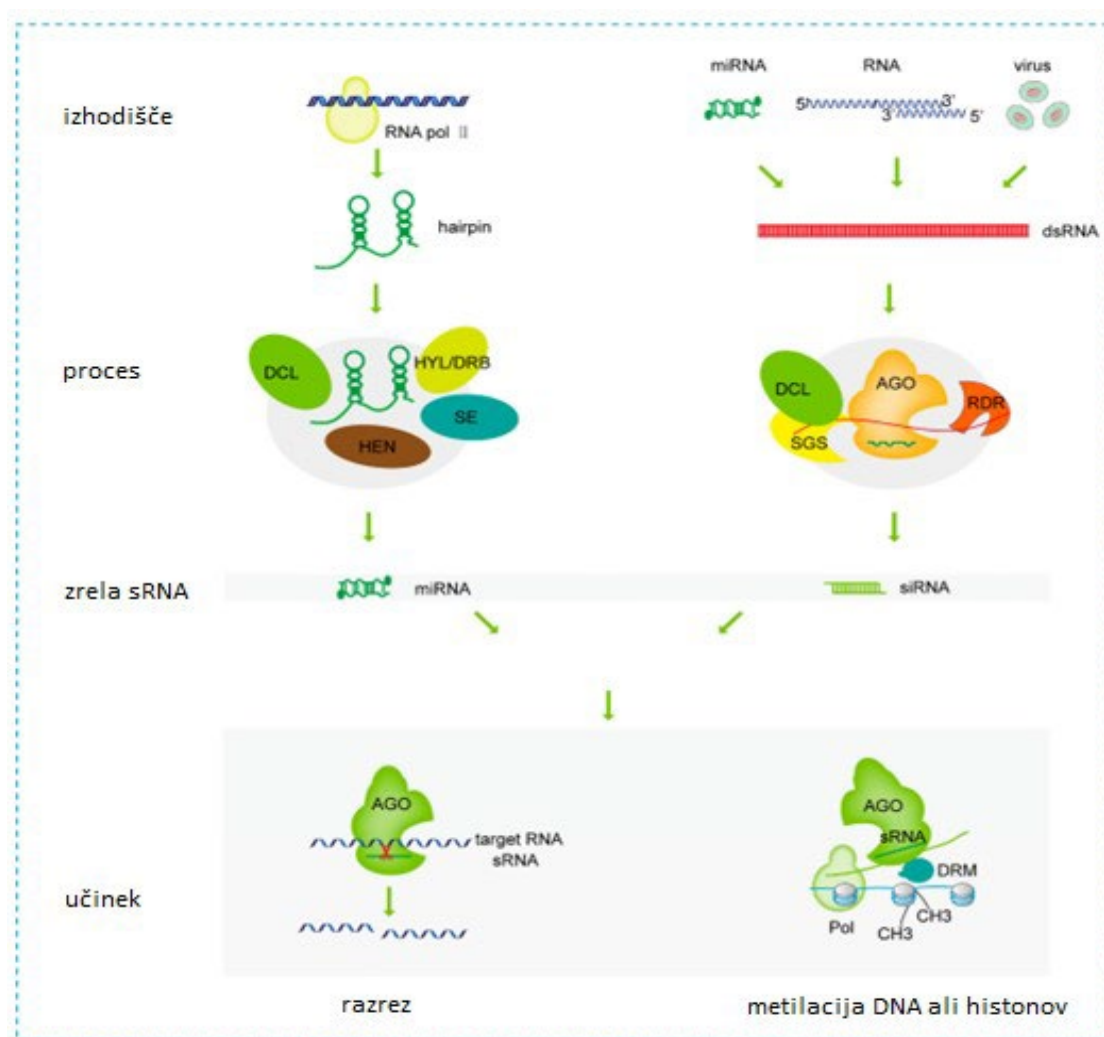
Male interferenčne RNA (siRNA) so pritegnile precejšnjo pozornost zaradi njihovega neposrednega ciljanja na virusno RNA z razgradnjo kot del naravnega protivirusnega imunskega odziva, ki temelji na RNAi (Baulcombe, 2005). Pri rastlinskih virusih, ki vsebujejo RNA, tvorbo siRNA sproži encim podoben Dicerju (DCL). Ta razreže virusno-specifične dvoverižne RNA (dsRNA), ki se pogosto pojavijo kot vmesni produkti v replikaciji virusa, v kratke fragmente siRNA, dolge med 21 in 25 nukleotidov. Ena od dveh verig (vodilna veriga) vsakega dvojnega RNA fragmenta se nato vključi v kompleks RNA-induciranega utišanja (RISC), ki vključuje Argonaute protein (AGO), endonukleazo. Ta kompleks omogoča parjenje vodilne verige s komplementarnim zaporedjem v virusni RNA, ki ga nato razreže komponenta AGO (Alvarado in Scholthof, 2009). Nastali razcepljeni produkti virusne RNA se razmnožujejo s pomočjo endogenih rastlinskih RNA - odvisnih RNA polimeraz (RDR) in delujejo kot sekundarne siRNA, ki se sistemsko širijo po rastlini. To je ključno za učinkovito protivirusno obrambo na osnovi RNAi (Parent in sod., 2012).

Za rastlinske viruse, ki vsebujejo DNA (npr. geminivirusi), so prekursorji siRNA verjetno sintetizirani s pomočjo DNA - odvisne RNA polimeraze II (Pol II), ki omogoča dvosmerno transkripcijo v obeh smereh, tako v sense kot antisense orientaciji na virusno DNA. Takšni transkripti se lahko parijo z virusnimi mRNA in tvorijo popolne dsRNA molekule, ki jih lahko nato nekatere DCL procesirajo v siRNA (Aregger in sod., 2012).

### 2.2 MIKRO RNA

Mikro RNA (miRNA) in siRNA si v bistvu delita nekaj podobnosti v velikosti, strukturi in v funkcijah. Obe sta kratki RNA molekuli, ki lahko povzročita utišanje genov na ravni RNA in izhajata iz dvoverižnih prekursorjev RNA. Obe potrebudeta proteine DCL in AGO za

procesiranje, nastajanje in delovanje, čeprav se vrste DCL in AGO lahko razlikujejo. Kljub temu obstaja več pomembnih razlik med miRNA in siRNA. Glavna razlika med njima je, da siRNA nastaja iz tujih dvoverižnih RNA – gre za eksogene prekursorje (npr. tistih, pridobljenih iz transpozonov, transgenov ali virusov), medtem ko miRNA izhaja iz endogenih predhodnikovih transkriptov, ki vsebujejo dvoverižne (običajno zanki podobne) regije, kodirane z *MIR* geni. miRNA izhajajo iz daljših, primarnih transkriptov, imenovanih pri-miRNA. Pri-miRNA vsebuje RNA zanko, v kateri je ena od dveh verig vključena v nastali fragment miRNA. To zanko nato razreže encimski kompleks, ki vključuje nukleazo DCL1 (član družine endonukleaz RNaze III) in HYL1, protein, ki se veže na dsRNA (Zhang in sod., 2020). Ti proteini delujejo tako, da tvorijo predkurzor miRNA, gre za pre-miRNA. Pre-miRNA se nato dodatno razreže, da nastane kratka dvojna RNA, pri čemer je ena veriga zrela miRNA. Zrela miRNA je metilirana s strani proteina HEN1 in zajeta v kompleks RISC, da se dodatno ojača RNAi. Večina rastlinskih miRNA ima običajno popolno ali skoraj popolno komplementarnost s svojimi tarčami. To je v skladu z njihovim osnovnim načinom delovanja, ki je razgradnja tarčnih mRNA. Vendar pa imajo lahko nekatere rastlinske miRNA in njihove naravne tarče več neujemanj, ki lahko spodbudijo zaviranje prevajanja mRNA, čeprav ne sprožijo razgradnje mRNA (Carthew in Sontheimer, 2009).



Slika 5: Delovanje malih RNA (prirejeno po Zhang in sod., 2019)

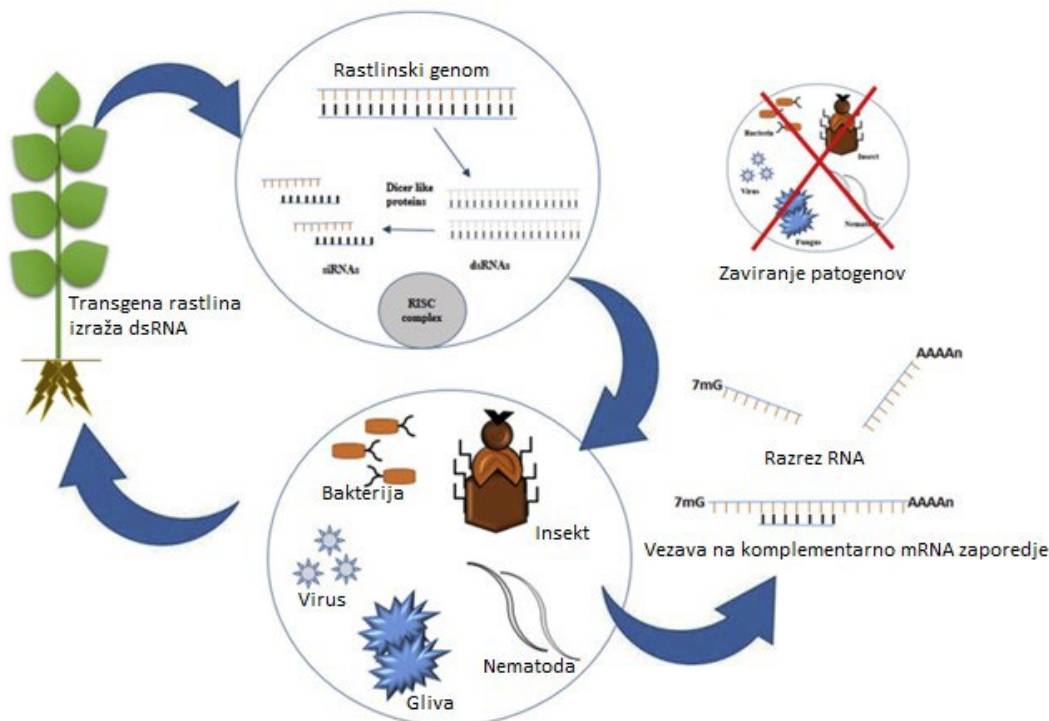
Shema procesiranja in načinov delovanja malih RNA (sRNA) je prikazana na sliki 1. *MIR* geni se prepišejo z RNA polimerazo II, pri tem nastane pri-miRNA, ki ima strukturo zanke. Zrele miRNA se sintetizirajo s procesnim kompleksom, ki vključuje encimu Dicer podobno RNazo III (DCL), Hyponastic leaves/dvoverižni RNA vezavni protein (HYL/DRB), Serrate (SE) in Hua enhancer (HEN) proteine. Zrela miRNA je vključena v delovni kompleks, ki usmerja ciljno utišanje z razrezom ali metilacijo. Glede na razliko v izvoru so siRNA razdeljene na endogene ali eksogene siRNA. Virusni genom ali replikacijski intermediati lahko tvorijo strukturo, ki je v obliki zanke. Kot prekursor za procesiranje malih RNA lahko služijo tako gostiteljske kot virusne dvoverižne RNA. Dvoverižne RNA so procesirane s procesnim kompleksom, ki večinoma vključuje DCL, Argonaut (AGO), Supresor genske utišanosti (SGS) in RDR (RNA-odvisno RNA polimerazo) proteine za sintezo siRNA. Zrela siRNA je vključena v delovni kompleks, ki usmerja ciljno utišanje z razrezom ali metilacijo na transkripcijskem ali posttranskripcijskem nivoju (Slika 1).

### **3 TEHNOLOGIJE NA OSNOVI RNA ZA RASTLINSKO ODPORNOST PROTI VIRUSOM**

#### **3.1 UTIŠANJE GENOV S POMOČJO GOSTITELJA - HIGS**

Prevod izraza host induced gene silencing bi se lahko glasil kot utišanje genov s pomočjo gostitelja (HIGS). Gre za inovativen koncept RNAi tehnologije za učinkovito nadziranje rastlinskih patogenov. Ta strategija se uporablja za utišanje enega ali več pomembnih genov v patogenih, ki so potrebni za rast, razvoj in tudi za samo patogenost ali pa za utišanje gostiteljskih genov, potrebnih za okužbo. Sprejem teh dsRNA ali siRNA, ki jih sintetizira gostiteljska rastlina, končno omeji rast, razvoj in infektivnost patogena (Slika 3) (Ghag, 2017). Genomska in biokemijska analiza kaže, da je RNAi proteinski mehanizem ohranjen pri evkariontih, zato je zelo verjetno, da lahko transgene siRNA, ki so ustvarjene in procesirane v rastlinah, učinkovito povzročijo sekvenčno-specifično razgradnjo mRNA patogena v njegovem citosolu (Obbard in sod., 2009). Strategijo HIGS lahko zasnujemo tako, da požlahtnimo transgene rastline, ki izražajo siRNA konstrukte za sprožitev utišanja genov v patogenih. Pridobiti je treba visoko selektivnost in specifičnost za ciljni organizem z minimalnimi stranskimi učinki. Ključni korak za uspešno zasnovo HIGS je identifikacija potencialnih tarčnih genov/sekvenc, prisotnih v gostiteljski rastlini, ki so potrebni za okužbo, oziroma ki so specifično prisotni v tarčnih patogenih in odsotni v gostiteljski rastlini ali potencialnih netarčnih ali koristnih organizmih. To je mogoče doseči s pregledovanjem EST knjižnic, transkriptomskih podatkov ali genomske baze podatkov. Ko so geni identificirani, se lahko izvede *in vitro* test na kulturah patogenov z uporabo umetno sintetiziranih siRNA/dsRNA, ki ciljajo izključno na preučevani gen. Po potrditvi rezultatov teh raziskav se pripravi ekspresijski vektor, ki ob izražanju v rastlinah sintetizira dsRNA in siRNA populacijo, ki natančno cilja na transkripte patogenov (Ghag, 2017). Čeprav se je tehnologija HIGS izkazala za zelo učinkovito pri obvladovanju virusnih bolezni, je časovno zahtevna, draga in še vedno omejena z regulativo GSO ter negativno javno sprejetostjo (Taliensky in sod., 2021).

Rastlina, transformirana z RNAi konstruktom, sintetizira siRNA in dsRNA, ki specifično ciljajo na gene patogena ali škodljivca. Prenos teh signalov za utišanje nastane med hranjenjem s tkivi rastline in z vstopom v ciljni patogen ali škodljivca, kjer se z razrezom ustrezne mRNA, omeji njihovo rast (Slika 3).



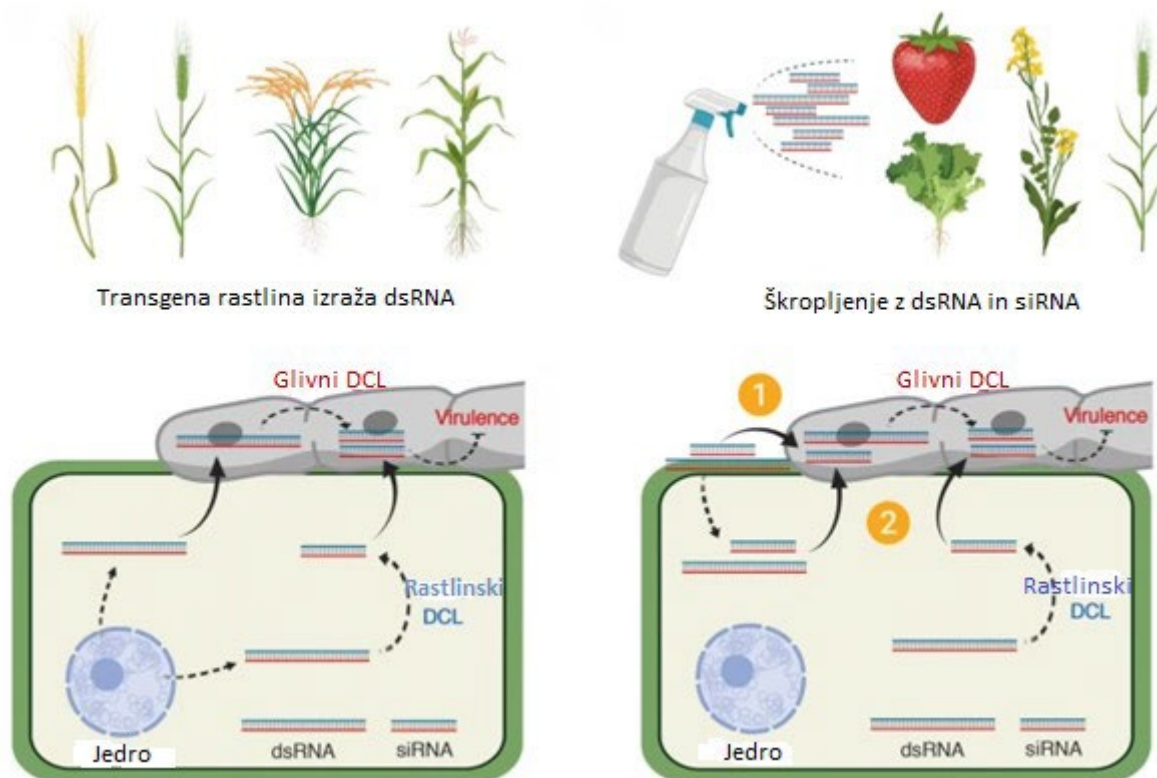
Slika 6: Utišanje genov s pomočjo HIGS gostitelja v transgenih rastlinah (prirejeno po Ghag, 2017)

### 3.2 UTIŠANJE GENOV S POMOČJO ŠKROPLJENJA - SIGS

Da bi se spopadli z ovirami in javnimi pomisleki, ki jih s sabo prinaša HIGS, je bil razvit drug pristop, imenovan "utišanje genov s pomočjo škropljenja (spray induced gene silencing)", pri katerem se RNA interferenca in s tem povezana protivirusna zaščita inducirata s škropljenjem rastlin z eksogeno dsRNA ali hpRNA, komplementarno virusnim RNA (Morozov in sod., 2019).

Za HIGS je potrebno pridobiti transgene rastline, ki izražajo sekvenčno specifične dsRNA, usmerjene proti virusnemu genomu. dsRNA, ki jih sintetizirajo transgene rastline, so razrezane v siRNA, to opravijo rastlinski encimi, podobni encimu Dicer (DCL). Ko virusni patogen okuži rastlinsko celico, nanj že čakajo zanj specifične siRNA. Preko specifične vezave teh siRNA s tarčami v virusnem genomu se sproži mehanizem RNAi. Pri SIGS pa pošpricamo površine rastlin z dsRNA in/ali siRNA, ki so usmerjene proti virusnemu genomu. Obstajata dve možni poti za utišanje genov patogena z razpršeno dsRNA in/ali siRNA. (1) Velja za glivne patogene - patogen neposredno prevzame dsRNA in/ali siRNA, dsRNA pa se razreže v siRNA s strani glivnih proteinov DCL. (2) V primeru virusnih patogenov - gostiteljska rastlina najprej prevzame dsRNA in/ali siRNA, dsRNA pa se razreže v siRNA s strani rastlinskih proteinov

DCL. Ob virusni okužbi nanj že čakajo pripravljene siRNA in ob sprostitvi virusne dednine pride do mehanizma RNAi (Slika 4).



Slika 7: Primerjava HIGS na levi strani in SIGS na desni. Kot patogen je prikazana gliva, a je potek enak ob virusnih okužbah (prirejeno po Sang in Kim, 2019)

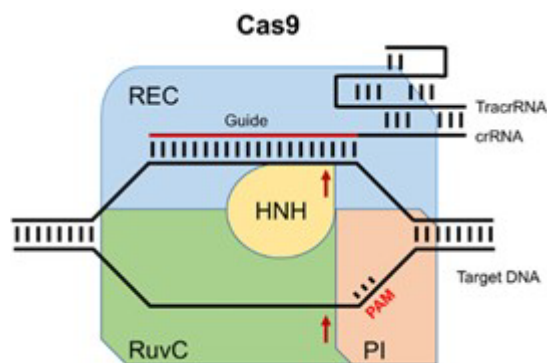
Učinkovitost RNAi pri zmanjševanju ali zaviranju virusnih okužb je odvisna od tega, katere regije različnih virusnih genomov ciljamo z dsRNA. Zato je izbira prave tarčne sekvence ključna pri načrtovanju dsRNA za obvladovanje virusov. Nedavno razvite prelomne tehnološke platforme za proizvodnjo brez celic ali bakterijsko proizvodnjo (v kilogramskem merilu) in čiščenje dsRNA po ceni le 0,5–1 \$/g (Taning in sod., 2019), močno izboljšujejo možnosti za hitro komercializacijo biokontrolne SIGS tehnologije. Vendar pa še vedno obstajajo nekatere omejitve, ki ovirajo njeno široko uporabo, in te je treba odpraviti pred vstopom na trg. Med njimi sta nizka stabilnost "gole" dsRNA v okolju in njena slaba absorpcija v rastlinske celice. Zato je raziskovanje novih pristopov za izboljšanje stabilnosti in absorpcije dsRNA predpogoj za uspešno komercializacijo (Mitter in sod., 2017).

Drug pristop za pridobitev odpornosti proti virusom z uporabo SIGS je utišanje genov dovzetnih za viruse v gostiteljskih rastlinah. Med znanimi dovzetnimi geni, ki so potrebni za uspešno okužbo z nekaterimi rastlinskimi virusi, kot so potyvirusi, so geni, ki kodirajo začetne translacijske dejavnike eIF4E, eIF(iso)4E in eIF4G. Inaktivacija ene same izoforme teh dejavnikov lahko inducira odpornost proti virusu brez ogrožanja zdravja ali vitalnosti rastline. Na primer, utišanje eIF4E ali eIF(iso)4E prek transgenskega izražanja lasnične RNA v slivah je zagotovilo delno zaščito pred virusom šarke - PPV (Wang in sod., 2013). Drug primer gena

za dovzetnost je gen, ki kodira coilin. Coilin je strukturni protein Cajalovih teles, za katere je bilo dokazano, da povečujejo dovzetnost za virus Y krompirja - PVY, in kot rezultat je bila odpornost proti PVY znatno povečana v transgenih rastlinah z utišanim coilinom (ki izražajo lasnično RNA za coilin) (Shaw in sod., 2014). Čeprav to še ni eksperimentalno potrjeno, lahko predvidevamo, da se eksogena dsRNA, zasnovana za utišanje določenega gena za dovzetnost gostitelja, lahko nanese na nepoškodovane rastline brez potrebe po transformaciji rastline. Poleg tega ni potrebna modifikacija posameznih sort zaradi podobnosti sekvenc ciljnih genov, a je bilo identificiranih le nekaj takšnih genov, zato je iskanje novih univerzalnih in učinkovitih tarč med geni gostitelja in nekodirajočimi RNA izziv za nadaljnji razvoj in trženje SIGS tehnologije (Taliensky in sod., 2021).

### 3.3 CRISPR/Cas

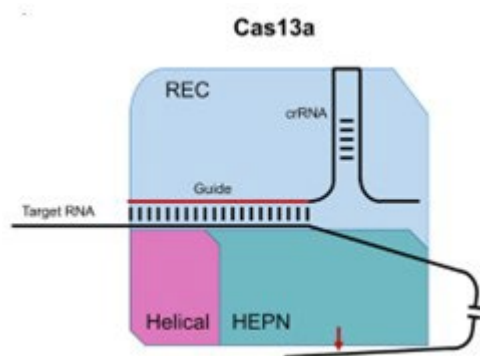
Sistem CRISPR/Cas je obrambni mehanizem pri prokariontih (arhejah ali bakterijah), ki temelji na RNA. Deluje tako, da vključuje tuje DNA fragmente iz napadajočih plazmidov ali virusov v CRISPR/Cas lokuse kot sekvence vmesnikov med enakimi ponavljajočimi se regijami. Ko so te sekvence integrirane, se prekursorske CRISPR RNA (precrRNA) prepisujejo iz teh lokusov in po zorenju v crRNA sodelujejo z endonukleazami Cas. Te proteine usmerjajo k prepoznavanju in cepljenju plazmidnih ali virusnih DNA, ki pridejo v celico na novo, in te morajo biti komplementarne crRNA. Ta mehanizem omogoča prokariontskim organizmom, da pridobijo molekularni spomin na pretekle virusne in plazmidne napade, kar jim nudi imunost proti prihodnjim napadom. Če to tehnologijo vpeljemo v polje rastlinske odpornosti proti virusom, pa z njo ciljamo direktno na virusni mehanizem ali pa izzovemo mutacije v dovzetnostnih genih gostiteljske rastline. (Kalinina in sod., 2019).



Slika 8: Potek delovanja endonukleaze Cas9 v sodelovanju s crRNA in tracrRNA (prirejeno po Kalinina in sod., 2019)

Na sliki 7 je predstavljena endonukleaza Cas9, v kompleksu z dvema majhnima RNA, CRISPR RNA (crRNA) in transaktivacijsko crRNA (tracrRNA), ki se veže na ciljno DNA zaporedje in povzroči dvojni prelom natančno 3 nukleotide pred PAM motivom. Prepoznavanje DNA poteka preko 20-nukleotidne vodilne sekvence crRNA (prikazano v rdeči barvi na sliki 7). REC predstavlja prepoznavno regijo; PI pomeni domeno za interakcijo s PAM; HNH in RuvC pa sta nukleazni domeni, ki cepita tarčno in netarčno DNA verigo, kot je prikazano s puščicami. Za poenostavitev tehnologije lahko CRISPR/Cas9 sistem vodi tudi ena sama rekombinantna RNA,

ki nastane s fuzijo crRNA in tracrRNA, gre za »single-guide« RNA (sgRNA). sgRNA se veže na Cas9 preko tracrRNA sekvence in specifičnega približno 20-nukleotidnega prostora, ki je oblikovan za tarčo na genomu (takoj ob PAM motivu). Ko se uporabi v evkariontih, sgRNA/Cas9 povzroči dvojno verižni prelom na tarčni DNA lokaciji, približno 3 do 4 nukleotide navzgor od PAM motiva. Celice nato opravijo popravilo DNA (Schindele in sod., 2018), ob tem se računa na pojav mutacij – bodisi insercij bodisi delecij in z njimi povezanim premikom bralnega okvirja, kar povzroči knock-out gena. S tem CRISPR/Cas9 sistemom se rastline lahko zoperstavijo DNA virusom, potrebna pa je transgena ekspresija Cas9 in sgRNA (Taliensky in sod., 2021).



Slika 9: Potek delovanja endonukleaze Cas13 v sodelovanju s crRNA (prirejeno po Kalinina in sod., 2019)

Cas13a deluje v povezavi z eno samo majhno RNA, crRNA, in se veže na tarčno mesto RNA. Prepoznavanje RNA posreduje vodilno zaporedje crRNA (prikazano rdeče na sliki 8). HEPN je domena nukleaze, ki cepi ciljno mesto RNA, oddaljeno od mesta prepoznavanja, kar je prikazano s puščico na sliki 8 (Schindele in sod., 2018). Odkritje Cas13, ki specifično cilja na RNA molekule, je odprlo nove možnosti za nadzor RNA virusov v transgenih rastlinah, ki izražajo Cas13 in crRNA (Taliensky in sod., 2021).

Neposredna manipulacija DNA ali RNA genomov z uporabo CRISPR/Cas lahko predstavlja nove tehnologije za pridobivanje protivirusne odpornosti. Vendar ta pristop zahteva trajno vzdrževanje komponent CRISPR/Cas v rastlini, kar za zdaj lahko dosežemo samo s transgeno ekspresijo. Zaradi predpisov in regulative o gensko spremenjenih organizmih (GSO) to lahko prepreči ali bistveno omeji praktično uporabo protivirusnih sredstev CRISPR. Za obhod ovir, povezanih z GSO, pri pridobivanju odpornosti proti virusom, so bile razvite nekatere druge CRISPR/Cas metode, ki se izognejo uporabi GSO in ciljajo na gostiteljske rastlinske gene, vključene v regulacijo občutljivosti na viruse. Najpogostejši je pristop, kjer so komponente CRISPR/Cas sprva transgeno izražene za spremembo gostiteljskega "dovzetnostnega" gena, kar vodi do odpornosti proti virusom, te transgene komponente pa se nato ločijo po spolnem razmnoževanju in niso več prisotne pri nadaljnjih generacijah. Lahko pa navodilo za te komponente vključimo v obliki mRNA. (Kalinina in sod., 2019).

### 3.4 PRIMERJAVA HIGS, SIGS, CRISPR

#### 3.4.1 GSO vidik

Nekatere CRISPR aplikacije, sploh tiste, ki ciljajo neposredno na virusni genom, zahtevajo stalno izražanje CRISPR komponent v rastlini, kar pa zahteva uporabo transgenih rastlin. Na drugi strani pa RNAi na osnovi SIGS ne zahteva transgenih rastlin in je zato manj sporna, SIGS je tudi gotovo najboljša tehnologija RNAi, saj podobno kot CRISPR tudi HIGS zahteva uporabo transgenih rastlin (Baulcombe, 2015).

#### 3.4.2 *In vitro* regeneracija rastlin

Za inaktivacijo gostiteljskih rastlinskih virusnih "dovzetnostnih" genov stalna prisotnost Cas proteina in sgRNA ni potrebna. Zato se lahko izognemo uporabi transgenih rastlin bodisi z odstranitvijo Cas9/sgRNA transgenov ali z dostavo reagentov v obliki mRNA. Vendar so povezani koraki za regeneracijo celotnih rastlin iz preurejenih (editiranih) celic s CRISPR ter posledično identifikacijo preurejenih (editiranih) linij običajno časovno zamudni, tehnično zahtevni in dragi. Poleg tega so številne kmetijske vrste in sorte neodzivne na regeneracijo. Doslej so tehnike neodvisne od transgenov CRISPR izvedljive le v omejenem obsegu rastlinskih vrst in sort. Nasprotno pa pristop SIGS, ki temelji na RNAi, sploh ne zahteva regeneracijskih korakov, ta tehnologija je za enkrat relativno poceni in ima velik potencial za komercializacijo. Prav tako RNAi orodja pripravimo v nekaj tednih, pridobivanje in selekcija preurejenih (editiranih) rastlin pa navadno traja mesece in leta (Taliany in sod., 2021).

#### 3.4.3 Narava fenotipa

Obstoječe (netransgene) CRISPR tehnologije inducirajo trajne in nepopravljive genske spremembe v rastlinah, medtem ko RNAi inducira prehodno utišanje izraženih genov. V mnogih primerih je prehodna motnja genske transkripcije bolj zaželena, še posebej, če bi popolna izločitev genov, ki so ključni za preživetje, lahko bila škodljiva ali celo letalna, medtem ko delna izguba teh genov ne bi bila škodljiva. Na primer, virusni "dovzetnostni" geni, kot so coilin geni, imajo številne pomembne celične funkcije, zato bi morala biti njihova ekspresija začasno modulirana le med virusnim napadom (Taliany in sod., 2021).

Kot kaže, ima inženiring odpornosti na viruse z RNAi trenutno številne bistvene prednosti pred tehnologijo preurejanja genomov CRISPR. Medtem ko je CRISPR tehnologija revolucionirala razvoj novih metod za ciljno terapijo človeških bolezni, uporaba takšnega medicinsko-tehničnega napredka CRISPR tehnologij za izboljšanje pridelkov ni povsem enostavna. Na primer, medicinske terapije vključujejo popravljanje genov/mutacij, ki povzročajo bolezni pri posameznih bolnikih (Li in sod., 2020), medtem ko rastlinska biotehnologija deluje z vsemi genotipi znotraj sorte. S tem se izjemen potencial CRISPR tehnologije v aplikacijah za izboljšanje pridelkov stalno razvija z novimi pristopi in prilagajanjem obstoječih tehničnih vidikov iz medicinskih področij. Medtem ko postaja uporaba CRISPR v pridelovalne namene in v znanosti o rastlinah zelo priljubljena kot orodje za funkcionalno genomiko rastlin in

izboljšanje, kar v nekaterih primerih tekmuje ali presega RNAi tehnologije, so RNAi pristopi še vedno glavna tehnologija za ciljne virusne patogene. Vendar pa je za to, da bi RNAi postala izbrana metoda, potrebno premagati tehnične ovire pri stabilnosti in učinkovitem dostavljanju RNAi spojin v rastlinske celice (Taliany in sod., 2021).

## 4 OBSTOJNOST RNA V OKOLJU

### 4.1 VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA OBSTOJNOST DVOVERIŽNE RNA

Na obstojnost in stabilnost dsRNA vplivajo okoljski dejavniki, kot so UV svetloba, temperatura in pH. Ti dejavniki lahko privedejo do razgradnje aplicirane dsRNA, kar vpliva na učinkovitost RNAi. Na primer, izpostavitve dsRNA (297 bp), imobilizirane na stekleni površini, UV svetlobi (254 nm;  $1500 \mu\text{W cm}^{-2}$ ) je povzročila znatno razgradnjo RNA v eni uri in popolno razgradnjo po štirih urah (San Miguel in Scott, 2015). Vpliv temperature na stabilnost dsRNA je bil prav tako raziskan. Z uporabo sekvenciranja in RNA blot analize majhnih RNA je bilo dokazano, da je povečanje temperature z  $22^\circ\text{C}$  na  $30^\circ\text{C}$  znatno zmanjšalo prisotnost mnogih trans molekul, s čimer je bila oslabljenja pretvorba v siRNA (Zhong in sod., 2013). To ugotovitev je potrdila tudi naslednja raziskava, v kateri so poročali, da so RNAi-posredovani obrambni odzivi odvisni od temperature zaradi zmanjšanja siRNA ob povišanju temperature (Adelman in sod., 2013). Te študije kažejo, da je RNAi odvisna od temperature in da temperatura vpliva na stabilnost dsRNA. Poleg tega je bilo dokazano, da je dsRNA bolj stabilna v kislih okoljih in nestabilna v alkalnih okoljih (Peng in sod., 2018). Ti rezultati kažejo, da je nemodificirana dsRNA zelo nestabilna in se ne kopiči, ne obstane ali deluje dolgo časa v okolju.

### 4.2 OBSTOJNOST DVOVERIŽNE RNA V ZEMLJI

Medtem ko se številni klasični pesticidi kopičijo v tleh in vodnih okoljih, je dsRNA kot naravno prisotna molekula biorazgradljiva in se ne pričakuje, da bo obstala v teh okoljih. Tla so pogosto glavni sprejemnik rastlinskih pridelkov ter lokalno uporabljenih proteinov in nukleinskih kislin. Proučevanje procesov adsorpcije in razgradnje dsRNA v tleh lahko oceni usodo dsRNA v tleh in sedimentu ter zagotovi pomembne informacije za oceno potencialne izpostavljenosti netarčnih organizmov. Vendar pa obstaja veliko vrst tal, in predlagano je bilo, da lahko skladnost tal vpliva na stabilnost dsRNA. To je bilo prikazano v študiji, ki je merila obstojnost dsRNA v dveh različnih vrstah tal. Medtem ko je bilo v krednati glineni zemlji po 4 urah inkubacije mogoče pridobiti 87–92% celotne mase dsRNA, je bilo v drobno peščeni ilovnati zemlji mogoče pridobiti le 15–26% celotne mase dsRNA. Čeprav so bile relativne količine ekstrahirane dsRNA v obeh tleh različne, eksperimenti kažejo, da se je količina dsRNA v ekstraktih tal zmanjšala skozi celotno eksperimentalno obdobje (Zhang in sod., 2020).

### 4.3 OBSTOJNOST DVOVERIŽNE RNA NA LISTIH

Študija, ki je simulirala spiranje dežja in uporabila fluorescenčno označeno dsRNA, razpršeno na površino listov repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*), je pokazala, da po 24 urah spiranja fluorescenčno označene dsRNA ni bilo več mogoče zaznati. Vendar je bila fluorescenčno

označena dsRNA, naložena na LDH (BioClay), še vedno zaznavna na listih 30 dni kasneje. To nakazuje, da se neobdelana dsRNA zlahka spere, uporaba nosilnega materiala (npr. LDH) pa lahko poveča obstojnost dsRNA na listih (Mitter in sod., 2017).

V naslednji raziskavi so ugotovili, da je bila dsRNA, nanesena kot foliarni sprej na krompir, učinkovita proti koloradskim hroščem do 28 dni. Ko se je dsRNA posušila na listih krompirja, je ni bilo mogoče zlahka sprati. Vendar študija ni kvantificirala preostale dsRNA. Različni dejavniki lahko prispevajo k variaciji teh rezultatov. Ena možnost je, da so koloradski hrošči zelo občutljivi na dsRNA in že sledovi dsRNA lahko imajo motilen učinek. Drugi možni vplivni dejavnik so različne velikosti delcev rež na površini lista, kar povzroči absorpcijo dsRNA na krompirjeve liste in oblikovanje stabilnih kompleksov. Poleg tega je lahko pH še en vplivni dejavnik: površina listov je pogosto rahlo kislja, kar prispeva k večji stabilnosti dsRNA v kislih okoljih in večji razgradnji v alkalnih okoljih, vendar lahko obstajajo razlike v pH foliarne površine različnih rastlin (San Miguel in Scott, 2015).

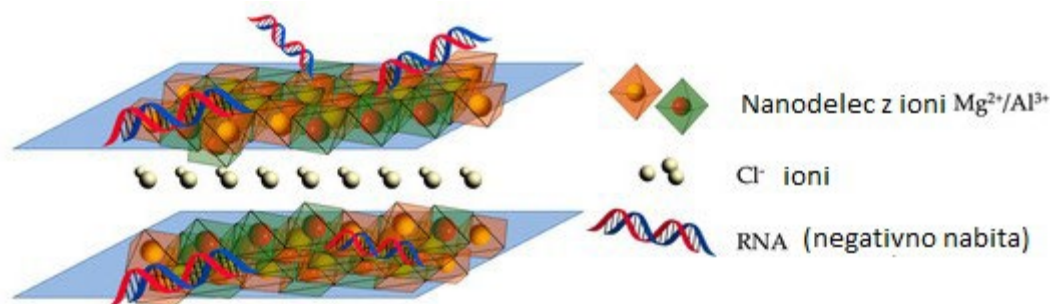
Na kratko, ugotovitve kažejo, da dsRNA ni zelo stabilna in trajna pri uporabi na prostem, pri čemer je njena stopnja razgradnje odvisna od okolja. Za ublažitev razgradnje dsRNA se lahko uporabijo strategije, kot so dodajanje UV zaščitnih sredstev, sredstev, odpornih na dež, in/ali protimikrobnih sredstev ali fizična inkapsulacija ali kompleksiranje z nosilnimi molekulami, da se premagajo te ovire za stabilnost (Chen in De Schutter, 2024).

## 5 NANODELCI KOT NOSILCI MOLEKUL dsRNA

Nanodelci imajo več lastnosti, zaradi katerih so odlični nosilci. Najprej je treba omeniti majhno velikost nanodelcev (<100 nm v najmanj eni dimenziji), ki zagotavlja visoko razmerje med površino in prostornino za učinkovito vezavo snovi v nanodelcu. Drugič, mnogi nanodelci so dovolj majhni, da prečkajo celično steno in celične membrane rastlinskih celic, zato lahko učinkovito dostavijo dsRNA v rastlinske celice. Kot tretje je tu še sposobnost enostavne sinteze nanodelcev z različnimi sestavami, morfologijami, velikostmi in kemičnimi lastnostmi, kar jih naredi primerne za transport različnih vrst biomolekul brez toksičnih stranskih učinkov (Ray in sod., 2022).

### 5.1 DVOSLOJNI HIDROKSIDNI NANODELCI - LDH

Dvoslojni hidroksidni nanodelci LDH (layered double hydroxide) so hidrotalcitom podobni 2D-ionski lamelarni nanodelci, ki jih sestavljajo pozitivno nabite plasti. Splošna formula za LDH je  $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2][A^{n-}]_{x/n} \cdot zH_2O$ , kjer sta  $M^{2+}$  in  $M^{3+}$  dvovalentna in trivalentna kovinska iona,  $A^{n-}$  pa je medplastni anion za uravnoteženje naboja. Veliko raziskav je dokazalo večnamensko naravo LDH, vključno z biokompatibilnim, nizko toksičnim transporterjem za prenos genov in zdravil v sesalske celice (Ladewig in sod., 2010). V zadnjem obdobju pa je bilo potrjeno, da ima LDH tudi sposobnost prenosa genskih materialov in biološko aktivnih spojin v celice rastlin (Mitter in sod., 2017).



Slika 10: Interakcija dvoslojnih hidroksidnih nanodelcev (LDH) in kloridnih ionov (prirejeno po Jalaluddin in sod., 2023)

Vstavljanje LDH nanoslojev (glina z magnezijevimi/aluminijevimi ioni) in kloridnih ionov tvori močno plastovito strukturo. Kovinski kationi vežejo dsRNA prek močnih ionskih interakcij (Slika 9).

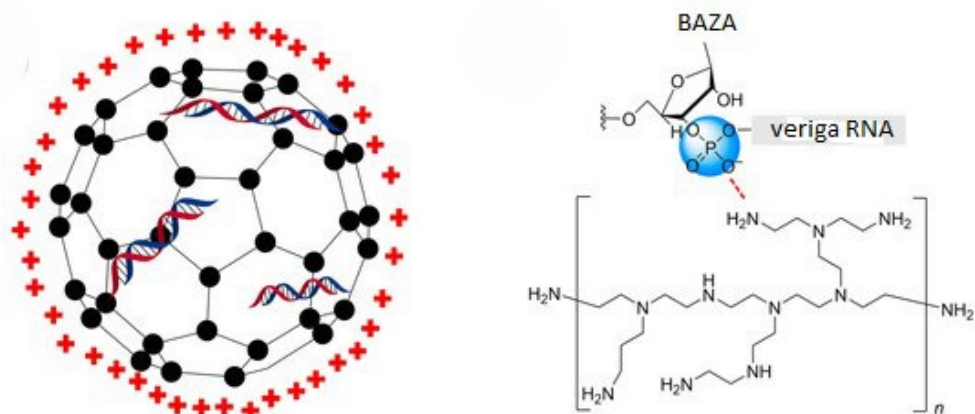
Ker je prehajanje zunajceličnih materialov v rastlinske celične stene omejeno z velikostjo por, postane velikost ključni dejavnik za uspešno internalizacijo LDH nanodelcev v rastlinske celice. RNA, ki so bile inkapsulirane z LDH nanodelci, so se izkazale za najbolj primerne za dostavo dolgih dsRNA, ki ciljajo na esencialne gene rastlinskih virusov. LDH ima tudi prednost, da ščiti krhke gole dsRNA pred razgradnjo in s tem zagotavlja podaljšane učinke utišanja po pršenju dsRNA po rastlini (Mitter in sod., 2017).

## 5.2 OGLJIKOVE PIKE - CD

Obstajajo poročila, ki opisujejo površinske modifikacije ogljikovih pik – CD (carbon dots), ki bi lahko vplivale na sprejem in porazdelitev v rastlinskih celicah. Površina CD-jev se lahko spremeni, na primer s povezavo CD-jev s poliakrilno kislino (PAA) in polietileniminom (PEI), da se dobijo pozitivno nabiti (CD-PEI) in negativno nabiti (CD-PAA) CD-ji. Površinska modifikacija CD-jev spremeni tudi njihovo velikost (Qian in sod., 2018).

CD-ji so vsestranski tudi kot dostavna sredstva za genetski material v rastlinske celice. Ena izmed raziskav poroča, da so aminsko funkcionalizirani CD-ji (CD-PEI) primerni kot nanonosilci za siRNA za utišanje transgenov in endogenih rastlinskih genov. Poleg tega so pri CD-jih dokazali sposobnost uspešno zaščititi siRNA pred nukleazami, saj je bila po eno urni inkubaciji z RNazo-III poročana minimalna degradacija (Schwartz in sod., 2020). Zaščito pred nukleazami pripisujejo vezavi med pozitivno nabitimi aminsko funkcionaliziranimi CD-ji in negativno nabitimi polifosfatnimi skupinami nukleinskih kislin, kar prikazuje tudi slika 10 (Kozielski in sod., 2013). Učinkovitost CD-PEI-siRNA pri utišanju tarčnih genov v rastlinskih celicah je odvisna od več dejavnikov, zlasti od velikosti CD-jev. Opažena je bila omejena sposobnost utišanja za največje CD-PEI-siRNA (s povprečnim hidrodinamičnim premerom 8,7 nm), medtem ko je bila veliko večja sposobnost utišanja opažena pri srednje velikih CD-PEI-siRNA (s povprečnim hidrodinamičnim premerom okoli 3,9 nm). Vendar pa so tudi najmanjši CD-PEI-siRNA (s povprečnim hidrodinamičnim premerom blizu 1,1 nm) pokazali omejeno sposobnost utišanja. Ta opažanja kažejo, da poleg velikostne omejitve celične stene na

učinkovitost utišanja vplivajo tudi druge ovire v celičnem sistemu, kot sta endocitoza in sprostitvev siRNA (Schwartz in sod., 2020).

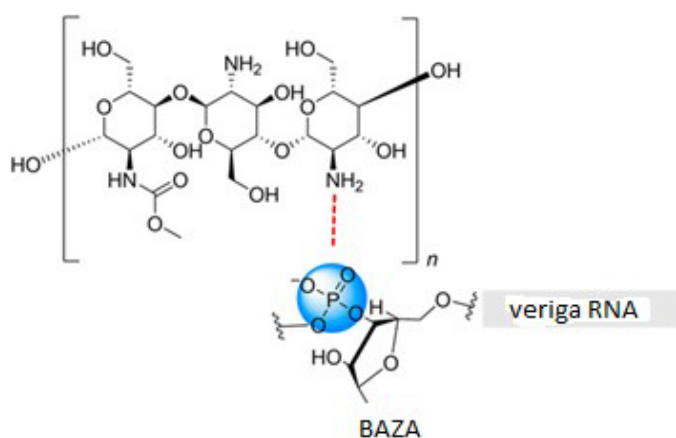


Slika 11: Ujete dsRNA v notranjosti ogljikovih pik. Rdeči plusi (+) predstavljajo pozitivni naboj na površini ogljikovih pik, črne točke pa predstavljajo ogljikove atome (•) (prirejeno po Jalaluddin in sod., 2023)

### 5.3 HITOZAN

Hitozan je polisaharid, sestavljen iz 2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukočnih in 2-acetamido-2-deoksi- $\beta$ -D-glukočnih monomernih enot, povezanih z  $\beta(1,4)$  glikozidno vezjo. Nastane zaradi prekomerne deacetilacije hitina. Med hitinom in hitozanom razlikujemo glede na stopnjo deacetilacije (DD), ki nam pove razmerje med N-acetilglukozaminskimi in N-glukozaminskimi enotami. Hitozan je topen v organskih kislinah, lastnosti hitozana, kot so topnost, biorazgradljivost, možnost agregacije, pKa vrednost, pa so odvisne od DD (Lepri in sod., 1977).

Novejša raziskava, ki je proučevala fizikalno-kemijsko karakterizacijo dsRNA-hitozan kompleksa, poroča o višji afiniteti vezave negativno nabitih fosfatnih skupin molekule RNA z pozitivno nabitimi metilnimi skupinami hitozana v razmerju  $N/P = 1$  (Slika 11). Prav tako je ta kompleks prikazal nizke stopnje toksičnosti na solato in človeške eritrocite, torej bi lahko v prihodnosti predstavljal pomembno orodje za zaščito rastlin (Petrônio in sod., 2022).



Slika 12: Povezava med hitozanom in RNA označena z rdečo črtkano črto (prirejeno po Jalaluddin in sod., 2023)

Omenili smo nekaj nosilcev, ki omogočajo, da je dsRNA stabilnejša in učinkovitejša pri uporabi za zaščito rastlin pred virusnimi patogeni. Te nanodelce je potrebno najprej površinsko modificirati s polarnimi komponentami, da se omogočijo polarne interakcije med nosilcem in RNA. V prihodnosti bo treba narediti še nadaljnje študije, da bi razumeli možne toksične učinke kompleksov dsRNA-nanodelec in kako različne ovire vplivajo na privzem in učinke utišanja genov. Potrebno je obravnavati tudi morebitna tveganja in varnostne pomisleke v zvezi s to nanotehnologijo (Jalaluddin in sod., 2023).

## 6 ZAKLJUČEK

Obstaja kar nekaj novejših tehnologij, s katerimi lahko tretiramo rastline in jim povečamo odpornost proti virusom. S tem pozitivno vplivamo na trajnostno kmetijsko pridelavo in skrajšamo postopek zlahtnjenja. Poleg tega pa zmanjšamo tudi vpliv na okolje, saj tako pri nekaterih obolenjih uporaba fitofarmacevtskih sredstev ni več potrebna.

Metoda HIGS je zelo učinkovita, a je časovno zahtevna in prisoten je še omejujoč dejavnik uporabe, ker je njena aplikacija v naravnih sistemih omejena z regulativo GSO in negativnim sprejetjem javnosti. S podobno težavo se pa srečujejo tudi CRISPR aplikacije. Menim, da imata ti metodi ogromen potencial izven meja Evrope, a najbrž bodo v bližnji prihodnosti imele prednost ostale netransgene tehnologije, na primer SIGS. Gre za tehnologijo, kjer male RNA, ki so usmerjene proti virusnemu genomu, apliciramo na površino rastline in pričakujemo, da rastlina te molekule tudi sprejme in procesira ter tako pripravljene siRNA čakajo na vstop patogenega virusa. Sinteza malih RNA je cenovno ugodna, vendar pa tudi tu obstajajo omejitve, ki jih bo pred vstopom na trg potrebno odpraviti, to sta na primer slaba absorpcija malih RNA v rastlinske celice ter nizka stabilnost malih RNA v okolju. V zadnjem času so se kot možna rešitev pojavili nanodelci, ki lahko zaščitijo te male RNA, hkrati so pa dovolj majhni, da so sposobni prehoda skozi rastlinsko bariero, ki jo predstavljata celična stena in membrana rastlinskih celic. Te nosilce je potrebno najprej površinsko spremeniti s polarnimi komponentami, da se vzpostavijo polarne vezi med nanodelcem in RNA, torej je veliko o njih že poznanega, a bo potrebno opraviti tudi izboljšave, da se preveri morebiten toksičen efekt teh nosilcev na same rastline in okolje.

## 7 VIRI

- Adelman Z. N., Anderson M. A. E., Wiley M. R., Murreddu M. G., Samuel G. H., Morazzani E. M., Myles K. M. 2013. Cooler temperatures destabilize RNA interference and increase susceptibility of disease vector mosquitoes to viral infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7, 5: e2239, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002239>
- Alvarado V., Scholthof H. B. 2009. Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens. *Developmental Biology*, 20, 9: 1032-1040, <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.06.001>
- Aregger M., Borah B. K., Seguin J., Rajeswaran R., Gubaeva E. G., Zvereva A. S., Windels D., Vazquez F., Blevins T., Farinelli L., Pooggin M. M. 2012. Primary and secondary siRNAs in geminivirus induced gene silencing. *PLOS Pathogens*, 8, 9: e1002941, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002941>

- Baulcombe D. 2005. RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences*, 30, 6: 290-293, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.04.012>
- Baulcombe D. C. 2015. VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Current Opinion in Plant Biology*, 26: 141-146, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.007>
- Carthew R. W., Sontheimer E. J. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136, 4: 642-655, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Chen Y., De Schutter K. 2024. Biosafety aspects of RNAi-based pests control. *Pest Management Science*, 80, 8: 3697-3706, <https://doi.org/10.1002/ps.8098>
- Dormatey R., Sun C., Ali K., Coulter J. A., Bi Z., Bai J. 2020. Gene pyramiding for sustainable crop improvement against biotic and abiotic stresses agronomy. *Agronomy*, 10, 9: 1255, <https://doi.org/10.3390/agronomy10091255>
- Ghag S. B.. 2017. Host induced gene silencing, an emerging science to engineer crop resistance against harmful plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100: 242-254, <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.10.003>
- Jalaluddin M., Sharleeza N., Asem M., Harikrishna J. A., Fuaad A. A. H. A. 2023. Recent progress on nanocarriers for topical-mediated RNAi strategies for crop protection - a review. *Molecules*, 28, 6: 2700, <https://doi.org/10.3390/molecules28062700>
- Kalinina N. O., Khromov A., Love A. J., Taliansky M. E. 2019. CRISPR applications in plant virology: virus resistance and beyond. *Phytopathology*, 100, 1, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0267-IA>
- Kozielski K. L., Tzeng S. Y., Green J. J. 2013. Bioengineered nanoparticles for siRNA delivery. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5, 5: 449-468, <https://doi.org/10.1002/wnan.1233>
- Ladewig K., Niebert M., Xu Z. P., Gray P. P., Lu G. Q. M. 2010. Efficient siRNA delivery to mammalian cells using layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials*, 31, 7: 1821-1829, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.058>
- Lepri L., Desideri P. G., Muzzarelli R. A. A. 1977. Chromatographic behaviour of nucleic acid constituents and of phenols on chitosan thin layers. *Journal of Chromatography A*, 139, 2: 337-342, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)89329-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)89329-2)
- Li H., Yang Y., Hong W., Huang M., Wu M., Zhao X. 2020. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5, 1: 1-23, <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>
- Mitter, N., Worrall, E., Robinson, K., Li P., Jain P. G., Taochy C., Fletcher S. J., Carroll B. J., Lu G. Q., Wu Z. P. 2017. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, 3, 16207, <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
- Mitter N., Worrall E. A., Robinson K. E., Xu Z. P., Carroll B. J. 2017. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. *Current Opinion in Virology*, 26: 49-55, <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.07.009>
- Morozov S. Y., Solovyev A. G., Kalinina N. O., Taliansky M. E. 2019. Double-stranded RNAs in plant protection against pathogenic organisms and viruses in agriculture. *Acta Naturae*, 11, 4: 13-21, <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-13-21>

- Obbard D. J., Gordon K. H. J., Buck A. H., Jiggins F. M. 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 364, 1513: 99-115, <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0168>
- Parent J. S., Martínez de Alba A. E., Vaucheret H. 2012. The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Frontiers in Plant Science*, 3, 179: 1-12, <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00179>
- Peng Y., Wang K., Fu W., Sheng C., Han Z. 2018. Biochemical comparison of dsRNA degrading nucleases in four different insects. *Frontiers in Physiology*, 9: 1-14, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00624>
- Petrônio, M. S., Barros-Alexandrino T. T., Lima A. M. F., Assis O. B. G., Nagata A. K. I., Nakasu E. Y. T., Tiera M. J. 2022. Physicochemical and toxicity investigation of chitosan based dsRNA nanocarrier formation. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12, 4: 5266-5279, <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.52665279>
- Qian K., Guo H., Chen G., Ma C., Xing B. 2018. Distribution of different surface modified carbon dots in pumpkin seedlings. *Scientific Reports*, 8, 7991, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26167-0>
- Ray P., Sahu D., Aminedi R., Chandran D. 2022. Concepts and considerations for enhancing RNAi efficiency in phytopathogenic fungi for RNAi-based crop protection using nanocarrier-mediated dsRNA delivery systems. *Frontiers in Fungal Biology*, 3: 1-25, <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.977502>
- San Miguel K., Scott J. G. 2015. The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Management Science*, 72, 4: 801-809, <https://doi.org/10.1002/ps.4056>
- Sang, H., Kim, JI. 2020. Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnology Reports*, 14: 1–8, <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00588-3>
- Schindele P., Wolter F., Puchta H. 2018. Transforming plant biology and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13. *FEBS Letters*, 592, 12: 1954-1967, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13073>
- Schwartz S. H., Hendrix B., Hoffer P., Sanders R. A., Zheng W. 2020. Carbon dots for efficient small interfering RNA delivery and gene silencing in plants. *Plant Physiology*, 184, 2: 647–657, <https://doi.org/10.1104/pp.20.00733>
- Shaw J., Love A. J., Makarova S. S., Kalinina N. O., Harrison B. D., Taliansky M. E. 2014. Coilin, the signature protein of Cajal bodies, differentially modulates the interactions of plants with viruses in widely different taxa. *Nucleus*, 5, 1: 85–94, <https://doi.org/10.4161/nucl.28315>
- Taliansky M., Samarskaya V., Zavriev S. K., Fesenko I., Kalinina N. O., Love A. J. 2021. RNA-based technologies for engineering plant virus resistance. *Plants*, 10, 1: 82, <https://doi.org/10.3390/plants10010082>
- Taning C. N. T., Arpaia S., Christiaens O., Dietz-Pfeilstetter A., Huw Jones H., Mezzetti B., Sabbadini S., Sorteberg H. G., Sweet J., Ventura V., Smagghe G. 2019. RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Management Science*, 76, 3: 841-845, <https://doi.org/10.1002/ps.5686>
- Wang X., Kohalmi S. E., Svircev A., Wang A., Sanfaçon H., Lining T. 2013. Silencing of the host factor eIF(iso)4E gene confers plum pox virus resistance in plum. *PLOS ONE*, 8, 1: e50627, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050627>

- Zhang K., Wei J., Huff Hartz K. E., Lydy M. J., Moon T. S., Sander M., Parker K. M. 2020. Analysis of RNA interference (RNAi) biopesticides: double-stranded RNA (dsRNA) extraction from agricultural soils and quantification by RT-qPCR. *Environmental Science & Technology*, 54, 8: 4893-4902, <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07781>
- Zhao Y., Yang X., Zhou G., Zhang T. 2019. Engineering plant virus resistance: from RNA silencing to genome editing strategies. *Plant Biotechnology Journal*, 18, 2: 328-336, <https://doi.org/10.1111/pbi.13278>
- Zhong S. H., Liu J. Z., Jin H., Lin L., Li Q., Chen Y., Yuan Y. X., Wang Z. Y., Huang H., Qi Y. J., Chen X. Y., Vaucheret H., Chory J., Li J., He Z. H. 2013. Warm temperatures induce transgenerational epigenetic release of RNA silencing by inhibiting siRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 22: 9171-9176, <https://doi.org/10.1073/pnas.1219655110>

## **PRIOBIVANJE ANTIGENOV ZA CEPIVA PROTI HEPATITISU B S TRANGENIMI RASTLINAMI**

**Nika Kuhar**

### **IZVLEČEK**

Hepatitis B povzroča akutne in kronične okužbe jeter ter lahko vodi do ciroze in jetrnega raka. Napredek v proizvodnji cepiv proti hepatitisu B predstavljajo transgene rastline za sintezo HBsAg antigenov. Ta metoda omogoča izdelavo na stroškovno učinkovit, varen, okolju prijazen način in zmanjšuje tveganja, povezana s tradicionalnimi metodami. Postopek vključuje gensko transformacijo rastlinskih celic z vnosom transgena za HBsAg, čemur sledi regeneracija, ekspresija HBeAg oz. antigena E, ekstrakcija in čiščenje antigena s pomočjo naprednih tehnik. Poleg tega je ta pristop prijazen do okolja in trajnostno naravnan ter znatno izboljša dostopnost cepiv, zlasti v državah z omejenimi viri, kar bi prispevalo k zmanjšanju razširjenosti hepatitisa B in izboljšanju javnega zdravja. Optimizacije cepiva s vključenimi antigeni potekajo na večih ravneh.. Izboljšave na področju sinteze antigenov in razvoja cepiv ter njihove učinkovite uporabe zmanjšujejo pojavnost novih okužb ter dolgoročne zdravstvene zaplete, povezane s to boleznijo.

**Ključne besede:** transgene rastline, sinteza antigena, antigen HbeAg, virus HBV, hepatitis B, cepivo

### **Transgenic plants as expression systems for antigens in vaccines against hepatitis B**

#### **Abstract**

Hepatitis B causes acute and chronic liver infections and can lead to cirrhosis and liver cancer. Advances in the production of hepatitis B vaccines include the use of transgenic plants for the synthesis of HBsAg antigens. This method allows for production in a cost-effective, safe, and environmentally friendly manner, reducing the risks associated with traditional methods. The process involves the genetic transformation of plant cells by introducing a transgene for HBsAg, followed by regeneration, expression of HBeAg or E antigen, extraction, and purification of the antigen using advanced techniques. Additionally, this approach is environmentally friendly and sustainable, significantly improving the accessibility of vaccines, especially in resource-limited countries, which would contribute to reducing the prevalence of hepatitis B and improving public health. Vaccine optimization, including antigen incorporation, is ongoing at various levels. Improvements in antigen synthesis and vaccine development, along with their effective use, reduce the incidence of new infections and the long-term health complications associated with this disease.

**Key words:** transgenic plants, antigen synthesis, antigen HBeAg, virus HBV, hepatitis B, vaccine

## 1 UVOD

Hepatitis B je ena najpogostejših virusnih bolezni na svetu in predstavlja velik globalni zdravstveni problem. Število okužb je najvišje v Afriki in v Ameriki, kjer je kronično okuženih 116 in 81 milijonov prebivalcev. Gre za nalezljivo (infekcijsko) bolezen, ki jo povzroča virus hepatitisa B (ang. hepatitis B virus – HBV), ki lahko povzroči akutno vnetje jeter (hitro razvijajoče in potekajoče, ki lahko tudi hitro izgine) ali kronično vnetje (počasi razvijajoče in dolgo trajajoče, lahko tudi trajno, ki traja 3 mesece ali več). Simptomi hepatitisa B se lahko razlikujejo od blagih do resnejših in vključujejo utrujenost, bolečine v sklepih, slabost, izgubo apetita, rumenenje kože in beločnice ter temno obarvan urin. Z virusom hepatitisa B se lahko okužimo preko stika z okuženo krvjo, telesnimi tekočinami okužene osebe, spolnim stikom in prenosu virusa iz matere na otroka. Cepljenje proti hepatitisu B predstavlja najučinkovitejši način za preprečevanje okužbe s HBV in preprečevanje razvoja bolezni hepatitisa B. Cepivo proti hepatitisu B, ki je na voljo že več desetletij, je varno in učinkovito ter se običajno daje v treh odmerkih. Prvi odmerek prejme dojenček že v 24-ih urah po porodu, saj se 95 % okužb v otroštvu razvije v kronične okužbe, med tem ko se v odrasli dobi le 5 % okužb razvije v kronično stanje. Cepivo torej spodbudi imunski sistem, da tvori protitelesa proti HBV, kar preprečuje razvoj bolezni (WHO, 2024). Trenutno se rekombinantna cepiva pridobivajo s številnimi sistemi bakterij, kvasovk, insektov ter sesalskimi in rastlinskimi celicami. Med temi platformami je uporaba rastlinskih celic prejela veliko pozornosti glede na intrinzično varnost, možnost hitrega širjenja, večjo dostopnost in ustrezno modificiranje ciljnih proteinov. Raziskovalne skupine po vsem svetu so poskušale razviti učinkovitejša rastlinsko proizvedena cepiva za več kot 30 bolezni, med njimi najpogosteje proti hepatitisu B (Joung in sod., 2016).

Zgodovina razvoja transgenih rastlin za sintezo antigenov za cepiva proti hepatitisu B sega v zadnjih nekaj desetletij. Začetki raziskav o uporabi transgenih rastlin za proizvodnjo biološko aktivnih snovi, segajo v osemdeseta leta prejšnjega stoletja. V tem obdobju so raziskovalci prepoznali potencial transgenih rastlin za proizvodnjo antigenov za cepiva proti hepatitisu B. Pionirske študije, izvedene v devetdesetih letih, so dokazale uspešnost uporabe transgenih rastlin za proizvodnjo antigenov za cepiva proti hepatitisu B. Raziskovalci so vključevali gene za izbrane antigene hepatitisa B v genom rastlin, kar je omogočilo izražanje teh antigenov v rastlinah. V prvem desetletju novega tisočletja so se raziskave osredotočile na optimizacijo tehnologije pridobivanja antigenov v transgenih rastlinah. Razvili so se učinkovitejši genetski konstrukti in metode transformacije rastlin, ki so omogočile večjo stabilnost in izražanje antigenov ter zmanjšale možnost kontaminacije. Po letu 2010 so se začela klinična preizkušanja cepiv, ki vsebujejo antigene pridobljene iz transgenih rastlin. Ta preizkušanja so potrdila varnost in učinkovitost cepiv ter odprla pot k njihovi komercializaciji. Danes se nadaljujejo raziskave in razvoj na področju uporabe transgenih rastlin za izboljšanje učinkovitosti, stabilnosti, pocenitve in trajnosti proizvodnje (Pniewski, 2013).

Zanimanje znanstvenikov je vzbudila možnost za izboljšanje obstoječega cepiva. Problemi, ki so se pojavljali so bili predvsem dostopnost in dostava cepiv v razvijajoče države, kjer je največja ogroženost okužbe s hepatitisom B. Velika prednost rastlinsko pridobljenih antigenov je možnost odsotnosti hladne verige pri transportu, ki je energijsko in finančno precej bremenila

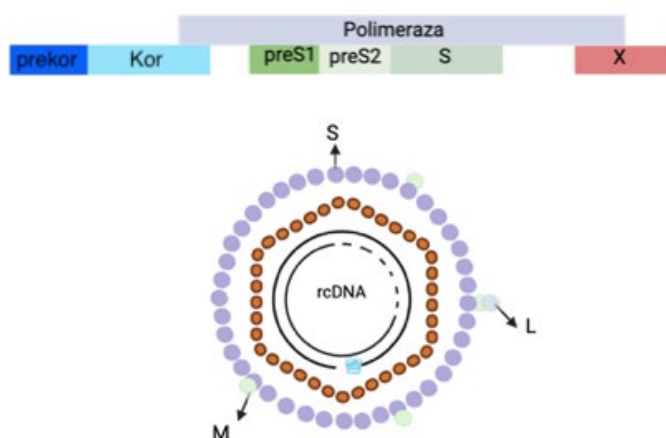
dostopnost. Tako se izognemo uporabi obstoječih celičnih kultur, ki so višale stroške proizvodnje in uporabi dragih substratov in kemikalij, ki so bili nujno potrebni za proizvodnjo. Hkrati pa z novo tehnologijo ne vplivamo na kakovost, učinkovitost ter varnost cepiva. Ena glavnih prednosti v sklopu varnosti je odsotnost humanih in sesalskih patogenov v rastlinskih ekspresijskih sistemih (Warzecha in Mason, 2003).

## 2 VIRUS HEPATITISA B

Virus hepatitisa B je majhen DNA virus s podobnimi lastnostmi kot retro virus. Spada v družino Hepadnaviridae. Virus ima osem različnih genotipov (A–H), ki se razlikujejo za več kot 8 % in manj kot 17 %. Opisana sta bila še dva dodatna genotipa. Genotip I se razlikuje za 8 % in ima močno homologijo z gentipom C, zato so ga označili za izumrlega. Potencialno deseti genotip pa je genotip J, ki naj bi bil rekombinacija gentipa C in gibbonjega HBV. Različni genotipi so prisotni v različnih populacijah in na različnih geografskih lokacijah. To povzroča tudi različno resnost poteka bolezni na različnih delih sveta. V ZDA kjer so okužbe s HBV relativno redke se pojavljajo vsi genotipi vendar ne v enakem razmerju. Genotipa A in D sta najpogostejša, se pa njuna prisotnost razlikuje med etničnimi skupinami. Na primer genotip C je najbolj razširjen med azijskimi prebivalci ZDA, kar korelira z dejstvom da je v Aziji najbolj razširjen genotip C, ki pa se slabo odziva na terapijo z interferoni (Tatematsu in sod., 2009).

### 2.1 GENOM VIRUSA

Virus HBV ima malo delno dvovertižno krožno DNA, dolgo 3,2 kb. Genom ima zapis za 4 prekrivajoče odprte bralne okvirje (ang. overlapping open reading frame – 4 ORF). Največji ORF kodira zapis za virusno polimerazo, ki deluje tudi kot reverzna transkriptaza, ki generira prvo verigo DNA genoma iz RNA. Drugi največji ORF kodira zapis za tri proteine ovojnice. To so veliki (L), srednji (M) in majhni (S) površinski antigeni (HBsAg). Naslednji ORF je odgovoren za prekora (ang. Precore) in kor (ang. Core) proteina, ki tvorita jedro kapsido. Najmanjši ORF pa kodira regulatorni protein X, ki je potreben za replikacijo HBV (Slika 1) (Zoulim in sod., 1994).



Slika 1: Shematski prikaz prekrivajočih odprtih bralnih okvirjev ORF virusa HBV in zrelega HBV viriona (prirejeno po Lamontagne in sod., 2016)

Slika 1 prikazuje sestavne dele HBV virusa in zrelega HBV viriona, ki je sestavljen iz dveh glavnih delov: nukleokapside, ki je sestavljena iz delno dvovijačnega DNA genoma, vezanega na polimerazo, in enkapsidiranega dimernega jedrnega proteina, ter virusne ovojnice, ki jo v glavnem sestavlja S-HBsAg (S) površinski antigen, v manjši meri M-HBsAg (M) in najmanj je prisotnega L-HBsAg (L) (Lamontagne in sod., 2016).

ORF se prepišejo v RNA, ki se delijo na genomske in subgenomske transkripte. Med subgenomske spadajo zapisi za regulatorni X protein, majhen, veliki in srednji površinski antigen. Te RNA molekule delujejo kot matrice za nastanek teh proteinov, ki služijo kot gradbene enote virusa. Druga skupina pa so genomski transkripti, ki nosijo zapis za proteine prekora, kor in polimerazo. Ti transkripti so ključni za podvojevanje virusa. Vsi HBV RNA transkripti pa imajo skupno mesto poliadenilacije, kar pomeni da ima nakrajši transkript enak zapis kot zadnji del daljšega. Torej imajo vsi transkripti v virusu na koncu zaporedje za X protein. Najdaljši transkript ima edini sekvenco, ki si je ne deli z nobenim drugim transkriptom, vsi ostali se prekrivajo z najdaljšim (Seeger in sod., 2001).

## 2.2 PROTEINI VIRUSA

### 2.2.1 E antigen

HBeAg oz. antigen E je končni produkt postrnslacijskih modifikacij prepisanega prekora proteina ORF. Velikost antigena E je 15 kD. Antigen se dokončno izoblikuje v endoplazemskem retikulumu iz katerega ga celica ob okužbi izloči. Funkcija HBeAg še ni povsem poznana. Nekateri raziskovalni skupini domnevajo, da ima funkcijo zaviranja imunskega sistema gostitelja na HBV kor antigenu (Chen in sod., 2005).

### 2.2.2 Površinski antigen

HBV vsebuje v svojem genomu zapis za tri površinske antigene, ki tvorijo ovojnico. To so veliki, srednji in majhen površinski antigen. Majhen površinski antigen oz. S (small) antigen je velik 24 kD in dolg 226 aminokislin in je zadnji del obeh večjih površinskih antigenov. Srednji površinski antigen oz. M (middle) antigen pa je velik 31 kD in je sestavljen iz 55 aminokislin, ki jim sledijo aminokislina majhnega antigena. Dodatni del aminokislin se imenuje preS2. Veliki površinski antigen pa je največji (39 kD) in je sestavljen iz 226 aminokislin majhnega antigena, dodatnih 55 aminokislin srednjega antigena (preS2) in še dodatno 108 – 119 aminokislin (preS1).

### 2.2.3 Kor protein

Kor protein velik 21 kD ali HBcAg sestavlja nukleokapsido v virionu. Ko so proteini izraženi v gostiteljski celici je nukleokapsida v obliki topnih dimerov ali v obliki 20 stranega poliedra (Stannard in Hodgkiss, 1979). Kor proteini so prevedeni iz predgenomske RNA (pgRNA) in prvih 149 aminokislin kor zaporedja tvori sestavljeno domeno, ki se ne razlikuje od in vitro sestavljenih kapsid. Preostalih 34 – 36 aminokislin pa sestavlja z argininom bogato C-

terminalno domeno, ki uravnava več stopenj življenjskega cikla virusa (Birnbaum in Nassal, 1990).

#### 2.2.4 Polimeraza/reverzna transkriptaza

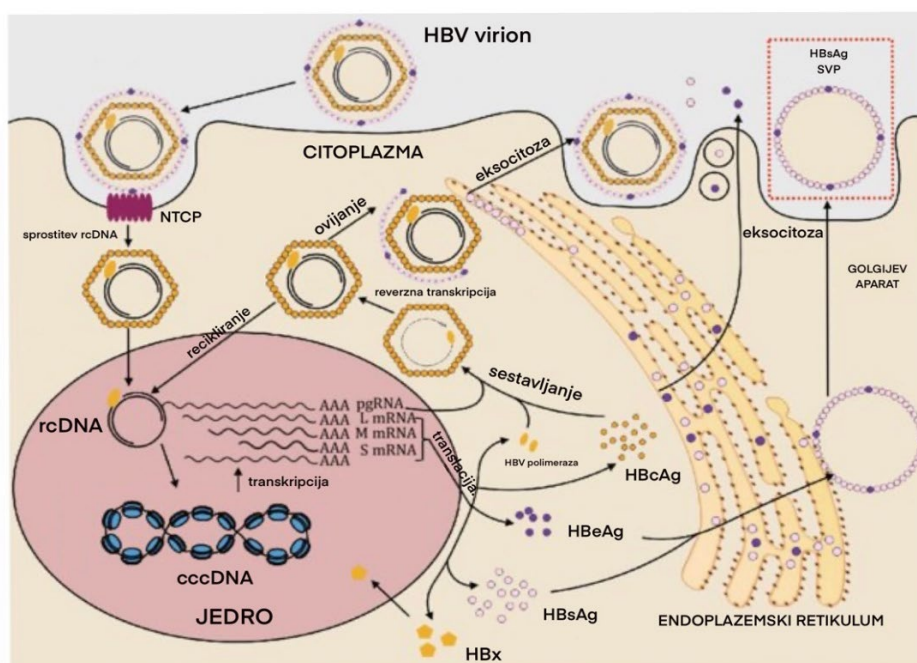
Encim je velik 90 kD in dolg 838 aminokislin. Protein ima tri funkcionalne domene in eno variabilno regijo. Na N-terminalnem koncu je terminalna proteinska domena, ki je pomembna pri iniciaciji replikacije genoma. Variabilna regija ločuje terminalno proteinsko domeno od domene reverzne transkriptaze (Bartenschlager in Schaller, 1988). Domena reverzne transkriptaze je odgovorna za replikacijo genoma z reverzno transkripcijo. Že obstoječo pgRNA pretvori v enojno verigo DNA, ki služi kot matrica novo nastajajoči verigi (Xiong in Eickbush, 1990). Zadnja je RNase H domena, ki je odgovorna za razgradnjo pgRNA, ko se tvori enoverižna DNA.

#### 2.2.5 X protein

X protein je edini regulatorni protein v HBV. Je 154 aminokislina dolg in 17 kD velik protein, ki je kodiran v najkrajšem ORF. Njegova najpomembnejša naloga je pri pomnoževanju HBV. X protein je multifunkcijski protein, ki modulira veliko hepatocitnih signalnih kaskad in drugih faktorjev. Na primer modulira apoptozo in proliferacijo (Belloni in sod., 2009).

### 2.3 ŽIVLJENSKI CIKEL VIRUSA

Zreli HBV virioni vstopijo v hepatocite preko hNTCP receptorja na celični membrani. Po sprostitvi iz virusne ovojnice se nukleokapsid prenese v jedro, kjer se genom popravi in tvori



Slika 2: Življenjski cikel HBV virusa in njegov vstop v celico (prirejeno po Wang in sod., 2020)

kovalentno zaprto krožno DNA (cccDNA). S cccDNA kot predlogo pride do transkripcije. Transkripti se izvozijo v citoplazmo, kjer se prevedejo v virusne proteine. Poleg tega se predgenomska RNA (pgRNA) pakira s core proteinom, skupaj s polimeraznim proteinom, in virusni genom, ki se replicira preko reverzne transkripcije pgRNA za tvorbo prve verige, čemur sledi delna sinteza še druge verige. Zrele nukleokapside lahko nato spremenijo genom in ga vrnejo nazaj v jedro, da ohranijo zalogo cccDNA, ali pa se ovijejo in izločijo iz celice (Slika 2) (Wang in sod., 2020).

### 2.3.1 Vstop v celico

Za vstop v celico morata biti izpolnjena dva pogoja. Študije so pokazale, da sta vrstna specifičnost in hepatotropna narava HBV posledica vsaj dveh različnih celičnih dejavnikov. Prvi je hepatocitno specifična ekspresija HBV receptorja na površini celice, humanega natrijevega tauroholatnega kotransportnega peptida (hNTCP). hNTCP je izražen samo na človeških hepatocitih, mišji NTCP pa se ne more vezati na HBV, kar je povezano z nezmožnostjo HBV, da neposredno okuži mišje hepatocite (Yan in sod., 2012). Druga raven specifičnosti celic pri okužbi s HBV je nadzorovana s hepatocitno specifičnimi transkripcijskimi faktorji, kot sta HNF1 $\alpha$  in HNF4 $\alpha$ . Ti nadzorujejo nadaljnje faze življenjskega cikla HBV po vstopu v celico. Dokazi za dodatno vlogo znotrajceličnih dejavnikov pri nadzoru specifičnosti celic pri okužbi s HBV izhajajo iz opazovanja humaniziranih mišjih NTCP, pri čemer so mesta vezave antigena na receptor mišjega NTCP nadomestili s hNTCP, kar je omogočilo vezavo HBV na receptor, vendar pa ni povzročilo produktivne okužbe s HBV v mišjih celicah (Yan in sod., 2013). Čeprav so znane aminokislinske sekvence tako preS1 kot hNTCP, ki vplivajo na vezavo HBV na hNTCP, pomanjkanje učinkovitega modelnega sistema, ki bi posnemal naravno okužbo, otežuje popolno razumevanje življenjskega cikla HBV po vezavi na receptor. Huang in sod. (2012) so opazovali, da se preS1 veže na klatrin težko verigo in adapter, protein AP-2, v primarnih humanih hepatocitih, in da izklop teh proteinov zavira okužbo. To nakazuje, da HBV-hNTCP kompleks vstopi v celico preko klatrin-posredovane endocitoze (Slika 2).

### 2.3.2 Kovalentno zaprta krožna DNA, cccDNA

Ko virusni genom enkrat vstopi v celico, se HBV DNA prenese v jedro z mehanizmi, ki še niso povsem znani. Eden od potencialnih mehanizmov je aktivni transport nukleokapside skozi jedrne pore (Rabe in sod., 2009). Drug potencialni mehanizem vključuje CTD fosforilacijo jedrnega proteina, kar naj bi izpostavilo signale za lokalizacijo v jedru, kar vodi do razgradnje nukleokapside in prenosa relaksirane krožne (rc) oblike HBV DNA v jedro skozi jedrne pore (Schmitz in sod., 2010). Enojno verižne vrzeli v rcDNA se popravijo bodisi z razširitvijo verige s HBV polimerazo bodisi z aktivnostjo popravljalnih proteinov gostitelja, in kovalentno zaprte krožne DNA (ang. covalently-closed circular DNA – cccDNA) se tvori kot nukleosomsko vezan minikromosom v jedru celice. Opazovanja, da nekatere HBV transgene miši ne proizvajajo cccDNA, in da nukleozidni analogi, ki zavirajo funkcijo reverzne transkripcije polimeraze, ne preprečujejo tvorbe cccDNA, nakazujejo, da tvorba cccDNA verjetno vključuje

specifične gostiteljske dejavnike (Guidotti in sod., 1995). Poleg študij, ki nakazujejo vlogo celičnih histonov pri tvorbi cccDNA, obstajajo tudi dokazi, da je cccDNA vezana tako na kor protein (Bock in sod., 2001) kot na protein X (Belloni in sod., 2009), kar vpliva na strukturno ureditev cccDNA episoma in epigenetsko regulacijo cccDNA. Čeprav več študij nakazuje, da protein X ni potreben za tvorbo cccDNA, se transkript virusne RNA iz cccDNA izgubi v odsotnosti proteina X (Lucifora in sod., 2011). Domnevajo, da protein X uravnava raven acetilacije in metilacije histonov cccDNA (Slika 2) (Rivière in sod., 2015).

### **2.3.3 Transkripcija**

Pri transkripciji sodeluje RNA polimeraza II gostitelja, ki uporablja celično specifične transkripcijske faktorje in cccDNA, ki služi kot predloga za vse virusne transkripte, za sintezo 5'-cap in 3'-poliadeniliranih RNA transkriptov. Prevajanje virusnih transkriptov poteka v citoplazmi po izvozu iz jedra.

Medtem ko se del predgenomske RNA prevaja, to je transkript subgenoskega dela genoma, tvori zalogo jedrnih in polimeraznih proteinov, pgRNA prav tako služi kot predloga za reverzno transkripcijo. To zahteva enkapsidacijo pgRNA z 120 dimeri kor proteina za tvorbo nukleokapside. Enkapsidacija vključuje signal enkapsidacije na 5' koncu pgRNA, imenovan  $\epsilon$ , ki ga prepozna in veže polimeraza. Raziskave so pokazale, da je struktura 5' cap potrebna za pakiranje pgRNA (Jeong in sod., 2000).

### **2.3.4 Sinteza DNA**

Ko je pgRNA enkrat združena s core proteini, se začne reverzna transkripcija s pomočjo polimeraznega prilepljanja iz specifičnega tirozinskega ostanka v N-terminalni domeni polimeraze (Zoulim in sod., 1994). Nastajajoča veriga se podaljšuje od 3' do 5' do zaključka pgRNA. Nastane DNA veriga, ki je kopija pgRNA in vsebuje še dodatno 10 nt terminalno redundanco. Večina pgRNA se med sintezo DNA razgradi z RNazno H aktivnostjo polimeraze, preostale baze pa služijo kot 5' začetnega oligonukleotida (prajmer) za sintezo nasprotno DNA verige (Loeb in sod., 1991). Podaljšava tega prajmerja z njegovega 5' položaja rezultira z dvojno verižno linearno obliko genoma, ki ni sposobna replikacije (Staprans in sod., 1991). Ta dvojno verižna linearna oblika pa ima vlogo kot glavna oblika HBV DNA, ki se lahko integrira v genom gostitelja (Bill in Summers, 2004).

Pomnoževanje poteka v kor delcih v citosolu hepatocitov, okuženih z HBV, in končni produkt sinteze DNA je enkapsidirana, delno dvoverižna vijačnica rcDNA s polimerazo. Ta nukleokapsid lahko nadaljuje v eno od dveh smeri. Prva smer je transport nukleokapsida nazaj v jedro za povečanje in vzdrževanje zaloge cccDNA v celici.

### **2.3.5 Končna enkapsidacija in sprostitve iz celice**

Drugi potencialni proces, povezan z nukleokapsido HBV, je ovijanje z HBV ovojninjskimi glikoproteini, ki se nahajajo v membrani endoplazemskega retikuluma (Slika 2). Ovijejo se

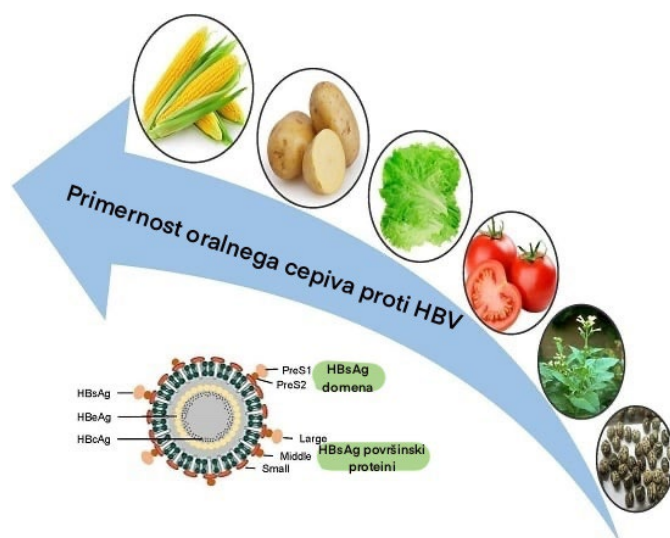
samo nukleokapsidi, ki vsebujejo zrelo rcDNA, medtem ko se nukleokapsidi s ssDNA ali RNA ne izločajo iz celice (Ning in sod., 2011).

Skupna izločitev infektivnih HBV nalezljivih delcev naj bi bila le 1–10 virionov na celico na dan, kar zaradi velikega števila celic v jetrih lahko povzroči visoke titre HBV *in vivo*, vendar ta počasnost pomnoževanja ovira *in vitro* raziskave, ki zahtevajo izolacijo velikih količin nalezljivega virusa. Sprva je bilo mišljeno, da izločanje nalezljivih delcev sledi isti sekrecijski poti kot veliko bolj številčni subvirusni SVP delci, pri čemer se ovojninski proteini nahajajo v vmesnem prostoru endoplazemski retikulum-golgi, od koder se lahko vežejo na DNA-vsebujoči kapsid, vstopijo v lumen in se izločijo iz celice. Vendar so nedavna proučeanja potrdila, da se zreli HBV virioni izločajo iz celice po poti, ki je odvisna od proteinov, vključenih v kompleks za endosomalni sortirni kompleks potreben za transport (ESCRT), ki tvori multivezikularna telesa (Watanabe in sod., 2007).

### 3 ZGODOVINA CEPIVA PROTI HEPATITISU B

Virus hepatitisa B je bil odkrit v šestdesetih letih prejšnjega stoletja (Blumberg in sod., 1965). Prvo licenčno cepivo proti HBV se je pojavilo po skoraj 20 letih od odkritja (Krugman, 1982). To cepivo prve generacije je vsebovalo subvirusne delce HBV, prečiščene iz inaktiviranega seruma prenašalcev. Cepivo je pokazalo zelo visoko učinkovitost, vendar se je kmalu izkazalo, da so količine nezadostne, proizvodnja pa draga. Zato se je pričela zasnova podenotnega cepiva, ki temelji na osnovnem imunogenu HBV, majhnem površinskem antigenu (S-HBsAg) (McAleer in sod., 1984). Proizvodnja te nove generacije cepiv z rekombinantnim antigenom (rHBsAg) v kvasovkah je izpolnila pričakovanja glede varnosti, poleg tega pa je tako cepivo veliko cenejša od cepiv prve generacije. Virusom podobni delci (VLP), sestavljeni iz rekombinantnega S-HBsAg, so bili skoraj enaki in enako imunogeni kot naravni subvirusni delci, zato so cepiva, ki vsebujejo rHBsAg, pokazala eno najvišjih stopenj učinkovitosti. Vendar pa so začetna cena, okrog 40 dolarjev za posamezno dozo ter nujnost treh intramuskularnih injekcij, distribucija hladne verige in spremljajoča infrastruktura še vedno predstavljali ekonomsko oviro za najpotrebnejše države v razvoju. Poleg tega se je sčasoma izkazalo, da nekatere skupine ljudi, zlasti starejši, debeli in bolniki s sindromi imunske pomanjkljivosti, niso reagirali na podenotna cepiva na osnovi S-HBsAg (Singh in sod., 2003). Zato so bili v poznih osemdesetih let prejšnjega stoletja izvedeni številni raziskovalni projekti za razvoj učinkovitejših cepiv za preprečevanje in zdravljenje bolezni. Cepiva tretje generacije poleg S-HBsAg vsebujejo še druge ovojne proteine virusa hepatitisa B, to so srednji (M-HBsAg) in/ali veliki (L-HBsAg) površinski antigeni z značilnimi močno imunogenimi domenami preS1 in/ali preS2 (Bruss, 2007). Pripravki, ki vsebujejo dva ali vse tri površinske antigene HBV, so pokazali povečano imunogenost. Ti antigeni se običajno pridobivajo iz kvasovk ali iz celičnih linij CHO (celice jajčnikov kitajskega hrčka, ang. Chinese hamster ovary) in drugih dragih ekspresijskih sistemov sesalčjih celic (Shouval in sod., 1994). Zato cepiva tretje generacije še vedno niso pogosto v uporabi, razen pri tistih, ki se ne odzovejo na klasična cepiva. M- in L-HBsAg sta bila skupaj z jedrnim antigenom HBV (HBcAg) prav tako obravnavana kot sestavina domnevnih terapevtskih cepiv za kronične bolnike (Couillin in sod., 1999).

Rastlinska cepiva so se zdela odlično orodje za množično preventivo. Oralno uporabljeni rastlinski antigeni so že veljali za alternativo ali vsaj dopolnilo cepivom za injiciranje (Langridge, 2000). Tudi drugi dejavniki so pokazali, da bi bile lahko rastline močan vir cepiv. Stroški za proizvodnjo cepiv v rastlinskih ekspresijskih sistemih naj bi bili primerljivi z mikrobnimi bioreaktorji in veliko nižji kot v sesalskih celičnih linijah. Še več, v nasprotju z mikroorganizmi, predvsem bakterijami, je bilo znano, da rastline izražajo evkariontske proteine v pravilno zviti, modificiranih, sestavljenih in posledično nativnih in biološko aktivnih oblikah. Cepiva iz rastlin so veljala tudi za prednostna v smislu varnosti, saj so naravno brez mikrobnih toksinov in pirogenov ali človeških in živalskih patogenov, vključno s provirusi. Vendar pa je veljalo, da je največja korist in prednost oralna imunizacija in v najbolj ambicioznih načrtih naj bi se cepiva na rastlinski osnovi uporabljala kot užitna cepiva (Peng in sod., 1989). Oralna pot dostave cepiva je pomenila dve bistveni prednosti, to je odpravo zapletene obdelave materiala, predvsem čiščenja, in dajanje brez igle, ki je zagotovilo minimalizacijo zdravstvenih storitev ali celo olajšalo samoaplikacijo. Poleg tega so rastlinska cepiva domnevno preprosta v logističnem smislu. Proizvajali naj bi jih lokalno ali pa jih distribuirali brez hladne verige – kot gomolje, plodove, semena ali suho sadje, ki jih je mogoče shranjevati in prevažati pri sobni temperaturi. Na splošno se domneva, da so rastlinska cepiva, zlasti peroralna, poceni in enostavna, tako v proizvodnji, distribuciji kot pri uporabi, zlasti v državah v razvoju.



Slika 3: Transgene rastline oziroma njihovi deli primerni za vnos cepiva z zaužitjem proti hepatitisu B (prirejeno po Joung in sod., 2016)

Kot prvo ekspresijo antigena iz rastlinskega sistema za cepljenje ljudi so poročali o majhnem površinskem antigenu HBV (Mason in sod., 1992). V zadnjih desetletjih je bilo realiziranih veliko projektov rastlinske proizvodnje antigenov HBV. Za povečanje proizvodnega obsega so poskušali uporabiti različne dejavnike in pristope, kot so ekspresijski sistemi – stabilni ali prehodni, rastlinski gostitelji, promotorji, druga regulatorna in signalna zaporedja, modifikacija zaporedja kodiranja antigena itd. Stabilna ekspresija v transgenih rastlinah, pridobljena s posredno transformacijo z *Agrobacterium*, je bila glavni sistem, uporabljen za ekspresijo antigenov HBV. Neomicin fosfotransferaza, ki jo izraža npt II transgen, je bila običajno

uporabljena kot selekcijski oz. markerski gen, v posameznih primerih tudi hpt II transgen, ki kodira higromicin fosfotransferazo ali odpornost na higromicin (Imani in sod., 2002).

V največjem obsegu se je proučevalo mali površinski antigen. Kot ekspresijske sisteme so uporabljali različne rastline, tkiva in celične kulture (Sojikul in sod., 2003). Čeprav je bilo narejenih veliko raziskav in optimizacij količina sintetiziranih aktivnih učinkovin v rastlinah ni bila zadostna za uporabo v farmaciji. Vsebnosti antigenov v rastlinah so nihale med 0.01 do nekaj mikrogramov na gram sveže mase. Nedavni rezultati pa kažejo, da lahko transgene rastline sintetizirajo velike količine S-HBsAg. Solata, ki je vsebovala preprosto ekspresijsko kaseto, sestavljeno iz običajnega promotorja 35S in nemodificiranega kodirajočega zaporedja, je sintetizirala S-HBsAg v listih v povprečju 20 µg/g sveže mase in največ 60 µg/g sveže mase (Pniewski in sod., 2011). Takšen obseg proizvodnje, čeprav obetaven in izjemen za transgene rastline, še vedno ostaja približno 4–6-krat nižji od najboljših rezultatov, pridobljenih pri rastlinah, ki prehodno izražajo ta antigen. Srednji in veliki površinski antigen sta manj raziskana in tudi njuni pridelki so bili nižji od majhnega antigena. Koncentracije obeh antigenov so bile okrog 0,4 do 2 µg/g sveže mase (Lou in sod., 2007). Najboljše pa se je v rastlinskem ekspresijskem sistemu izkazal jedrni antigen (HBcAg), ki tvori kapsidi podobne delce in je primeren za terapijo kromičnih bolnikov (Böcher in sod., 2001). Že 1998 je pridelek v tobaku dosegel 24 µg/g sveže mase (Tsuda in sod., 1998), danes pa dosega vrednosti od 0,5 do 2 mg/g sveže mase (Huang in sod., 2009).

## 4 RAZVOJ TRANSGENEGA CEPIVA

Pridobivanje antigenov za proizvodnjo cepiv lahko delimo na dva dela. Lahko pridobivamo celostne antigenske proteine ali pa samo antigene oz. dele proteinov, ki jih prepozna imunski sistem. Pri prvem načinu vnesemo v plazmid nukleotidno zaporedje za cel gen, pri drugem pa samo zapis za antigen, ki ga želimo pridobiti (Monreal-Escalante in sod., 2022).

### 4.1 VNOS TRANSGENOV V RASTLINSKO CELICO

Da rastlina sintetizira proteine, kot je antigen HBV, moramo v rastlinsko celico vstaviti transgene, ki kodirajo zapis za željen protein. Poznamo več vrst transformacije rastlinskih celic, delimo jo na neposredne in posredne. Med neposredne uvrščamo metode, kot so elektroporacija, biolistika, transformacija z liposomi in mikroinjiciranje. Med posredne pa transformacijo z vektorji, kot na primer bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, ki vsebuje transgene za vnos dednega zapisa v rastlinske celice. Najpogosteje se uporablja slednja metoda (Imani in sod., 2002; Pniewski in sod., 2011).

*Agrobacterium tumefaciens* je za dvokaličnice patogena bakterija, ki povzroča nastanek tumorjev na predelu hipokotila. Geni za povzročitev nastanka tumorjev se nahajajo na Ti plazmidu. Ti plazmid vsebuje ori gene (mesto za podvojevanje plazmida), vir gene (povzročitelje okužbe) in T-DNA, ki je omejena z levo in desno mejno sekvenco in med njima vsebuje še onco gene (povzročajo intenzivno rast tumorjev) in gene za sintezo opinov. Ker ob in vitro transformaciji ne želimo povzročiti nastanka tumorjev iz Ti plazmidov odstranimo onco

gene in gene za sintezo opinov, v T-DNA pa vstavimo željene gene, ki se vnesejo v rastlinsko celico, to so v primeru hepatitisa B geni za antigen HBV (Escobar in Dandekar, 2003).

Za prenos T-DNA in s tem tudi genov za antigen je potrebno, da bakterija zazna fenolne spojine, monosaharide in druge snovi, ki se sproščajo na ranjenih mestih rastline, kjer lahko pride do okužbe. Za nadaljnje korake skrbijo vir geni, ki nosijo zapis za Vir proteine, ki omogočajo prenos T-DNA in vključitev v rastlinski genom. Pomembni so tudi Chv proteini, katerih genski zapis je v bakterijskem kromosomu in omogočajo pritrditev bakterije na rastlinsko celično steno. Ko pride do pritrditve in zaznave poškodbe rastlinske celice protein Vir A preko Vir G sproži prepis ostalih vir genov na Ti plazmidu. VirD1 in D2 omogočita cepitev T-DNA na robnih sekvencah iz plazmida. Ker je enojna veriga T-DNA v citosolu izpostavljena nukleazam se nanjo veže VirE, ki jo zaščiti. Produkti operona v bakterijski membrani omogočijo prehod enoverižne T-DNA v rastlinsko celico, kjer se naključno vgradi v genom (Citovsky in sod., 1988).

#### 4.2 REGENERACIJA TRANSFORMIRANIH RASTLIN

Regeneracija transgene rastlinske celice, ki smo ji vnesli gene za antigen je ključen korak v razvoju cepiva. Tehnika in način regeneracije je odvisna od izbire rastlinske vrste. Torej morajo biti tehnike regeneracije rastlinske vrste že razvite in dobro optimizirane. Če je regeneracija uspešna je možno iz ene same transformirane celice pridobiti transformirano rastlino, jo razmnožiti in iz njih lahko v našem primeru izoliramo antigen HBV za pridobivanje cepiva.

#### 4.3 IZOLACIJA ANTIGENA IZ TRANSFORMIRANIH RASTLIN

Izolacija antigenov je drag postopek, saj se produkt, antigen HBV, nahaja v celici. Če pridobivamo antigene s celično kulturo pa lahko vnesemo v celice pot za izločanje produkta. Prvi korak pri ekstrakciji je homogenizacija rastlinskega tkiva v katerem se nahajajo antigeni, ki smo ga poželi. Poznamo več vrst homogenizacije, ki jih izbiramo glede na vrsto rastlinskega materiala. Ker je antigen protein moramo biti pozorni, da dodamo inaktivatorje proteaz, ki se sprostijo ob homogenizaciji, in bi lahko razgradile antigene. Izogibati se moramo tudi metod, ki potekajo pri višjih temperaturah ali pri neustreznem pH, da ne bi produkt denaturiral. Ko so celice razbite in je vsebina celice sproščena sledi ločevanje trdne in tekoče faze s centrifugiranjem. Ko smo odstranili netopne večje delce moramo odstraniti še vse ostale nečistote. Uporabimo lahko različne kombinacije metod kot so različne vrste kromatografij, membranske filtracije, izločanje (precipitacije). Najpogosteje se za ločevanje antigenov HBV uporablja ionska izmenjevalna kromatografija zaradi fizikalno kemičnih lastnosti antigena (Wilken in Nikolov, 2012).

### 5 RAZLIČNE RASTLINSKE VRSTE KOT EKSPRESIJSKI SISTEMI

Eno od glavnih vprašanj za pridobivanje cepiv iz transgenih rastlin je izbor rastlinske vrste. Pomembno je da je vrsta dovzetna za transformacijo in regeneracijo. Glavna lastnost pa je pridelati velike količine antigena. Z razvojem tehnologij se kot ekspresijski sistemi pojavljajo

različne rastlinske vrste, ki niso samo modelne temveč tudi vrste, ki so agronomsko zanimive in prisotne. Najpogosteje se za sintezo antigenov HBV uporabljajo rastline, kot so tobak (*Nicotiana tabacum*), krompir (*Solanum tuberosum*), paradižnik (*Lycopersicon esculentum*) in banana (*Musa acuminata*). Poleg teh pa so zanimive tudi druge vrste, ki pa niso še tako raziskane in pogosto uporabljene (Fischer in sod., 2004).

### 5.1 TOBAK (*Nicotiana tabacum*)

Tobak je vrsta, ki ni namenjena prehrani ljudi, zato tudi ne predstavlja tveganja, da bi transgeni tobak vstopil v prehransko verigo. Prednost tobaka je tudi oblikovanje listov preden zacveti in to nam omogoča še dodaten nadzor nad širjenjem genskega materiala transgenega tobaka. Obstajajo pa tudi relativno enostavne in dobro optimizirane metode za transformacijo in regeneracijo tobaka, kar pripomore k pridelavi transgenega tobaka. Večina drugih rastlinskih vrst se uporablja v eksperimentalni fazi, tobak pa se uporablja že na višji ravni proizvodnje cepiv. Poglavitne lastnosti za tak napredek so hiter rastni cikel in reprodukcijski čas, nizki stroški pridelave, dobra dovzetnost za genske manipulacije in preučenost postopkov ekstrakcije. Slabost tobaka pa je sinteza toksičnih spojin, ki onemogočajo uživanje rastline (Guan in sod., 2010; Bhatia in Dahiya, 2015).

Mason in sod. (1992) so že leta 1992 transformirali tobak z geni za HBsAg in odkrili izražanje tega transgena v listih tobaka. Z imunoafinitetno kromatografijo in elektronsko kromatografijo so opazili 22 nm velike sferične delce. Dokazali so tudi veliko podobnost z antigeni iz humanega seruma. Thanavala in sod. (1995) pa so nekaj let pozneje že vbrizgali HBsAg v miši. Miši so se na rekombinantni antigen iz tobaka odzvale zelo podobno kot na komercialno cepivo, ki vsebuje rekombinantni antigen iz kvasovk. Rekombinantni antigen iz tobaka je sprožil delovanje T in B limfocitov, vendar v manjšem obsegu. Domnevajo da je to posledica slabe čistosti in nizke koncentracije vbrizganega antigena. Ti zaključki nam lahko povejo nekaj o užitnih cepivih, ki prav tako vsebujejo veliko drugih snovi in rastlinskih proteinov. Torej moramo povečati akumulacijo antigenov v samih tkivih rekombinantnih rastlin, da bi zadostili zadostni koncentraciji v užitnih cepivih.

### 5.2 KROMPIR (*Solanum tuberosum*)

Glavni prednosti krompirja sta hiter rastni cikel in relativno enostavna transformacija. Najpogosteje se ga poslužujejo v kliničnih testiranjih. Zmožen je tudi shranjevanja za daljše časovno obdobje brez hladnih razmer oz. hladilnika. Lahko tvori velike gomolje iz katerih lahko pridobimo velike količine antigena za različne oralno imunske teste na živalih. Ker pa gomolji surovi niso užitni jih je potrebno predhodno temperaturno obdelati s čimer izgubimo veliko antigena, ki pri visokih temperaturah izgubi svojo aktivno obliko (Guan in sod., 2010; Bhatia in Dahiya, 2015).

Krompir se je začel kot modelni organizem za oralna cepiva uporabljati v poznih devetdesetih letih in rezultati so bili uspešni. Leta 1995 so Domansky in sod. (1995) odkrili 5–10-krat višje vrednosti HBsAg v gomoljih transgenega krompirja kot v listnem tkivu. Že leta 2000 so Richter

in sod. (2000) v transgenem krompirju pridelali 1,1 µg HBsAg na g svežih gomoljev, s katerimi so v treh tedenskih dozah hranili miši. Pri miših so opazili primerna serumska protitelesa, ki so se pojavila tri tedne po zadnjem zaužitju transgenih gomoljev.

### 5.3 PARADIŽNIK (*Lycopersicon esculentum*)

Paradižnik ima, kot transgena rastlina za pridobivanje cepiv, kar nekaj prednosti. Med najpomembnejše spadajo hitra rast, dobra in enostavna homogenizacija, široko območje gojenja, lahko ga zaužijemo surovega in ima dober okus. Visoka vsebnost vitamina A, lahko pomaga pri imunskem odzivu. Oviri pa sta nizka vsebnost proteinov v plodu in kisli plodovi bi lahko vplivali na obliko antigenov v plodu (Guan in sod., 2010; Bhatia in Dahiya, 2015).

Lou in sod. (2007) so v paradižnik vstavili transgene za veliki površinski antigen HBV. Transgene za sintezo antigena so sintetizirali sami. Uporabili so promotor specifičen za plod. Imunski testi so pokazali, da je antigen predstavljal 0,02 % vseh topnih proteinov v plodu paradižnika. Merili so tudi vsebnost antigenov pri različnih stopnjah zrelosti plodov. Opazili so, da je v zrelih plodovih 65–171-krat več antigena kot v majhnih in še ne zrelih plodovih. Z elektronsko mikroskopijo so potrdili akumulacijo antigena v plodovih.

### 5.4 BANANA (*Musa acuminata*)

Banana je bila med prvimi sadnimi vrstami, ki so jih transformirali. Prednosti banane so poceni gojenje, užiten surov plodovi, tudi ob kuhanju se proteini ne denaturirajo, zelo razširjena pridelava na območju razvijajočih se držav. Njene slabosti pa so hiter propad plodu po obiranju, majhna vsebnost proteinov v plodu, drevo potrebuje dve do tri leta da lahko rodi plodove in slaba verjetnost transformacije (Guan in sod., 2010; Bhatia in Dahiya, 2015).

Prvi antigen, ki so ga vnesli v banano je bil HBsAg (Mason in sod., 2002). Z *Agrobacterium* so poskušali vnesti 4 različne genske konstrukte, da bi optimizirali ekspresijo HBsAg v banani. Z ELISA testi so potrdili ekspresijo pri vseh štirih genskih konstruktih. Največji pridelek je znašal 38 ng/g sveže mase listov v in vitro razmerah. Največji pridelek v rastlinjaku pa je znašal 19,92 ng/g sveže mase listov vendar v rastlinah z drugim genskim konstruktom. Opazili so tudi podoben imunski odziv na antigene iz transgene banane kot pri antigenih iz humanega seruma.

## 6 ZAKLJUČEK

Raziskave sinteze antigenov za cepivo proti hepatitisu B v transgenih rastlinah so pokazale obetavne rezultate, ki imajo potencial za korenito spremembo v proizvodnji cepiv. Uporaba transgenih rastlin kot biotovarn za proizvodnjo HBsAg, prinaša številne prednosti, med katerimi so nizki stroški, varnost, enostavno ekstrahiranje in hitra proizvodnja. Rastlinske celice omogočajo enostavno in učinkovito sintezo antigenov, kar omogoča bolj dostopna cepiva, zlasti v državah z omejenimi finančnimi sredstvi.

Postopek pridobivanja antigenov vključuje transformacijo rastlinskih celic z genskim materialom, ki kodira HBsAg, kar povzroči, da rastline same sintetizirajo ta antigen, ki ni njihov lasten protein. Sledi ekstrakcija in čiščenje HBsAg iz rastlinskega materiala, kar zahteva natančne metode za zagotavljanje čistosti in učinkovitosti antigena. Uporaba tehnologij, kot so diafiltracija in kromatografija, je ključnega pomena za doseg tega cilja. Različne študije so pokazale, da transgene rastline lahko sintetizirajo HBsAg, ki je imunogen, kar potrjuje potencial teh rastlin kot alternativnega vira za proizvodnjo cepiv.

Poleg tega so raziskave pokazale, da je možno izboljšati proizvodnjo in stabilnost antigena z optimizacijo rastnih razmer in genske zasnove rastlin. Transgene rastline ne predstavljajo le inovativne rešitve za proizvodnjo cepiv, temveč tudi zmanjšujejo tveganja, povezana s proizvodnjo cepiv v tradicionalnih celičnih kulturah, ki lahko vsebujejo patogene, ki so lahko nevarni za prejemnika. Rastline kot proizvodne platforme nudijo tudi ekološke prednosti, saj zmanjšujejo odvisnost od živalskih celičnih kultur in so manj obremenjujoče za okolje. Nadaljnje raziskave in razvoj so potrebni za izboljšanje učinkovitosti proizvodnega procesa, povečanje izkoristka in znižanje stroškov. Prav tako je ključno zagotoviti skladnost z regulativnimi standardi za varnost in učinkovitost cepiv, proizvedenih v transgenih rastlinah. Skupaj ti rezultati poudarjajo pomembnost nadaljnjih raziskav in razvoja na tem področju ter kažejo na velik potencial transgenih rastlin kot trajnostne in učinkovite platforme za proizvodnjo cepiv.

Takšni napredki lahko pomembno izboljšajo dostopnost in distribucijo cepiv proti hepatitisu B ter drugih boleznih, kar bo imelo pozitiven vpliv na globalno javno zdravje. Cepiva, proizvedena v transgenih rastlinah, lahko prispevajo k zmanjšanju teh zdravstvenih bremen, saj omogočajo široko dostopnost in cenejšo proizvodnjo. To je še posebej pomembno v revnejših državah, kjer so obstoječa cepiva predraga in zaradi tega vsem potrebnim oz. obolelim nedostopna.

## 7 VIRI

- Bartenschlager R., Schaller H. 1988. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *The EMBO Journal*, 7, 13: 4185–4192, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03315.x>
- Belloni L., Pollicino T., De Nicola F., Guerrieri F., Raffa G., Fanciulli M., Raimondo G., Leviero M. 2009. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulations of cccDNA function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 47: 19975–19979, <https://doi.org/10.1073/pnas.0908365106>
- Bhatia S., Dahiya R. 2015. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. V: Edible vaccines.* Jones K. (ur.). Academic Press: 333–343, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00009-1>
- Bill C. A., Summers, J. 2004. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 30: 11135–11140, <https://doi.org/10.1073/pnas.0403925101>

- Birnbaum F., Nassal M. 1990. Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *Journal of Virology*, 64, 7: 3319–3330, <https://doi.org/10.1128/JVI.64.7.3319-3330.1990>
- Blumberg B.S., Alter H.J., Visnich S. A. 1965. A “new” antigen in leukaemia sera. *JAMA*, 191, 7: 541–546, <https://doi.org/10.1001/jama.1965.03080070025007>
- Böcher W.O., Dekel B., Schwerin W., Geissler M., Hoffmann S., Rohwer A., Arditti F., Cooper A., Bernhard H., Berrebi A., Rose-John S., Shaul Y., Galle P. R., Löhr H.F., Reisner Y. 2001. Induction of strong hepatitis B virus (HBV) specific T helper cell and cytotoxic T lymphocyte responses by therapeutic vaccination in the trimera mouse model of chronic HBV infection. *European Journal of Immunology*, 31, 7: 2071–2079, [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200107\)31:7%3C2071::aid-immu2071%3E3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200107)31:7%3C2071::aid-immu2071%3E3.0.co;2-d)
- Bruss V. 2007. Hepatitis B virus morphogenesis. *World Journal of Gastroenterol*, 13, 1: 65–73, <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i1.65>
- Chen M., Sallberg M., Hughes J., Jones J., Guidotti L. G., Chisari F. V., Billaud J. N., Milich D. R. 2005. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *Journal of Virology*, 79, 5: 3016–3027, <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.3016-3027.2005>
- Citovsky V., De Vos G., Zambryski P. 1988. Single-stranded DNA binding protein encoded by the virE locus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*, 240, 4851: 501–504, <https://doi.org/10.1126/science.240.4851.501>
- Couillin I., Pol S., Mancini M., Driss F., Brechot C., Tiollais P., Michel M. L. 1999. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B: Induction of T cell proliferative responses specific for envelope antigens. *The Journal of Infectious Diseases*, 180, 1: 15–26, <https://doi.org/10.1086/314828>
- Domansky N., Ehsani P., Salmanian A. H., Medvedeva T. 1995. Organ-specific expression of hepatitis B surface antigen in potato. *Biotechnology Letters*, 17: 863–866, <https://doi.org/10.1007/BF00129019>
- Escobar M. E., Dandekar A. M. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8, 8: 380–386, [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(03)00162-6)
- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Twyman R. M. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 2: 152–158, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.007>
- Guan Z. J., Guo B., Huo Y. L., Guan Z. P., Wei Y. H. 2010. Overview of expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Vaccine*, 28, 46: 7351–7362, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.100>
- Guidotti L. G., Matzke B., Schaller H., Chisari F. V. 1995. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *Journal of Virology*, 69, 10: 6158–6169, <https://doi.org/10.1128/JVI.69.10.6158-6169.1995>
- Huang Z., Chen Q., Hjelm B., Arntzen C., Mason H. 2009. A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 103, 4: 706–714, <https://doi.org/10.1002/bit.22299>
- Huang H. C., Chen C. C., Chang W. C., Tao M. H., Huang C. 2012. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *Journal of Virology*, 86, 17: 9443–9453, <https://doi.org/10.1128/JVI.00873-12>
- Imani J., Berting A., Nitsche S., Schaefer S., Gerlich W. H., Neumann K. H. 2002. The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 157–164, <https://doi.org/10.1023/A:1019903216459>

- Jeong J. K., Yoon G. S., Ryu W. S. 2000. Evidence that the 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *Journal of Virology*, 74, 12: 5502–5508, <https://doi.org/10.1128/jvi.74.12.5502-5508.2000>
- Joung Y. H., Park S. H., Moon K. B., Jeon J. H., Cho H. S., Kim H. S. 2016. The last ten years of advancements in plant-derived recombinant vaccines against hepatitis B. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 10: 1715, <https://doi.org/10.3390%2Fijms17101715>
- Krugman S. 1982. The newly licensed hepatitis B vaccine. Characteristics and indications for use. *JAMA*, 247, 14: 2012–2015, <https://doi.org/10.1001/jama.1982.03320390074052>
- Lamontagne R. J., Bagga S., Bouchard M. J. 2016. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Research*, 2: 163–186, <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2016.05>
- Langridge W. H. 2000. Edible vaccines. *Scientific American*, 283, 3: 66–71, <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0900-66>
- Loeb D. D., Hirsch R. C., Ganem, D. 1991. Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements. *The EMBO Journal*, 10, 11: 3533–3540, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04917.x>
- Lou X.-M., Yao Q.-H., Zhang Z., Peng R.-H., Xiong A.-S., Wang H.-K. 2007. Expression of the human Hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 4: 464–469, <https://doi.org/10.1128%2FCVI.00321-06>
- Lucifora J., Arzberger S., Durantel D., Belloni L., Strubin M., Levrero M., Zoulim F., Hantz O., Protzer U. 2011. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of Hepatology*, 55, 5: 996–1003, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.015>
- Mason H. S., Lam D. M.-K., Arntzen C. J. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 89, 24: 11745–11749, <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.89.24.11745>
- Mason H. S., Warzecha H., Mor T., Arntzen C. J. 2002. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 7: 324–329, [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(02\)02360-2](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(02)02360-2)
- McAleer W. J., Buynak E. B., Maigetter R. Z. 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*, 307, 5947: 178–180, <https://doi.org/10.1038/307178a0>
- Monreal-Escalante E., Ramos-Vega A., Angulo C., Bañuelos-Hernández B. 2022. Plant-based vaccines: antigen design, diversity, and strategies for high level production. *Vaccines*, 10, 1: 100, <https://doi.org/10.3390/vaccines10010100>
- Ning X., Nguyen D., Mentzer L., Adams C., Lee H., Ashley R., Hafenstein S., Hu J. 2011. Secretion of genome-free hepatitis B virus--single strand blocking model for virion morphogenesis of para-retrovirus. *PLoS Pathogens*, 7, 9: 1002255, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002255>
- Peng H. J., Turner M. W., Strobel S. 1989. The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration. *Immunology*, 67, 3: 425–430
- Pniewski T., Kapusta J., Bociąg P., Wojciechowicz J., Kostrzak A., Gdula M., Fedorowicz-Strońska O., Wójcik P., Otta H., Samardakiewicz S., Wolko B., Plucienniczak A. 2011. Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for prototype plant-derived vaccine tablet formulation. *Journal of Applied Genetics*, 52, 2: 125–136, <https://doi.org/10.1007%2Fs13353-010-0001-5>

- Pniewski T. 2013. The twenty-year story of a plant-based vaccine against hepatitis B: stagnation or promising prospects? *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 1: 1978–98, <https://doi.org/10.3390/ijms14011978>
- Rabe B., Delaleau M., Bischof A., Foss M., Sominskaya I., Pumpens P., Cazenave C., Castroviejo M., Kann M. 2009. Nuclear entry of hepatitis B virus capsids involves disintegration to protein dimers followed by nuclear reassociation to capsids. *PLoS Pathogens*, 5, 8: 1000563, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000563>
- Richter L. J., Thanavala Y., Arntzen G. J., Mason H. S. 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology*, 18, 11: 1167–1171, <https://doi.org/10.1038/81153>
- Rivière L., Gerossier L., Ducroux A., Dion S., Deng Q., Michel M. L., Buendia M. A., Hantz O., Neuveut C. 2015. HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *Journal of Hepatology*, 63, 5: 1093–1102, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.023>
- Schmitz A., Schwarz A., Foss M., Zhou L., Rabe B., Hoellenriegel J., Stoeber M., Panté N., Kann M. 2010. Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathogens*, 6, 1: 1000741, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000741>
- Seeger C., Zoulim F., Mason W. S. 2001. Hepadnaviruses. V: Fields virology. 5th ed. Knipe D. M., Howley P. M. (ur.). Lippincott Williams & Wilkins: 3376–3436
- Shouval D., Ilan Y., Adler R., Deepen R., Panet A., Even-Chen Z., Gorecki M., Gerlich W. H. 1994. Improved immunogenicity in mice of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre-S1 and pre-S2 antigens as compared with conventional yeast-derived vaccines. *Vaccine*, 12, 15: 1453–1459, [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0264-410x(94)90155-4)
- Singh N. P., Mandal S. K., Thakur A., Kapoor D., Anuradha S., Prakash A., Kohli R., Agarwal S.K. 2003. Efficacy of GM-CSF as an adjuvant to hepatitis B vaccination in patients with chronic renal failure — Results of a prospective, randomized trial. *Renal Failure*, 25, 2: 255–266, <https://doi.org/10.1081/jdi-120018726>
- Sojikul P., Buehner N., Mason H. S. 2003. A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5: 2209–2214, <https://doi.org/10.1073/pnas.0438037100>
- Stannard L. M., Hodgkiss M. 1979. Morphological irregularities in Dane particle cores. *The Journal of General Virology*, 45, 2: 509–514, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-45-2-509>
- Staprans S., Loeb D. D., Ganem D. 1991. Mutations affecting hepadnavirus plus-strand DNA synthesis dissociate primer cleavage from translocation and reveal the origin of linear viral DNA. *Journal of Virology*, 65, 3: 1255–1262, <https://doi.org/10.1128/JVI.65.3.1255-1262.1991>
- Tatematsu K., Tanaka Y., Kurbanov F., Sugauchi F., Mano S., Maeshiro T., Nakayoshi T., Wakuta M., Miyakawa Y., Mizokami M. 2009. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *Journal of Virology*, 83, 20: 10538–10547, <https://doi.org/10.1128/JVI.00462-09>
- Thanavala Y., Yang Y. F., Lyons P., Mason H. S., Arntzen C. 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 8: 3358–3361, <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3358>

- Tsuda S., Yoshioka K., Tanaka T., Iwata A., Yoshikawa A., Watanabe Y., Okada Y. 1998. Application of the human Hepatitis B Virus core antigen from transgenic tobacco plants for serological diagnosis. *Vox Sanguinis*, 74, 3: 148–155, <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.1998.7430148.x>
- Wang Z., Wang W., Wang L. 2020. Epigenetic regulation of covalently closed circular DNA minichromosome in hepatitis B virus infection. *Biophysics Reports*, 6, 16: 115–126, <http://dx.doi.org/10.1007/s41048-020-00112-z>
- Warzecha H., Mason H. S. 2003. Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *Journal of Plant Physiology*, 160, 7: 755–764, <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01125>
- Watanabe T., Sorensen E. M., Naito A., Schott M., Kim S., Ahlquist P. 2007. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 24: 10205–10210, <https://doi.org/10.1073/pnas.0704000104>
- WHO. 2024. Hepatitis B. World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (2. jul. 2024)
- Wilken L. R., Nikolov Z. L. 2012. Downstream processing of transgenic plant systems: Protein recovery and purification strategies. *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, 217–257, [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2217-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2217-0_11)
- Xiong Y., Eichbush T. H. 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *The EMBO Journal*, 9, 10: 3353–3362, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07536.x>
- Yan H., Zhong G., Xu G., He W., Jing Z., Gao Z., Huang Y., Qi Y., Peng B., Wang H., Fu L., Song M., Chen P., Gao W., Ren B., Sun Y., Cai T., Feng X., Sui J., Li W. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 1: 00049, <https://doi.org/10.7554/eLife.00049>
- Yan H., Peng B., He W., Zhong G., Qi Y., Ren B., Gao Z., Jing Z., Song M., Xu G., Sui J., Li W. 2013. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Journal of Virology*, 87, 14: 7977–7991, <https://doi.org/10.1128/JVI.03540-12>
- Zoulim F., Saputelli J., Seeger C. 1994. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *Journal of Virology*, 68, 3: 2026–2030, <https://doi.org/10.1128/jvi.68.3.2026-2030.1994>

## GLIFOSAT: NEDOLŽEN HERBICID ALI GROŽNJA?

Mojca Rob

### IZVLEČEK

Glifosat je sredstvo, ki se pogosto uporablja za odstranjevanja plevela na preprost in časovno učinkovit način. Je neselektiven herbicid, katerega uporaba je pomembna tudi na področju gensko spremenjenih rastlin, saj je po svetu v pridelavi veliko sort, ki so odporne nanj. V okolju se po uporabi dolgo zadrži, kar je v kombinaciji z njegovo masovno uporabo privedlo do tega, da je prisoten v pitni vodi, medu, urinu itd. Študije so dokazale tudi negativne vplive glifosata na žive organizme. Marca 2015 je Mednarodna agencija za raziskave raka (IARC), razvrstila glifosat v kategorijo 2A, med potencialno kancerogene substance. Druge znanstvene organizacije tega menja ne delijo. Mnogi znanstveniki dvomijo, da je odločitev drugih organizacij čisto neodvisna. Monsanto, glavni proizvajalec glifosata, je po odločitvi IARC vložil veliko denarja v oglaševalsko kampanijo o sprejemljivosti uporabe glifosata in v razreševanje sodnih sporov. V Sloveniji je glifosat v skladu z EU zakonodajo dovoljen za uporabo v omejenem obsegu, gensko spremenjene rastline odporne na glifosat pa so v EU prepovedane. Glifosat se v očeh javnosti pogosto enači z gensko spremenjenimi organizmi in Monsanto, čeprav gre za različne pojme. S tem se po nepotrebnem meče slaba luč tudi na gensko spremenjene rastline.

**Ključne besede:** glifosat, roundup ready, gensko spremenjene rastline, Monsanto, varna uporaba, tveganje

### Glyphosate: innocent herbicide or hazard?

#### Abstract

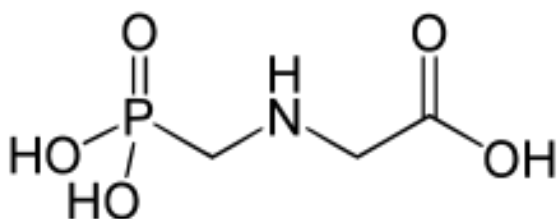
Glyphosate is a common and straightforward method for weed removal. It is a non-selective herbicide, and its use is significant in the realm of genetically modified plants, as many crop varieties resistant to it are used worldwide. Glyphosate persists in the environment for a long time after application, which, combined with its widespread use, has led to its presence in drinking water, honey, urine, and more. Studies have also demonstrated the negative impacts of glyphosate on living organisms. In March 2015, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified glyphosate as a group 2A carcinogen, meaning it is probably carcinogenic to humans. Other scientific organizations do not share this opinion. Many scientists suspect that the decisions of these organizations are not entirely independent, and after the decision of IARC Monsanto has invested significantly in advertising campaigns and legal settlements. In accordance with EU legislation, glyphosate is permitted for limited use in Slovenia, while glyphosate-resistant genetically modified plants are banned in the EU. Glyphosate is often equated with genetically modified organisms and Monsanto in the public eye, even though these are distinct concepts. This unjustly casts a negative light on genetically modified plants as well.

**Key words:** glyphosate, roundup ready, genetically modified plants, Monsanto, safe use, risk

## 1 UVOD

Glifosat je ena izmed najpogostejše uporabljenih aktivnih sestavin v herbicidih na svetu. Priljubljen je v zadnjih 30-tih letih zaradi učinkovitega zatiranja plevelov v kmetijstvu, predvsem ob pridelavi nanj odpornih gensko spremenjenih rastlin (GSR). Njegova uporaba se je močno povečala v zadnjih desetletjih, saj omogoča preprosto in učinkovito zatiranje širokega spektra plevelov, zaradi česar so kmetijski pridelki višji. Kljub temu se v javnosti odvija razprava o potencialno negativnem vplivu glifosata na okolje in zdravje ljudi. Vprašanja glede njegove morebitne rakotvornosti, vpliva na ekosisteme ter pojav odpornosti plevelov nanj so povzročila, da so znanstvene in regulatorne skupnosti postale bolj pozorne na tveganja, povezana z njegovo uporabo. V prispevku bom obravnavala glifosat, njegovo obstojnost v okolju, učinke na zdravje ter zakonodajni vidik okrog njegove uporabe.

## 2 ZNAČILNOSTI GLIFOSATA



Slika 13: Molekula glifosata (Viirlaid in sod., 2019)

Glifosat je najbolj pogosto uporabljen pesticid, natančneje herbicid na svetu. Prvič je bil predstavljen v 70. letih prejšnjega stoletja. Glifosat oz. N-(fosfonometil) glicin s kemijsko formulo  $C_3H_8NO_5P$  (Slika 1) uničuje rastline na podlagi inhibicije encima 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaze (EPSPS), s čimer zavre sintezo

aromatskih aminokislin: fenilalanina, tirozina in triptofana (Steinrücken in Amrhein, 1980). Njegova največja prednost je širok spekter uporabe. Je neselektiven herbicid, za katerega je znano, da učinkuje na več kot 150 rastlinskih vrst, med njimi so pleveli, trave, metuljnice, zeli itd., vključujoč enoletnice in trajnice ter eno- in dvokaličnice (Rodrigues in Almeida, 2005). Je aktivna učinkovina številnih komercialnih herbicidov. V Sloveniji sta najbolj pogosta Roundup in Boom efekt, v njih pa se nahaja v obliki različnih soli – amonijeve, kalijeve, ...

Glifosat ima velik pomen tudi na področju gensko spremenjenih rastlin (GSR). Kar 81% vseh GSR v pridelavi in uporabi je sort odpornih na herbicide z aktivno sestavino glifosat (Bonny, 2011). Večinoma gre za Roundup Ready (RR) sorte, odporne na herbicide z aktivno komponento glifosat in povečini trgovskim imenom Roundup.

Ob lansiranju prvih GS sort na tržišče so njihovi žlahtnitelji obljubljali, da bo uporaba glifosata doprinesla k manjši uporabi toksičnih kemikalij v kmetijstvu. Realnost je ravno nasprotna in podkrepljena z naslednjimi dejstvi (Swanson in sod., 2014; Benbrook, 2016; Myers in sod., 2016):

- Uporaba herbicidov je med leti 1990 in 2022 narastla za 50%,
- V letu 2002 je uporaba glifosata v posevkih GS soje narastla za 21%,
- V letu 2011 so kmetje, ki so gojili GS sojo, koruzo in bombaž uporabili 24% več glifosata kot kmetje, ki so gojili tradicionalne sorte

- Letno se v ZDA porabi približno za 19 milijonov funtov herbicida Roundup, kar nanese na dobrih 8,5 milijonov kilogramov.
- V prejšnjem desetletju je raba glifosata narastla za približno 60% zaradi vedno večih GS sort, odpornih na glifosat in zaradi nižje cene herbicida

### 3 VPLIV NA OKOLJE IN DEGRADACIJA

Glifosat je fosforni amino derivat glicina, zato se v tleh obnaša podobno organskim fosfatom in v njih ostaja dalj časa. Je težko razgradljiv in pregost, da bi lahko dalj časa obstal v zraku (PubChem ..., 2024). Deluje kot močan kelator, kar pomeni da v zemlji tvori fizikalno kemijske komplekse, v katere so ujamejo mineralni mikronutrienti, ki v takšni obliki niso dostopni rastlinam (Glass, 1984).

Odstranjevanje glifosata iz okolja je zelo omejeno. Iz tal ga lahko odstranimo z mikrobnno degradacijo v anaerobnih razmerah. Nanjo vplivajo tudi lastnosti tal vključno z njihovo pH vrednostjo (Williams in sod., 2000). Pomemben faktor je tudi prisotnost anorganskih fosfatov, ki inhibirajo delovanje nekaterih bakterijskih sevov (Borggaard in Gimsing, 2008; Yu in sod., 2015). Degradacija herbicida se predstavi in napoveduje s kinetiko prvega reda (Pub Chem ..., 2024). Degradacija molekule poteka po dveh poteh. Prva temelji na razpadu vezi med ogljikom in kisikom, pri čemer nastane aminimetilfosfonična kislina (AMPA), ki je glavni metabolit glifosata. Pri drugi poti razpade vez med ogljikom in fosforjem, da nastaneta dva produkta – sarkozin in glicin (Battaglin in sod., 2014).

V splošnem se glifosat v tleh nahaja še 4 – 180 dni po uporabi, zaradi česar predstavlja morebitno nevarni kontaminant tal, pa tudi vod. V vodi njegova razpolovna doba znaša od 2 do 91 dni (Vereecken, 2005; Borggaard in Gimsing, 2008). Ob stiku z vodo se glifosat pretvori v AMPA, ki še vedno vsebuje vse toksične lastnosti svojega prekursorja, le da se v njej obdrži 76 – 240 dni (Vereecken, 2005).

Iz herbicidu pripadajočih stavkov o nevarnosti in previdnosti je jasno razvidno, da se ga ne sme širiti v okolje in da na vodno življenje deluje s trajnim učinkom toksičnega delovanja izpostavljeni njegovemu delovanju (Samsel in Seneff, 2014; Bailey in sod., 2018; Williams in sod., 2000). Kontaminacija okolja s strani herbicida se najpogosteje dogaja zaradi izgub in napak med transportom, med ravnanjem s herbicidom in njegovim shranjevanjem, pa tudi zaradi vetra. Kadar zaznamo glifosat v pitni vodi, je najpogosteje zaradi kontaminacije površinske vode. V tleh ima glifosat nizko mobilnost, v njih pa se tudi hitro absorbira (Larsen in sod. 2012). Ugotovili so, da rastline po škropljenju absorbirajo več kot 45% glifosata (Samsel in Seneff, 2013).

### 4 VPLIV NA ORGANIZME

Zaradi masovne uporabe glifosata, je substanca prešla ne le v tla, podzemne vode in ozračje, temveč so jo odkrili tudi v hrani in predmetih za vsakdanjo rabo, kot so pšenice, gaze in higienski vložki (Rosane, 2021). Najburnejša novica na tem področju je prišla v javnost leta

2015, ko je Mednarodna agencija za raziskave raka (ang. International Agency for Research on Cancer – IARC), ki sodi pod Svetovno zdravstveno organizacijo (ang. World Health Organisation – WHO), glifosat klasificirala kot potencialno kancerogeno substanco za ljudi (IARC, 2015). Na to je reagiral proizvajalec glifosata Monsanto. Njegova takojšnja reakcija je bilo močno nestrinjanje z oceno. Izpostavil je, da je nemogoče sprejeti zaključek tako oddaljen od zaključkov vseh drugih regulatornih agencij po svetu. Sklical je tudi neodvisne skupine znanstvenikov, katerim je naročil, naj ponovno preverijo varnost glifosata in odločitev IARC. Zaključili so, da se z zaključki IARC ne strinjajo in da ta pri pregledu v obzir ni vzela vseh podatkov iz živalskih raziskav in genotoksičnih študij (Williams in sod., 2016).

Mnenja o učinkih herbicida glifosat na zdravje so še vedno deljena. Študije so pokazale, da imajo delavci v kmetijskem sektorju krajšo življenjsko dobo v primerjavi z delavci v drugih sektorjih. Vzroki za to izvirajo iz sprememb, ki so nastale v zadnjih desetletjih – povišana uporaba sintetičnih kemikalij vključno z glifosatom. Težave, ki jih te snovi povzročajo, pa se v okolju širijo tudi izven kmetijskega sektorja in vplivajo na vse nas (Benassi in sod., 2017).

Več laboratorijskih študij je potrdilo možno absorpcijo glifosata v gastrointestinalnem traktu človeka in drugih sesalcev, pa tudi absorpcijo preko inhalacije, zaužitja in stika s kožo. Razultati kažejo, da herbicid povzroča zavrto rast, poškodbe ledvic, povečanje in vnetje jeter in prebavne bolezni (Williams in sod., 2000; Samsel in Seneff, 2013; Bailey in sod., 2017). Pri vodnih rastlinskih organizmih pod vplivom glifosata pride do spremembe osnovnih življenjskih funkcij, tj. fotosinteze, dihanja, sinteze aromatskih aminokislin in s tem povezanih procesov. Toksičen je tudi za insekte in ptice (Herbert in sod., 2014). Dokazan je negativen vpliv na določene vrste bakterij in njihove procese fiksacije dušika (Haney in sod., 2000).

Primeri konkretnih študij:

- Leta 2014 je raziskava Univerze v Bostonu in Abraxis LLC zasledila prisotnost glifosata v 45% vzorcev organskega medu in 62 vzorcev konvencionalnega medu kupljenih na urbanem območju Filadelfije (Rubio in sod., 2014).
- Ista študija je odkrila tudi prisotnost glifosata v 36 % vzorcev sojine omake, prav tako v prodaji na urbanem območju Filadelfije (Rubio in sod., 2014).
- V letu 2022 je študija zaznala glifosat v vseh analiziranih vzorcih materinega mleka iz urbanega in podeželskega območja v okolici mesta Francisco Beltrão v zvezni državi Paraná v Braziliji. Povprečna koncentracija glifosata v materinem mleku je znašala 1,45 µg/l. Glede vsebnosti glifosata v materinem mleku še ni zakonodaje (Camiccia in sod., 2022).
- Ista študija je analizirala tudi količino glifosata v vodi in ugotovila, da je povprečna vrednost 0,802 µg/l v pitni vodi, to je v dopustnih mejah po brazilski zakonodaji (do 500 µg/l), po EU zakonodaji pa je vsebnost glifosata previsoka (0,1 µg/l na posamezen pesticid) (Camiccia in sod., 2022).

#### 4.1 KLASIFIKACIJA KANCEROGENOSTI

Na področju kancerogenosti glifosata prihaja do nejasnosti in konfliktov, ki do danes ostajajo nerazrešeni.

Leta 1985 je EPA (agencija za varstvo okolja v ZDA, ang. Environmental Protection Agency) razglasila sum na kancerogenost glifosata in ga uvrstila v kategorijo C – med substance z omejenimi dokazi kancerogenosti (Rubio in sod., 2014). Tako je bil klasificiran zaradi študij, ki so pokazale, da povzroča ledvične tumorje pri mišjih samcih. V letu 1986 je EPA zato zaprosila FIFRA SAP (svetovalni odbor za Zvezni zakon o insekticidih, fungicidih in rodenticidih), ki je ocenil, da rezultati študij na miših niso statistično značilni, glifosat pa razvrstil v kategorijo D – med substance, katerim ni mogoče pripisati kancerogenosti za človeka (Report..., 1986).

V letu 1991 je EPA na podlagi temeljitega pregleda številnih študij, glifosat uvrstila v skupino E – med substance, za katere v vsaj dveh študijah na različnih vrstah ni bilo dokazane morebitne toksičnosti. Odločili so se, da je bilo število obolenih živali premajhno, da bi lahko glifosat označili za potencialno kancerogeno snov (Benbrook, 2019).

Marca 2015 je Mednarodna agencija za raziskave raka (IARC), razvrstila glifosat v kategorijo 2A – med substance, ki imajo omejene dokaze kancerogenosti za ljudi, vendar zadostne dokaze kancerogenosti za živali, v tem primeru za glodavce – miši in podgane. Odločitev je bila sprejeta na podlagi obširne mednarodne študije, ki je analizirala 5 snovi, pogosto uporabljenih v kmetijstvu (IARC ..., 2015). V letih pred omenjeno študijo je bila odkrita povezava med uporabo glifosata in pojavom ne-Hodgkinovega limfoma. Agencija je poudarila tudi potrebo po neodvisnih eksperimentalnih in epidemioloških raziskavah (Guyton in sod., 2015).

Monsanto je v odziv na razvrstitev IARC oznanil, da WHO ni upoštevala vseh podatkov in da je nemogoče priti do zaključka, ki je tako drugačen od ugotovitev vseh drugih regulatornih agencij po svetu. To je podkrepil z lobiranjem, oglaševalskimi kampanijami in poskusi, da spodkoplje odločitev IARC. Podjetje je bilo vključeno v številne sodne spore, v katerih je moralo poravnati veliko stroškov (Vainio, 2020).

Novembra 2015 je Evropska agencija za varnost hrane (ang. European Food Safety Authority - EFSA), inštitucija, ki spada pod WHO, objavila nov članek na temo glifosata. Zaključila je, da je nemogoče sklepati o kancerogenosti glifosata za ljudi. Na njeno določitev je vplivala odločitev Nemškega federalnega inštituta za ocenjevanje tveganja (BfR, ang. The German Federal Institute for Risk Assessment). Ta je po šestih različnih izvedenih študijah prišel do zaključka, da glifosat ni kancerogen (Conclusion ..., 2015).

V istem časovnem obdobju je EFSA predlagala nove toksikološke standarde za ostanke glifosata v hrani – med drugim je dvignila ADI (ang. Acceptable daily intake) oz. sprejemljivi dnevni vnos glifosata.

## 4.2 ZNANSTVENA RAZPRAVA

Spekter mnenj o glifosatu je širok, o opisani situaciji pa je izrazilo mnenje več avtorjev iz različnih institucij, katerih ugotovitve so rezultat večih študij, objavljenih v uglednih znanstvenih revijah.

Že za časa odločitve EFSA so bile izdane študije, kot je študija avtorjev Samsel in Seneff iz leta 2013, ki je proučevala odnos med glifosatom in razvojem kroničnih bolezni. Monsanto zagotavlja varnost glifosata tudi na podlagi tega, da herbicid vpliva na EPSPS encim, ki v ljudeh ni prisoten. To ni čisto točen argument, saj se encim nahaja v nekaterih bakterijah, predvsem v črevesni mikrofiori. To pomeni, da je glifosat sposoben škodovati organizmom v našem črevesju, kar vpliva na našo sposobnost absorpcije vitaminov, mineralov in nekaterih proteinov. Količina glifosata, ki smo ji izpostavljeni narašča tudi zaradi vse pogostejše prakse v kmetijstvu, da se pred žetvijo rastline poškropi z glifosatom in se s tem sproži sprostitve semen in lažje kombajniranje. Tehnika se pogosto uporablja pri žitih. Študija trdi, da zaradi tega prihaja do več primerov bolezni povezanih z njim, kot je celiakija (Samsel in Seneff, 2013).

Vsaj dve kasnejši študiji sta potrdili korelacijo med glifosatom in boleznimi prebavnega trakta pri živini (Søndergaard 2017; Bailey in sod., 2017).

Prav tako sta vsaj še dve kasnejši študiji potrdili škodljivost glifosata človeškemu črevesju. Okrog 2% glifosata se v našem telesu pretvori v AMPA, preostanek pa se izloči z urinom. AMPA na človeka sicer ne vpliva direktno, saj ljudje nimamo šikimatne poti, je pa ta prisotna pri bakterijah v našem črevesju. Funkcija teh bakterij je sodelovanje v imunski obrambi telesa, prebava hrane, izboljšanje prepustnosti črevesja za nutrienete, sinteza vitaminov in detoksifikacija nevarnih kemikalij (Krüger in sod., 2014; Bailey in sod., 2017).

Ena od aktivnih snovi v Roundupu naj bi povzročala tudi inhibicijo encimov citokroma P450 oz. encimov CYP. Tudi ti naj bi bili odgovorni za detoksifikacijo telesa. Brez njihovega delovanja toksične substance v telesu obstanejo za vedno. Roundup je zato povezan tudi z zgodnjim pojavom Crohnove bolezni in drugih vnetnih bolezni črevesja (Samsel in Seneff, 2013).

Mnenje o glifosatu so izrazile tudi neodvisne organizacije in znanstvene revije, katerih ugled je v javnosti variira. Neodvisna znanstvena revija Test-Salvagente je izrazila pomisleke, ali je bila EFSA pri sprejetju svoje odločitve neodvisna. Ocenjuje, da je prišlo do konflikta interesov. Greepeace je razkril tesno sodelovanje med WHO in ILSI (Mednarodni znanstveni inštitut o življenju s sedežem v Washingtonu, ang. International Life Sciences Institute). ILSI je eden od največjih agropodjetniških lobijev na svetu. Financirajo ga predvsem privatna podjetja, med katerimi je tudi Monsanto. V preteklosti se je že zgodilo, da so člani EFSE, ki so bili tudi člani ILSI, morali odstopiti, saj so priznali, da so pri presojanju kemikalij upoštevali tudi lastne finančne interese. V EU je pogosto, da osebe prehaja med funkcijami v podjetjih in kontroli varnosti, kar vzbuja dvome v kakovost ocen (Corvino, 2015; Toretta in. sod., 2018).

Inštitut Ramazzini (RI), neodvisni italijanski inštitut, dvomi v odločitev EFSA, saj je bila le-ta sprejeta nekaj mesecev po odločitvi IARC. Mnenja so, da je vmes enostavno minilo premalo časa in trditvam EFSA manjka poglobljena raziskava in proučitev obstoječe literature na tem področju. Sumijo, da EFSA v svoj ozir ni vzela študij na ljudeh, ki so bile tedaj že izvedene in jih je pri svoji odločitvi upoštevala ILSI. Pri oceni EFSA naj bi sodelovali tudi znanstveniki, ki so hkrati zaposleni kot svetovalci podjetij iz industrije herbicidov (Toretta in sod., 2018).

## **5 GLIFOSAT V EVROPSKI UNIJI**

Trenutno je glifosat v EU odobren za uporabo do leta 2033, saj je bilo leta 2023 za 10 let podaljšano dovoljenje za uporabo glifosata kot aktivne snovi v fitofarmacevtskih sredstvih (FFS). To je določeno v Izvedbeni uredbi Komisije (EU) 2023/2660 z dne 28. novembra 2023 o obnovitvi odobritve aktivne snovi glifosat kot je določeno v Uredbi (ES) št. 1107/2009 Evropskega parlamenta in Sveta ter o spremembi Izvedbene uredbe Komisije (EU) št. 540/2011 (Izvedbena ..., 2023).

Glifosat je bil v EU pred tem ponovno odobren leta 2017, pri čemer je Evropska komisija zahtevala oceno njegove rakotvornosti s strani Evropske agencije za kemikalije (ECHA). Zaradi tega je bila odobritev podaljšana za obdobje krajše od 10 let in to le za 5 let. Postopek ponovnega ocenjevanja se je začel aprila 2019, vanj pa so bile vključene štiri države članice.

Ocenjevalna skupina je pripravila poročilo in ga junija 2021 poslala Evropski agenciji za varnost hrane (EFSA) in ECHA. Med postopkom so nevladne organizacije izrazile dvome glede verodostojnosti študij, kar je privedlo do dodatnih zahtev za nove informacije. Zaradi tega je bila odobritev glifosata začasno podaljšana za eno leto.

Leta 2022 je ECHA sporočila, da glifosat ne spada med rakotvorne snovi, EFSA pa je julija 2023 predstavila svoje ugotovitve, ki so bile podlaga za podaljšanje odobritve.

Posamezne države članice EU morajo na ravni države zagotoviti, da se fitofarmacevtska sredstva z glifosatom na njihovem območju avtorizira na podlagi ocene varnosti njihove uporabe (Glifosat, 2024).

Gensko spremenjene sorte (GSS) odporne na glifosat so v EU prepovedane, tako da se ne uporablja v kombinaciji z GS sortami (Glyphosate ..., 2023).

## **6 GLIFOSAT V REPUBLIKI SLOVENIJI**

Z aktivno snovjo glifosat, je v Sloveniji trenutno registriranih 13 fitofarmacevtskih sredstev (Glifosat, 2024). Proizvajajo ga v eni tovarni in sicer v Albaugh (bivši Pinus) v Račah (Kaj ..., 2023).

Uporaba glifosata je omejena na kmetijske površine in poklicne uporabnike, ker za zdaj ni na voljo primerljivih alternativ ali nekemičnih metod z enakim učinkom. Od 1. 10. 2019 je v veljavi pravilnik, ki prepoveduje uporabo fitofarmacevtskih sredstev, tudi sredstev, ki temeljijo

na glifosatu, na vseh javnih površinah, tudi golf in športnih igriščih. Od 8. 12. 2022 za izjemo veljajo cestne bankine avtocest in hitrih cest, vendar je nabor dovoljenih herbicidov omejen, glifosata pa ni med njimi (Glifosat, 2024).

Vlada Republike Slovenije si prizadeva za prepoved glifosata in hkrati zagotoviti primerno prehodno obdobje za prilagoditev kmetijstva. Evropska komisija je novembra 2023 podaljšala odobritev aktivne snovi glifosat za obdobje 10 let, kot je določeno v Izvedbeni uredbi Komisije (EU) (Izvedbena ..., 2023), čemur vlada RS sicer ne nasprotuje, vendar meni, da je v obzir potrebno vzeti tudi mnenja potrošnikov, ki uporabi nasprotujejo (Odločitve ..., 2023) in da je v zadnjih desetletjih prišlo do prekomerne uporabe kemikalij v kmetijstvu. Zaveda se tudi, da je kratkoročno pridelava brez fitofarmacevtskih sredstev še vedno nemogoča (Glifosat, 2024).

## **7 GSO = GLIFOSAT = MONSANTO?**

Glifosat se v javnosti pogosto povezuje skupaj z besedno zvezo gensko spremenjeni organizem (GSO). Pogosto se z njim poveže tudi podjetje Monsanto, ki je glavni proizvajalec herbicida Roundup, pa tudi glavni proizvajalec semen odpornih nanj. Ta semena nosijo komercialno ime Roundup ready. Glifosat se uporablja tudi na sortah, ki niso Roundup Ready npr. v že prej opisanem primeru pred žetvijo žit. Uporablja se tudi kot klasičen totalni herbicid za razpleveljenje njivskih površin, odstranjevanje plevela na železniških tirih in urejanju zelenic, parkov ter vrtov. Na slovenskem trgu se glifosfat nahaja tudi v FFS s trgovskim imenom Boom efekt.

Monsanto ima med ljudmi slab sloves, ki se je poslabšal, ko so v javnost prišle novice o njihovem lobiranju (Rebière in Mavoori, 2020). Tudi GSO med Evropejci niso priljubljeni, mnenje splošnega prebivalstva o njih, pa se razlikuje med posameznimi državami (Legge in Durant, 2010; Herring in Paarlberg, 2016; Mühlböck in Tosun, 2018; Tosun in Hartung, 2018; Wesseler in Kalaitzandonakes, 2019). Povezava med GSO, glifosatom in Monsanto se pogosto pojavlja v javnosti. Primer tega so avstrijske parlamentarne razprave o glifosatu, kjer je bila očitno oblikovana povezava med temi tremi pojmi (Sitzung ..., 2019). Povezave so pogoste, saj javnost rada posluša zgodbe o »žrtvah« (v tem primeru potrošnikih) in »zlobnežih« (industrijo). Zlobneži so odgovorni za problem v celoti in proti njim je potrebno uvesti neko spremembo, regulirano z zakonom (Tosun in Varone, 2020). Na tak način se torej meče slabo luč na GSO v celoti zaradi odmevnega primera.

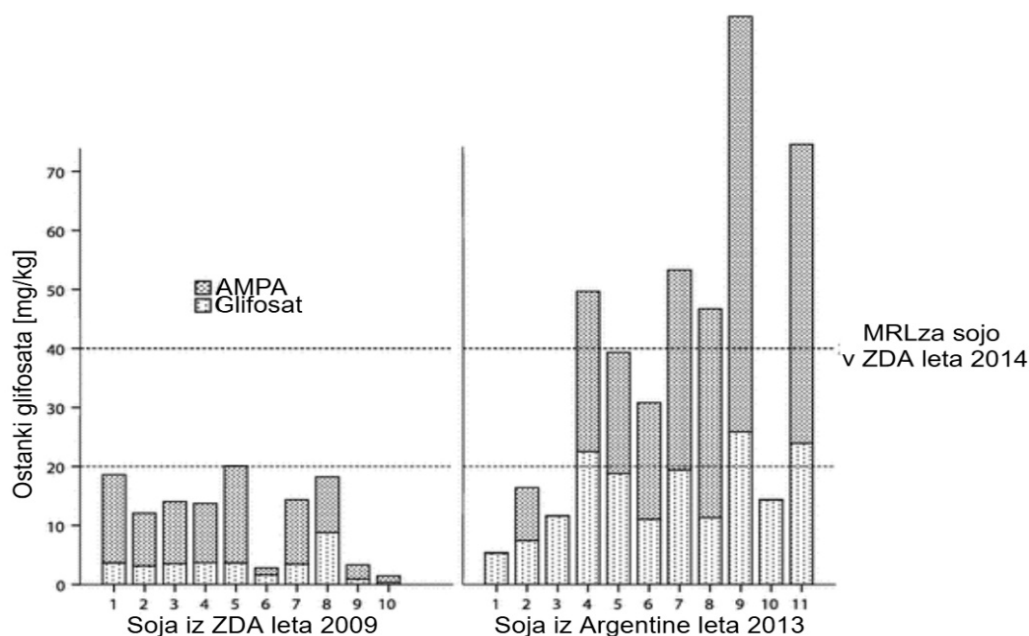
## **8 GENSKO SPREMENJENI ORGANIZMI**

Kar 81% vseh gojenih GS rastlin je odpornih na herbicide (Bonny, 2011). Roundup Ready rastline predstavljajo njihovo večino. Prve take sorte so se pojavile leta 1996, njihovo število v uporabi pa samo še narašča. Njihovo gojenje v primerjavi s klasičnimi rastlinami prinaša prednosti pri pripravi površine za sajenje in pletju, ki ni potrebno. Posledično se zmanjšajo stroški pridelave ter erozija zemlje (Duke in Powles, 2008; James, 2010; Bonny, 2011). V zadnjem obdobju se pojavlja problem plevelov odpornih na glifosat, vendar tudi ta ne vpliva

veliko na uporabo Roundup Ready rastlin. Količina gojenih na herbicide odpornih rastlin namreč, vsaj v ZDA, še vedno narašča (Recent ..., 2024).

Varnost uporabe rastlin odpornih proti glifosatu se preverja v znanstvenih študijah. Veliko študij izvedejo kar podjetja sama oz. raziskovalci, ki s podjetji sodelujejo. Glavni negativni učinek, povezan z gojenjem rastlin, odpornih proti glifosatu, so toksični ostanki herbicida, ki ostanejo v rastlinah. Tudi to je del razloga, zakaj se ta nahaja v toliko snoveh v naravnem okolju in tudi v nas samih (Cuhra, 2015).

Argentinska študija iz leta 2013 je testirala ostanke glifosata v Roundup Ready soji iz province Salta v Argentini (Then, 2013). Rezultati prikazujejo visoke vrednosti ostankov. Glifosatne ostanke je analizirala tudi študija iz ZDA v letu 2009 (objavljena leta 2014), kjer so bile vrednosti nekoliko nižje (Bøhn, 2014). Na problematiko herbicidnih ostankov nakazujejo tudi druge neodvisne študije, medtem ko ostale o njih ne govorijo (Cuhra, 2015).



Slika 14: Količina glifosata in AMPA v Roundup Ready soji v ZDA in Argentini. Označena je tudi najvišja dovoljena vrednost ostankov v ZDA leta 2014, spodnja črta prikazuje MRL vrednost po Codexu Alimentariusu leta 2014 (Cuhra, 2015)

## 9 ZAKLJUČEK

Več študij je dokazalo, da glifosat škodljivo vpliva tudi na človeško zdravje, a to ne vpliva na njegovo uporabo, ki v svetu še vedno narašča. Znanstvena dognanja so še vedno mnenja, da je herbicid za uporabo primeren. Še vedno je dovoljen za uporabo tudi v Republiki Sloveniji. V EU smo pred enormno rabo glifosata vsaj delno zavarovani s prepovedjo Roundup Ready rastlin. Na nas je, da si ustvarimo lastno mnenje oz. se odločimo, ali bomo poslušali in verjeli uradnim informacijam ali druge raziskovalce in znanstvenike, ki jim nasprotujejo. Odločitev o tem pa ni enostavna, ker proizvajalci glifosata skušajo vplivati na javnost in si je težko ustvariti

jasno sliko. Ne glede na to, kaj si mislimo, je glifosat v našem okolju prisoten, zato je smiselno njegovo uporabo preudarno uporabljati in omejevati.

## 10 VIRI

- Bailey, D. C., Todt, C. E., Burchfield, S. L., Pressley, A. S., Denney, R. D., Snapp, I. B., Negga, R., Traynor, W. L., Fitsanakis, V. A. 2018. Chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57: 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.11.005>
- Battaglin, W. A., Meyer, M. T., Kuivila, K. M., Dietze, J. E. 2014. Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *Journal of the American Water Resources Association*, 50, 2: 275–290, <https://doi.org/10.1111/jawr.12159>
- Benassi, A., Luchetta A., Saccardo, I., Ragusa, F. 2017. Monitoraggio d'indagine Glifosate, AMPA e Glufosinate di Ammonio nelle acque superficiali del Veneto. Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto, [https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/acque-interne/acque-interne/acque-superficiali/monitoraggio\\_indagine\\_glifosate\\_ampa\\_glufosinateammonio\\_acque-superficiali\\_2015\\_2016-.pdf/@@display-file/file](https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/acque-interne/acque-interne/acque-superficiali/monitoraggio_indagine_glifosate_ampa_glufosinateammonio_acque-superficiali_2015_2016-.pdf/@@display-file/file) (21. avg. 2024)
- Benbrook, C. M. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28, 3: 1–15, <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Bøhn T., Cuhra M., Traavik T., Sanden M., Fagan J., Primicerio R., 2014. Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food Chemistry*, 153: 207–215, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.054>
- Bonny, S. 2011. Herbicide-tolerant Transgenic Soybean over 15 Years of Cultivation: Pesticide Use, Weed Resistance, and Some Economic Issues. The Case of the USA. *Sustainability*, 3, 9: 1302–1322, <https://doi.org/10.3390/su3091302>
- Borggaard, O. K., Gimsing, A. L. 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64, 4: 441–456, <https://doi.org/10.1002/ps.1512>
- Camiccia, M., Candiotto, L. Z. P., Gaboardi, S. C., Panis, C., Kottwitz, L. B. M. 2022. Determination of glyphosate in breast milk of lactating women in a rural area from Paraná state, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 55, e12194, <https://doi.org/10.1590/1414-431X2022e12194>
- Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. 2015. *EFSA Journal*, 13, 11: 4302, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>
- Corvino, V. 2015. StopGlifosato, le 10 misure alternative all'erbicida. *Il Salvagente*. <https://ilsalvagente.it/2015/08/07/stopglifosato-le-10-misure-alternative-allerbicida/> (25. avg. 2024)
- Cuhra, M. 2015. Review of GMO safety assessment studies: glyphosate residues in Roundup Ready crops is an ignored issue. *Environmental Sciences Europe*, 27: 1–14, <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0052-7>
- Duke, S. O., Powles, S.B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64, 4: 319–325, <https://doi.org/10.1002/ps.1518>
- EPA Releases Draft Risk Assessments for Glyphosate. 2017. <https://www.epa.gov/pesticides/epa-releases-draft-risk-assessments-glyphosate>

- Haney, R. L., Senseman, S. A., Hons, F. M., Zuberer, D. A. 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*, 48, 1: 89–93, [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2000\)048\[0089:EOGOSM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2000)048[0089:EOGOSM]2.0.CO;2)
- Herbert L. T., Vázquez D. E., Arenas A., Farina W. M. 2014. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of Experimental Biology*, 217, 19: 3457–3464, <https://doi.org/10.1242/jeb.109520>
- Herring, R., Paarlberg, R. 2016. The Political Economy of Biotechnology. *Annual Review of Resource Economics*, 8, 397–416 <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100815-095506>
- Glass, R. L. 1984. Metal complex formation by glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 6: 1249–1253, <https://doi.org/10.1021/jf00126a010>
- Glifosat. 2024. Republika Slovenija GOV.SI, <https://www.gov.si teme/glifosat/> (6. okt. 24)
- Glyphosate – Hot Topics. 2024. Helsinki, European Chemicals Agency, <https://echa.europa.eu/sl/hot-topics/glyphosate> (7. okt. 2024)
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., Straif, K. 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16, 5: 490–491, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)
- IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. 2015. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon: 1–2, <https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/MonographVolume112-1.pdf>
- Izvedbena uredba Komisije (EU) 2023/2660 z dne 28. novembra 2023 o obnovitvi odobritve aktivne snovi glifosat v skladu z Uredbo (ES) št. 1107/2009 Evropskega parlamenta in Sveta ter o spremembi Izvedbene uredbe Komisije (EU) št. 540/2011. 2023. Uradni list Evropske unije, 2660/2023, [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=OJ:L\\_202302660](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=OJ:L_202302660) (14. okt. 2024)
- James, C. 2010. A global overview of biotech (GM) crops: Adoption, impact and future prospects. *GM Crops*, 1, 1: 8–12, <https://doi.org/10.4161/gmcr.1.1.9756>
- Kaj je glifosat in kakšni so njegovi vplivi na zdravje. 2023. Nacionalni inštitut za javno zdravje, <https://nijz.si/moje-okolje/kemijska-varnost/kaj-je-glifosat-in-kaksni-so-njegovi-vplivi-na-zdravje> (5. okt. 2024)
- Krüger, M. P., Schledorn, W., Schrod, A., Hoppe, H. W., Lutz, W., Shehata, A. A. 2014. Detection of Glyphosate Residues in Animals and Humans. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, 4, 2: 1–5, <http://doi.org/10.4172/2161-0525.1000210>
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., Virkel, G. 2012. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 3: 811–818, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.005>
- Legge, J.S., Durant, R.F. 2010. Public Opinion, Risk Assessment, and Biotechnology: Lessons from Attitudes toward Genetically Modified Foods in the European Union. *Review of Policy Research*, 27, 1: 59–76, <https://doi.org/10.1111/j.1541-1338.2009.00427.x>
- Mühlböck, M., Tosun, J. 2018. Responsiveness to Different National Interests: Voting Behaviour on Genetically Modified Organisms in the Council of the European Union. *Journal of Common Market Studies*, 56, 2: 385–402, <https://doi.org/10.1111/jcms.12609>

- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., Hansen, M., Landrigan, P. J., Lanphear, B. P., Mesnage, R., Vandenberg, L. N., Saal, F. S. vom, Welshons, W. V., Benbrook, C. M. 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health*, 15, 19: 1–13, <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>
- Odločitve s 74. seje vlade s področja kmetijstva, gozdarstva in prehrane. 2023. Vlada RS, <https://www.gov.si/novice/2023-10-05-odlocitve-s-74-seje-vlade-s-podrocja-kmetijstva-gozdarstva-in-prehrane/> (5. okt. 2023)
- PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. 2024. National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate> (24. avg. 2024)
- Rebière, P., Mavoori, H. 2019. The Bayer–Monsanto fusion: countering brand tarnishing and rebuilding reputation. *Journal of Business Strategy*, 41, 1: 27–37, <https://doi.org/10.1108/JBS-10-2018-0185>
- Recent Trends in GE Adoption. 2024. USDA Economic Research Service, <https://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-u-s/recent-trends-in-ge-adoption/> (27. avg. 2024)
- Report of SAP Recommendations. 1986. FIFRA SAP, <https://archive.epa.gov/pesticides/chemicalsearch/chemical/foia/web/pdf/103601/103601-209.pdf> (15. okt. 2024)
- Rodrigues B.N., Almeida F.S. 2005. Guide of Herbicides. 5th ed. IAPAR, Londrina, Brazil; 592 s.
- Rosane, O. 2021. Bayer to Pull Glyphosate Products, Including Roundup, From U.S. Home and Garden Market. *EcoWatch*, <https://www.ecowatch.com/bayer-ending-glyphosate-sales-us-market-2654298339.html> (24. avg 2024)
- Rubio F., Guo E., Kamp L. 2014. Survey of Glyphosate Residues in Honey, Corn and Soy Products. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 5, 1: 1–8, <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000249>
- Samsel, A., Seneff, S. 2013. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. *Interdisciplinary Toxicology*, 6, 4: 159–184, <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0026>
- Sitzung des Nationalrates am 2. Juli 2019 (84/NRSITZ). Dunaj, Parlament Österreich. <https://www.parlament.gv.at/gegenstand/XXVI/NRSITZ/84> (26. avg. 2024)
- Søndergaard L. S. 2017. Can glyphosate residues in the feed affect the health of farm animals? DCA - Danish Centre for Food and Agriculture, <https://dca.au.dk/en/current-news/news/show/artikel/kan-rester-af-glyphosat-i-foderet-paavirke-husdyrs-sundhed/> (26. avg. 2024)
- Steinrücken H. C., Amrhein N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 94, 4: 1207–12. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(80\)90547-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(80)90547-1)
- Swanson, N. L., Leu, A., Abrahamson, J., Wallet, B. 2014. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. *Journal of Organic Systems*, 9, 2: 6–37, <https://www.researchgate.net/publication/283462716>
- Then, C., 2013. High levels of residues from spraying with glyphosate found in soybeans in Argentina. TestBiotech background report 2013, [https://www.testbiotech.org/wp-content/uploads/2016/10/TBT\\_Background\\_Glyphosate\\_Argentina\\_0.pdf](https://www.testbiotech.org/wp-content/uploads/2016/10/TBT_Background_Glyphosate_Argentina_0.pdf) (23. avg. 2024)

- Torretta V, Katsoyiannis IA, Viotti P, Rada EC. 2018. Critical Review of the Effects of Glyphosate Exposure to the Environment and Humans through the Food Supply Chain. *Sustainability*, 10, 4: 2–20, <https://doi.org/10.3390/su10040950>
- Tosun, J., Hartung, U. 2018. Decentralising competences in multi-level systems: insights from the regulation of genetically modified organisms. *West European Politics*, 41, 3: 803–823, <https://doi.org/10.1080/01402382.2017.1395253>
- Tosun, J., Varone, F. 2020. Politicizing the Use of Glyphosate in Europe: Comparing Policy Issue Linkage across Advocacy Organizations and Countries. *Journal of Comparative Policy Analysis: Research and Practice*, 23, 5–6: 607–624, <https://doi.org/10.1080/13876988.2020.1762076>
- Vainio H. 2020. Public health and evidence-informed policy-making: The case of a commonly used herbicide. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 46, 1: 105–109. <https://doi.org/10.5271/SJWEH.3851>
- Vereecken, H., 2005. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science*, 61, 12: 1139–1151, <https://doi.org/10.1002/ps.1122>
- Viirlaid, E., Ilisson, M., Kopanchuk, S., Mäeorg, U., Rinken, A., Rinken, T. 2019. Immunoassay for rapid on-site detection of glyphosate herbicide. *Environ Monit Assess*, 191: 507, <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7657-z>
- Wesseler, J., Kalaitzandonakes, N. 2019. Present and Future EU GMO Policy. V: Dries, L., Heijman, W., Jongeneel, R., Purnhagen, K., Wesseler, J. (Ur.), *EU Bioeconomy Economics and Policies: Volume II*. Springer International Publishing, 245–256, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-28642-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28642-2_13)
- Williams, G. M., Aardema, M., Acquavella, J., Berry, S. C., Brusick, D., Burns, M. M., Weed, D. L. 2016. A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 46, sup1: 3–20, <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1214677>
- Williams, G. M., Kroes, R., Munro, I. C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31, 2: 117–165, <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1371>
- Yu, X. M., Yu, T., Yin, G. H., Dong, Q. L., An, M., Wang, H. R., Ai, C. X. 2015. Glyphosate biodegradation and potential soil bioremediation by *Bacillus subtilis* strain Bs-15. *Genetics and Molecular Research*, 14, 4: 14717–14730, <https://doi.org/10.4238/2015.November.18.37>

## GENSKE BANKE KOT NAČIN OHRANJANJA OGROŽENIH RASTLINSKIH GENSKIH VIROV

Ema Parkelj

### IZVLEČEK

Genske banke so eden od načinov za ohranjanje ogroženih genskih virov in s tem biotske raznovrstnosti. Zaradi nenehnih okoljskih sprememb je ključno ohranjanje genske raznolikosti rastlinskih vrst, saj jim to omogoča prilagajanje in preživetje ob različnih biotskih in abiotskih stresorjih. V ta namen so razviti različni postopki za ohranjanje, vodenje in upravljanje, ki so opredeljeni v konvencijah in strategijah. Ti krovni dokumenti na nacionalni in mednarodni ravni omogočajo ohranjanje genske pestrosti tako v naravnih okoljih kot izven njih. Rastlinske genske vire lahko ohranjamo *in situ* ali *ex situ*, odvisno od vrste rastline. Genske banke so ustanove, kjer se shranjuje genski material v obliki semen, tkivnih kultur, kolekcijskih nasadov, krioprezerviranih delov in genskih informacij iz nukleotidnih zapisov DNA. Te banke lahko delujejo na nacionalni ali mednarodni ravni kot samostojne ustanove ali kot združenja več bank. Tudi v Sloveniji imamo genske banke, ki ohranjajo ogrožene lokalne rastlinske genske vire v okviru različnih inštitucij, ki so medsebojno povezane in od leta 2018 delujejo kot del Javne službe nalog rastlinske genske banke.

**Ključne besede:** biotska raznovrstnost, rastlinski genski viri, ogroženost, genske banke, ohranjanje

### Gene banks as a way to conserve endangered plant genetic resources

#### Abstract

Gene banks are one of the methods used to preserve threatened genetic resources and, in turn, biodiversity. With constant environmental changes, preserving the genetic diversity of plant species is essential, as it allows them to adapt and survive in response to various biotic and abiotic stressors. To achieve this, various conservation and management procedures have been established and are outlined in conventions and strategies. These guiding documents, at both national and international levels, support the preservation of genetic diversity in natural environments as well as in controlled settings. Plant genetic resources can be conserved either *in situ* or *ex situ*, depending on the species. Gene banks are institutions where genetic material is stored in the form of seeds, tissue cultures, collection plantations, cryopreserved parts, and genetic information from DNA nucleotide sequences. These banks can function at the national or international level, either as independent entities or as networks of multiple banks. In Slovenia, gene banks also exist to preserve endangered local plant genetic resources. These institutions are interconnected and have been part of the Public Service for Plant Gene Banks since 2018.

**Key words:** biodiversity, plant genetic resources, endangered, gene banks, conservation

## 1 UVOD

V dobi hitrih okoljskih sprememb se soočamo z izzivi, ki pod vprašaj postavljajo širšo biotsko raznolikost, vključno z vrstno raznolikostjo in trajnostjo naravnih ekosistemov. Ohranitev rastlinske biotske raznovrstnosti je ključnega in strateškega pomena za zagotavljanje ekosistemske stabilnosti, zdravja in prehranske varnosti. Različne genske vire, predvsem tiste, ki so posredno ali neposredno uporabni za prehrano in jim grozi genska erozija se pred izgubo ohranja na različne načine, običajno v sklopu organiziranih inštitucij imenovanih genske banke. Te ohranjajo genske vire in jih tako obvarujejo pred izginotjem v naravnih ekosistemi ali jim, zaradi opuščanja in sprememb v pridelavi, grozi ožjenje genetske raznolikosti. Genske vire predvsem samoniklih rastlin, se lahko ohranja v naravnih rastiščih *in situ* ali *ex situ* v obliki kolekcijskih nasadov ali kot semena pri nizkih temperaturah. Večina večletnih gojenih sadnih rastlin se prav tako hrani *ex situ* v obliki kolekcijskih nasadov. Semena in nekatere vegetativne dele se hrani prav tako izven naravnih sistemov v *ex situ* razmerah: hladilnicah, zamrzovalnih komorah, rastlinskih tkivnih kulturah in krioprezerviranih rastlinskih delov. V svetu je več različnih ustanov s podobno organizacijo, ki ohranjajo rastlinski material pred trajno izgubo.

## 1 BIOTSKA RAZNOVRSTNOST

Biotska raznovrstnost se zaradi različnih okoljskih dejavnikov in posegov v ekosisteme zmanjšuje, kar je opazno na večih nivojih, tako pri gojenih rastlinah in živalih kot prostoživečih. Z vse večjimi in drastičnimi okoljsko-podnebnimi spremembami in posegi v okolje se zmanjšuje biotska raznovrstnost na različnih nivojih, ki zajemajo ožjenje genetske ter posledično transkriptomke in proteomske raznolikosti (Hoban in sod., 2020).

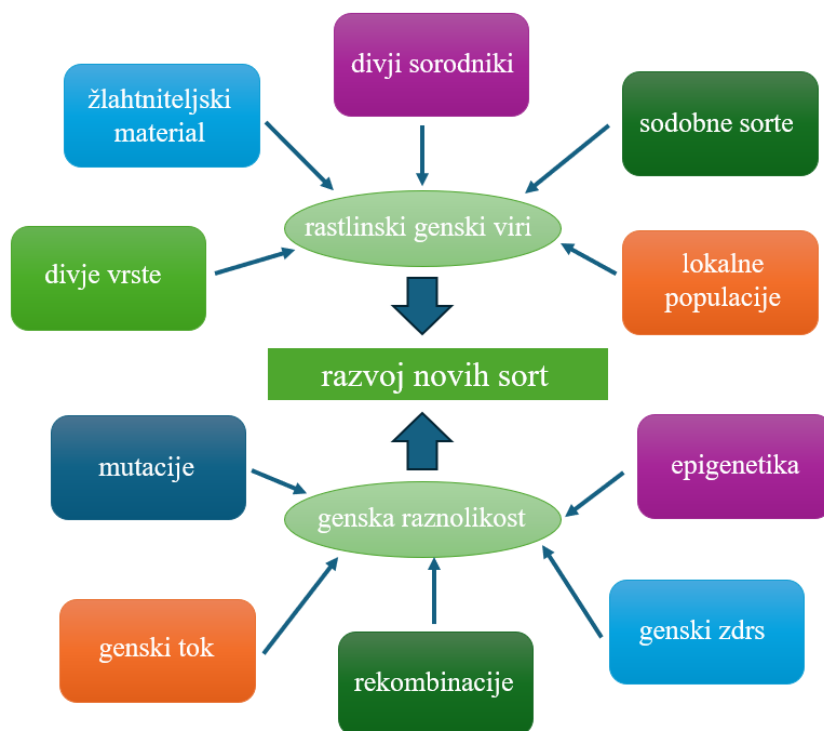
### 2.1 NASTANEK IN POMEN BIOTSKE RAZNOVRSTNOSTI

Genetska pestrost oz. raznolikost je med posameznimi populacijami in sortami nastala zaradi rekombinacije genetskega materiala med procesi medsebojnega križanja, načina dedovanja lastnosti, mutacij, genskega pretoka in zdrsa. Posledica teh procesov je nastanek rastlinskega materiala z različnimi variacijami nukleotidnega zaporedja v DNA molekuli, proteinskih struktur ter različnimi morfološki in fiziološkimi lastnostmi (Brown, 1983). Ta raznolikost je ključna za razvoj okoljsko prilagodljivih populacij, ki vsebujejo različice genov (alele), ki jim omogočajo tolerantnost ali odpornost proti boleznim in škodljivcem. Prav tako posameznikom omogoča prilagajanje na okoljske in klimatske spremembe (Salgotra in Chauhan, 2023). Populacije in tudi sorte z malo ali brez genske raznolikosti imajo omejen nabor alelov, zato lahko postanejo dovzetne na biotske in abiotske stresorje, kar vodi v zmanjšano prilagodljivost in številčno ogroženost (Minter in sod., 2021; Salgotra in Chauhan, 2023).

### 2.2 GLAVNI DEJAVNIKI BIOTSKE RAZNOVRSTNOSTI

Glavni dejavniki biotske pestrosti oz. raznovrstnosti so genetske narave, ki jih povzročajo pritiski iz okolja in sem sodijo mutacije v DNA molekuli, katerih posledica so genske variacije

s spremembo genov posameznika v populaciji, selekcije, migracije, genski tok in genski zdrs (Slika 1) (Salgotra in Chauhan, 2023).



Slika 15: Različni viri genske raznolikosti in njihova uporaba v žlahtnjenju (prirejeno po Salgotra in Chauhan, 2023)

Tekom evolucije je na gensko pestrost in izbiro genotipa vplivala naravna in umetna selekcija. Že po Darwinovi teoriji o evoluciji, so se v naslednje generacije prenašali samo izbrani, prilagojeni genotipi, ki so imeli določene zanimive lastnosti ali pa so se dobro prilagodili na okolje v katerem so živeli (Van Hintum in sod., 2000; Ellstrand in sod., 1999). Z udomačitvijo željenih genotipov, so se v kasnejše generacije prenašali samo željeni genotipi, nezaželeni so bili izločeni, kar je vodilo do zmanjšanja določenih alelov skozi generacije oziroma izgubo genetske in posledično vrstne raznolikosti (Ray in sod., 2015). Željene lastnosti, katere so pridelovalci iskali so visok pridelek, odpornost na biotske in abiotske strese, široka prilagodljivost, velika semena in plodovi, zgodnja zrelost in dobre kakovostne lastnosti (Rauf in sod., 2010; Begna, 2020). Tekom selekcije so rastline doživele različne morfološke, fiziološke in biokemijske spremembe. Vendar je sprememba ene lastnosti pogosto imela posledice na drugi ali večih lastnosti. Mnoge rastlinske vrste so zaradi odbire genetskega materiala, ki je rezultiral v povečani velikosti izgubile generativni način razmnoževanja. To se je zgodilo predvsem zaradi izbire poliploidnih tipov, predvsem triploidov, kar vodi v sterilnost. Tudi nekatere trajnice so v procesu selekcije postale enoletnice (Ray in sod., 2015). Sčasoma so tudi nekateri udomačeni genotipi (predvsem visokorodne sorte, ki so povečini homozigotne) postali dovzetni za bolezni in škodljivce, kar so izboljšali z vključevanjem genov v njihove genotipe iz divjih sorodnikov (Slika 1) (Salgotra in sod., 2021).

Genski tok je proces, pri katerem se določeni aleli, ki so značilni za neko populacijo, prenesejo na drugo območje v drugo populacijo, ki je od prve populacije geografsko ločena (Agrios, 2005). Podobno, kot se aleli prenašajo pri genskem toku, se tudi pri migracijah. Migracije omogočajo prenos alelov med vrstami in populacijami s premikanjem, prenosom cvetnega prahu, razpršitvijo semen in sajenjem vegetativnega razmnoževalnega materiala (Martin, 2005).

Na gensko pestrost rastlin vpliva tudi genski zdrs. Genski zdrs je mehanizem, kjer se spremenijo frekvence določenih alelov v populaciji skozi generacije zaradi naključnih napak pri vzorčenju oziroma izgubah genskega materiala (Parsons, 1963).

Mutacije, kot vir genetske variabilnosti oz. pestrosti, močno vplivajo na fenotip rastlin. Te lahko povzročijo nevtralne, pozitivne ali negativne učinke na različne lastnosti rastlinskih vrst (McCouch, 2004). Poleg selekcije in genetskega zdrsa, mutacije predstavljajo ključni mehanizem za spreminjanje frekvence alelov v populaciji ter so pomembne za evolucijske dogodke rastlin. Kot prvi odziv na spremembe, so se rastline poslužile mutacij (McCouch, 2004). To je lahko odziv na klimatske spremembe v okolju ali pa na spremembe v lokacijah rastišč, zaradi posega človeka v naravo (Smith, 1989). Naravne oz. spontane mutacije so bile v zgodovini pomemben vir genetske variabilnosti, danes pa sodobne tehnologije, kot je mutageneza, z umetno izzvanimi mutacijami, pospešujejo ta proces (Salgotra in Chauhan, 2023). Z mutagenezo pride do številnih genskih sprememb, kot so delecije, podvojitve, insercije in premikanje mobilnih elementov. Tudi žlahtnitelji se poslužujejo mutageneze in ostalih sodobnih tehnologij, saj so le te omogočile hitrejšo pridobivanje rastlin z izboljšanimi lastnostmi, kot so odpornost na bolezni in škodljivce, toleranca na abiotične strese in izboljšanje hranilnih vrednosti izbranih sort (Slika 1) (Smith, 1989).

### 2.3 VPLIVI NA IZGUBO BIOTSKE RAZNOVRSTNOSTI

Zoženje biotske raznovrstnosti se lahko odraža v delni in tudi popolni genski eroziji, kar je posledica različnih dejavnikov, kot so razvoj infrastrukture, podnebne spremembe, ki vplivajo na zmanjševanje ali izgubo habitatov. Na zmanjšanje populacij pa ima velik vpliv nepremišljena oskrba in raba tal, kot so prekomerna paša, košnja in pretirano nabiralništvo (Hoban in sod., 2020). Tudi intenzivna praksa gojenja sodobnih sort z ozko genetsko osnovo oz. variabilnostjo je pomemben dejavnik genetske erozije, ki povečuje genetsko ranljivost (Begna, 2021). Čeprav so te sorte nosilci gospodarsko pomembnih lastnosti, lahko postanejo zaradi svoje homozigotnosti sčasoma dovzetne za različne bolezni in škodljivce (Begna, 2021). V nekaterih primerih se nove, visoko rodne sorte uvajajo in uporabljajo brez ustreznega preverjanja in kontrole glede odpornosti na bolezni in škodljivce, kar lahko privede do nepredvidenih epidemij rastlinskih bolezni in povečanega pojava škodljivcev (Smolders, 2006).

### 2.4 OHRANJANJE BIOTSKE RAZNOVRSTNOSTI

V današnjem obdobju intenzivne globalizacije je biotska raznolikost in posledično biološka raznovrstnost zelo na udaru, kar se lahko drastično odraža na prisotnosti in številčnosti genskih

virov (GV) na določenem območju. Številni dejavniki, kot so: intenzivni gospodarski razvoj, podnebne spremembe, spremembe v rabi kmetijskih zemljišč, nepravilno gospodarjenje in čezmerno izkoriščanje rastlinskih genskih virov (RGV) povzročajo njihovo zmanjševanje, lahko tudi izgubo in s tem oženje biotske raznovrstnosti. Ohranjanje biotske raznovrstnosti je tako ključno na nacionalnem, evropskem in svetovnem nivoju. Na nivoju Slovenije so RGV za prehrano in kmetijstvo regulirani z Zakonom o kmetijstvu (Zakon ..., 2008 s pripombami in dopolnitvami). Krovni dokument ohranjanja rastlinske pestrosti v Evropi je Evropska strategija za genske vire (ang. Genetic Resources Strategy for Europe), ki jo na področju RGV dopolnjuje Evropska strategija za rastlinske genske vire (ang. Plant Genetic Resources Strategy for Europe). Glavni namen obeh dokumentov je sprejeti strategije za okrepitev ohranjanja in trajnostno rabo RGV v Evropi, ki predstavljajo osnovo za trajnostno kmetijstvo, prehransko varnost, prilagodljivost podnebnim spremembam in so podpora evropski bioekonomiji in konkurenčnosti. Med prioritetskimi cilji Evropske strategije za RGV, so tudi: 1) razširitev *in situ* ohranjanja divjih sorodnikov kmetijskih rastlin in divjih rastlin za prehrano ter 2) izboljšanje in promocija ohranjanja RGV na kmetijah (Genetic ..., 2020; Plant ..., 2021). Poleg nacionalnih in evropskih strategij ohranjanja biotske raznovrstnosti, so bile na mednarodnem nivoju sprejete pogodbe v skladu s Konvencijo o biološki raznovrstnosti (CBD) za ohranjanje, trajnostno uporabo, pravično delitev koristi in varno ravnanje z genetskimi viri. Mednarodna pogodba o rastlinskih genskih virih za hrano in kmetijstvo (ITPGRFA) deluje v skladu s CBD za spodbujanje trajnostnega kmetijstva in zagotavljanje prehranske varnosti. Nagojski protokol, ki je začel veljati leta 2014, pa spodbuja pošteno in pravično delitev koristi, ki izhajajo iz uporabe genskih virov.

## 2 NASTANEK IN ORGANIZIRANOST GENSKIH BANK

### 3.1 OPREDELITEV IN ZGODOVINA

Genska banka je skladišče genetskega materiala, katere primarne naloge so: zbiranje, hranjenje, razmnoževanje, opisovanje, vrednotenje, dokumentiranje in razpošiljanje (distribucija) RGV (Tyagi in Agrawal, 2015). Ta vključuje cele rastline, semena, tkivne kulture, celice, DNA in druge biološke materiale, ki vsebujejo genske informacije. Genski material se lahko ohranja *in situ*, kjer se GV ohranjajo v njihovem naravnem okolju (habitatu), kar omogoča naraven proces evolucije z minimalnim vplivom človeka (Pandotra in Gupta, 2015). Lahko pa se genetski material ohranja *ex situ*, kar je alternativna metoda za ohranjanje dragocenih genskih virov zunaj njihovega naravnega okolja (Malhotra in sod., 2019). Z *ex situ* hranjenjem rastlinskega materiala lahko preprečimo njihovo izgubo zaradi naravnih katastrof, okoljskih sprememb in človekovih dejavnosti, ki se lahko odražajo v nepremišljeni urbanizaciji, prekomernem izkoriščanju in uporabi (Ogwu in sod., 2014).

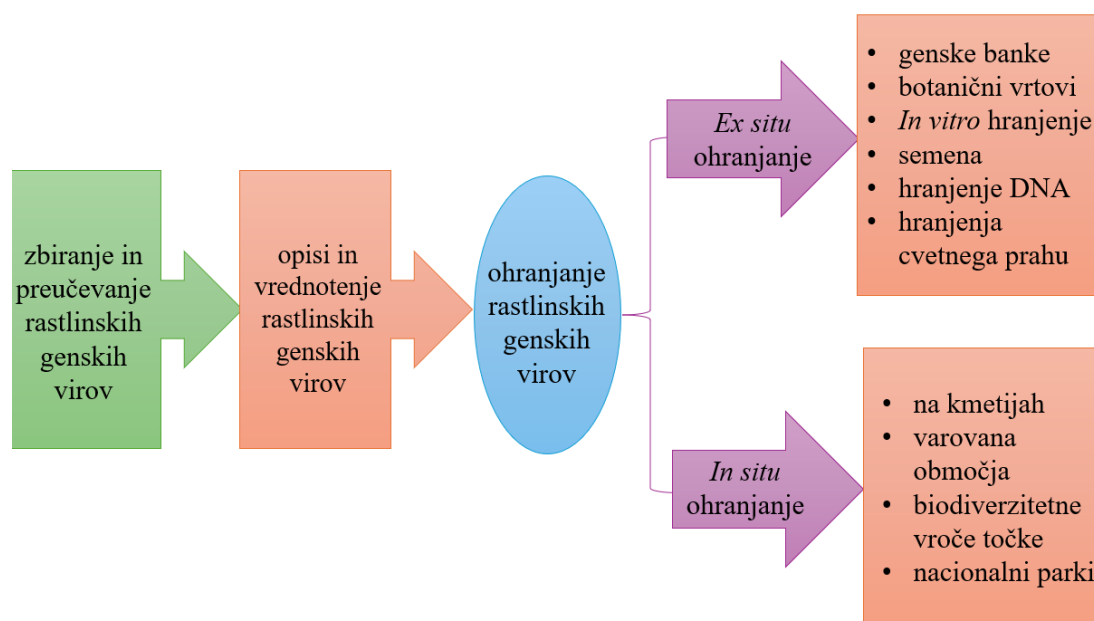
Že od prvih začetkov kmetovanja so ljudje uvajali selekcijo (odbiro) in ohranjanje najboljših genotipov, gojenje in ohranjanje semen lokalno prilagojenih rastlin (Panis in sod., 2020). Od 16. stoletja do leta 2019 je bilo zbranih in ohranjenih več kot 80.000 rastlinskih vrst v približno 3.400 vrtovih po svetu (The State ..., 2019). Po prvi svetovni vojni so začeli sistematično proučevati raznolikost rastlinskih vrst. Med prvimi, ki so začeli s proučevanjem območij z

gensko pestrostjo in zbiranjem različnih gojenih rastlinskih vrst in njihovih sorodnikov, je bil ruski botanik in genetik Nikolaj Ivanovič Vavilov. Ustanovil je Inštitut za rastlinske genske vire (VIR) v Sankt Peterburgu, ki je postal prva genska banka svetovnega pomena (Cohen in Loskutov, 2016). Sredi 20. stoletja pa je "zelena revolucija" prinesla eksplozivno povečanje pridelkov kmetijskih rastlin, zamenjavo domačih sort in populacij s sodobnimi sortami tudi hibridnimi in širjenje sistema monokulturne pridelave. To je vodilo do izgube več kot 90 % poljščin in izgube več kot 75 % genetske raznovrstnosti (Building on Gender ..., 2005).

### 3.2 METODE SHRANJEVANJA GENSKEGA MATERIALA

Genski material se lahko ohranja na različne načine. Pri *in situ* ohranjanju genskega materiala se genski viri ohranjajo v naravnem habitatu, kar omogoča naraven proces evolucije z minimalnim vplivom človeka (Pandotra in Gupta, 2015). To spodbuja genetsko raznolikost in nenehna prilagajanja na pritiske iz okolja. *In situ* ohranjanje lahko poteka na dva načina: preko ohranjanja na kmetijah ali v naravnih rastiščih t.i. genskih rezervatih oz. genski bankah (Hammer in Teklu, 2008; Ogwu in sod., 2014). Ohranjanje RGV na kmetijah vključuje ohranjanje tradicionalnih lokalnih sort, divjih sorodnikov kmetijskih rastlin in divjih rastlin za direktno uporabo. Pri ohranjanju rastlinskih vrst v naravnih rastiščih oz. genskih rezervatih je območje določeno z lokacijo, kjer je potrebno gensko raznolikost spremljati in vzdrževati skozi aktivno in dolgoročno ohranjanje, kot je gozdni rezervat, *in situ* rastišča zdravilnih in aromatičnih rastlin, divjih sorodnikov kmetijskih rastlin in divjih rastlin za prehrano in krmo. S tem načinom se ohranja predvsem gozdne rastline in vegetativno množene sadne rastline, jagodičje ter rastline, katerih semena v *ex situ* razmerah hitro izgubljajo kalivost, večina krmnih rastlin ter zdravilnih in aromatičnih rastlin in nekatere zelenjadnice (Slika 2) (Hammer in Teklu, 2008; Ogwu in sod., 2014).

*Ex situ* ohranjanje je ohranjanje dragocenih in ogroženih GV zunaj njihovega naravnega habitata. Ohranja se lahko rastlinski material v obliki semen in vegetativnih delov, v hladilnicah, krioprezervaciji, rastlinskih tkivnih kulturah, rastlinjakih in kolekcijskih nasadih. Namenjeno je predvsem tistim virom, ki jim v naravnem okolju, zaradi človeških dejavnosti, okoljskih sprememb, prekomerne uporabe in prekomernega izkoriščanja, grozi izumrtje (Malhotra in sod., 2019). Začetek sega v srednja leta 20. stoletja, ko se je *ex situ* ohranjanje rastlinskega materiala začelo zaradi hitre izgube pestrosti in številčnega zmanjševanja oz. oženja populacij (Jose in sod., 2018). Izmed vseh različnih načinov ohranjanja genetskega materiala je najenostavnejše ohranjati semena. Semena se lahko hrani dolgoročno, srednjeročno ali kratkoročno pri različnih temperaturah (-20, 4 in 20 °C) in stopnjah vlažnosti (5 do 15 %) odvisno od vrste semen in dolžine hranjenja (Long in sod., 2003). Vendar vsa semena niso primerna za shranjevanje pri nizkih temperaturah. To predvsem velja za drevesne vrste. Te so shranjena v različnih kolekcijskih nasadih, za kasnejšo uporabo v žlahtniteljske namene (Jose in sod., 2018). Krioprezervacija dolgoročno hrani rastlinski genski material pri zelo nizkih temperaturah (-196 °C), največkrat v tekočem dušiku. Pri tem se celoten metabolizem rastline ter celična delitev - mitotična ustavita (Martin in sod., 1998; Salgotra in Gupta, 2015).



Slika 16: Različne strategije, uporabljene za *in situ* in *ex situ* ohranjanje rastlinskih genskih virov (prirejeno po Salgotra in Chauhan, 2023)

Trenutno pa se za ohranjanje rastlinskega genetskega materiala uporabljajo tudi DNA banke in digitalizirani molekularni podatki. Slednji so ključni za znanstvene raziskave in uporabo genetskih virov. Informacije o nukleotidnem zaporedju oz. sekvenci igra ključno vlogo v raziskavah in žlahtnjenju, ki lahko pripomorejo k izboljšanju prehranske varnosti in učinkovitejšemu ohranjanju biotske pestrosti (Dulloo in sod., 2006).

### 3 GENSKE BANKE

#### 4.1 MEDNARODNE GENSKE BANKE

Med genskimi bankami tako po velikosti kot organiziranosti imata največji pomen Svetovna semenska banka Svalbard, ki hrani varnostne dvojnike semenskih vzorcev iz celega sveta in Posvetovalna skupina za mednarodne raziskave v kmetijstvu, v sklopu katere delujejo nekatere nacionalne genske banke v katerih se hranijo lokalni GV posameznih držav (Preglednica 1 in Priloge A, B in C).

##### 4.1.1 Svetovna semenska banka Svalbard

Svetovna semenska banka Svalbard (ang. Svalbard global seed vault) je ena izmed svetovnih genskih bank, ki hrani nacionalne varnostne dvojnike semen različnih rastlinskih vrst iz celega sveta. Namen semenske banke je dolgoročno shranjevanje in ohranjanje varnostnih dvojnikov semen iz genskih bank po vsem svetu. Prav tako pa zagotavlja dvojnike posameznim semenskim GV, v primeru, da so originalni vzorci v nacionalnih genskih bankah izgubljeni ali uničeni zaradi naravnih nesreč, človeških konfliktov, slabega upravljanja ali kakršnih koli drugih okoliščin (Purpose ..., 2024).

Prve ideje o svetovni semenski banki so se pojavile v 80. letih 20. stoletja. Leta 1984 je Nordijska genska banka, imenovana NordGen, ustanovila rezervno skladišče v zapuščenem rudniku premoga. Oktobra 2004 se je norveška vlada odločila ustanoviti in financirati Svetovno semensko banko Svalbard, ki je bila odprta 26. februarja 2008 (The history, 2024).

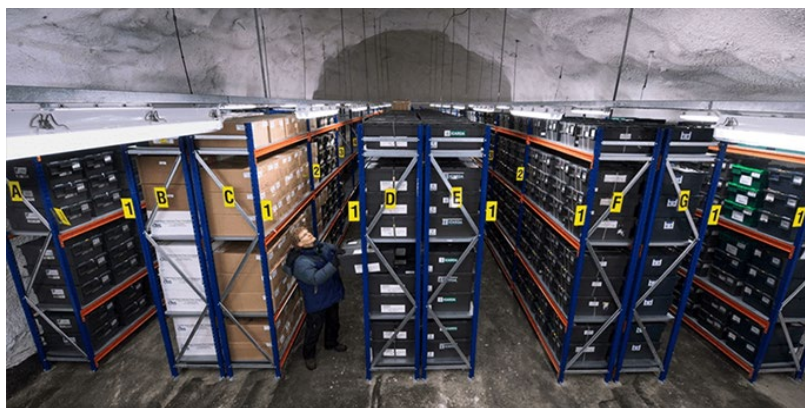
Svetovna semenska banka leži na norveškem otoku Spitsbergen, ki se nahaja v arktičnem otočju Svalbard. Sam objekt je vrezan v skalo, skladišče semen pa se nahaja 100 m globoko v skali, pod 40 do 60 metrov debelo plastjo skal. Svalbard je idealna lokacija za gensko banko tudi zaradi svojega položaja, ki se nahaja na območju nizke vlažnosti, je zaščiten pred poplavami, največja prednosti lokacije pa je permafrost, ki omogoča semenski banki naravno zamrzovanje, s stalnimi temperaturami med -3 in -4 °C (The storage, 2024). Temperatura v skladišču semen je -18 °C, kar dosežejo z dodatnimi hladilnimi sistemi.

Semenska banka Svalbard je sestavljena iz treh dvoran, velikih 9,5 x 27 metrov, ki lahko skupaj shranijo do 4,5 milijona vzorcev semen. Trenutno je v uporabi le ena dvorana, dodatne pa bodo aktivirane po potrebi (The facility, 2024). Semena so shranjena v aluminijastih vrečkah, zaprtih v trislojne folije in shranjenih v označenih zabojih glede na državo izvora (The storage, 2024). Vsaka vrečka vsebuje povprečno 500 semen, odvisno od velikosti. Trenutno je v banki shranjenih 1,2 milijona vzorcev semen iz približno 1.500 semenskih bank po svetu. Semena, ki so sprejeta v banko, so v lasti tistih držav oz. genskih bank, ki so jih prinesli v banko in jih lahko samo oni iz banke tudi vzamejo v primeru, da je njihov rastlinski material poškodovan ali izgubljen (Asdal in Guarino, 2018).

Najbolj zastopani zelenjavi v genski banki sta riž in pšenica, ki imata več kot 150.000 semenskih vzorcev. Po tem sledijo še ječmen, fižol, koruza, soja ter ostala žita, zelenjadnice in krmne rastline (Asdal in Guarino, 2018).



**SVALBARD  
GLOBAL  
SEED VAULT**



Slika 17: Logotip in dvorana Svetovne semenske banke Svalbard s shranjenimi varnostnimi dvojniki iz 1.500 genskih bank iz celega sveta

#### **4.1.2 Posvetovalna skupina za mednarodne raziskave v kmetijstvu - CGIAR**

Posvetovalna skupina za mednarodne raziskave v kmetijstvu - CGIAR je največja kmetijska svetovna mreža, ki združuje organizacije vključene v raziskave za varno prehransko prihodnost.

Del te velike mreže je tudi 11 genskih bank, lociranih na različnih koncih sveta (Preglednica 1), ki pomagajo pri ohranjanju genske variabilnosti in zdravih rastlin ter njihovi distribuciji zaprošenim interesantom (Genebanks ..., 2024):.

- AfricaRice, največja zbirka afriškega riža. Prostori za shranjevanje riža so locirani v Slonokoščeni obali, vsebujejo 20.000 akcesij različnih riževih sort.
- Biodiversity International, ki je odgovoren za največjo svetovno rastlinsko gensko banko banan. V tej zbirki se nahaja več kot 1.600 akcesij gojenih in divjih vrst banan, ki se jih hrani krioprezervirane ali kot rastlinske tkivne kulture. Genska banka se nahaja v Leuvnu, Belgiji.
- Mednarodni center za tropsko kmetijstvo (ang. International Center for Tropical Agriculture – CIAT) se nahaja v Kolumbiji. V obliki semen, na poljih ali kot rastlinske tkivne kulture, se v tej genski banki ohranjajo različni GV fižola, tropskih krmnih rastlin in kasave.
- Mednarodni center za izboljšanje koruze in pšenice (ang. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) se nahaja v Mehiki in hrani 153.000 akcesij pšenice in 28.000 akcesij koruze.
- Mednarodni center za krompir (ang. International Potato Center – CIP) je največja *in vitro* zbirka krompirja v mreži CGIAR, ki se nahaja v Peruju. Poleg različnih GV navadnega krompirja, v kriovialah hranijo tudi GV sladkega krompirja, andske korenovke in ostalih gomoljnic.
- Enota svetovnih kmetijsko gozdarskih genskih virov (ang. Genetic Resources Unit of World Agroforestry – ICARF) hrani 190 vrst gojenih in divjih GV različnih drevesnih vrst, ki se uporabljajo za pridelavo sadja, lesa, v medicini in v druge namene. Te drevesne GV hranijo v 15 različnih državah po vsem svetu.
- Mednarodni center za kmetijske raziskave v aridnih območjih (ang. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas – ICARDA) hrani 145.000 vzorcev rastlin, značilnih za območje rodovitnega polmeseca. Hranjenje RGV gojenih vrst ječmena, čičerike, travne grašice, leče in pšenice poteka v Maroku, v Libanonu pa za divje sorodnike žit in stročnic.
- Mednarodni inštitut za raziskovanje poljščin v polaridnih tropih (ang. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics – ICRISAT) ima sedež v Indiji in več postaj v Afriki: Nigru, Keniji in Zimbabveju. ICRISAT upravlja s 125.000 akcesijami čičerike, arašidov, prosa in sirka.
- Mednarodni inštitut za tropsko kmetijstvo (ang. International Institute of Tropical Agriculture – IITA) ima sedež v Nigeriji. Inštitut ohranja pomembne afriške GV banan, kasav, koruze in soje v obliki semen ali vegetativno - klonov.
- Mednarodni raziskovalni inštitut za živinorejo (ang. International Livestock Research Institute - ILRI) ima sedež v Etiopiji, hrani okrog 1.000 vrst in nekaj manj kot 20.000 akcesij tropskih rastlin, ki so primerne za krmo živali.
- Mednarodni inštitut za raziskave riža (ang. International Rice Research Institute – IRRI) tako kot AfricanRice, hrani različne GV riža in njegovih divjih sorodnikov. V genski banki, s sedežem na Filipinih, se nahaja 130.000 različnih GV riža, kar ga uvršča v največjo zbirko riža na svetu.

## 4.2 NACIONALNE GENSKÉ BANKE

Poleg mednarodne ureditve in vodenja RGV, potekajo aktivnosti in skrb na nacionalnih nivojih, ki niso zanemarljivi in lahko pokrivajo velika območja v sklopu določene države, kot so Indijska nacionalna genska banka, Mednarodni center za izboljšave koruze in pšenice v Mehiki, Vavilov inštitut za rastlinske genske vire v Rusiji in druge, z nekoliko manj vzorci, ki so omejeni na posamezne kmetijske vrste, ki se v tistem območju pridelujejo in njihove divje sorodnike (Preglednica 1). Med temi velikimi nacionalnimi zbirkami so tudi manjše nacionalne zbirke, kot je Slovenska rastlinska genska banka, ki ohranja lokalne GV pomembne za prehrano in kmetijstvo. Slovenija ima veliko biotsko raznolikost na manjšem geografskem območju, kar je njena specifičnost.

### 4.2.1 Indijska nacionalna genska banka (ICAR-NBPGR)

Indijski svet za kmetijske raziskave (ang. The Indian Council of Agricultural Research - ICAR) je leta 1976 ustanovil nacionalni urad za rastlinske genske vire (ang. The National Bureau of Plant Genetic Resources - NBPGR, ICAR- NBPGR) s sedežem v New Delhiju. Poleg sedeža je še 10 podenot genske banke, ki se nahajajo v različnih podnebnih območjih v državi (Singh in sod., 2020).

Indijski polotok je izjemno bogat z genskimi viri in rastlinsko raznovrstnostjo, saj vključuje širok spekter habitatov, od tropskih gozdov do gorskih in obalnih mokrišč. Za Indijo so značilne tudi "vroče točke" kmetijske biodiverzitete, ki predstavljajo skoraj 60 % svetovnih rastlinskih in živalskih vrst (Myers in sod., 2000). V genski banki ICAR-NBPGR hranijo 400.000 različnih vzorcev, od katerih je 33 % endemičnih za Indijo, predvsem iz severovzhodne Indije, Zahodnih Ghatov, severozahodne Himalaje ter Nikobarskih in Andamskih otokov (Singh in sod., 2020).

Namen indijske genske banke je hranjenje in ohranjanje rastlinskega dednega materiala, pa tudi menjava rastlinskih virov z drugimi državami po svetu (Singh in sod., 2020). Večina rastlinskih virov se ohranja v obliki semen v genski banki, na poljih v obliki kolekcij, kot krioprezerviran genski material ali pa v *in vitro* genskih bankah. Pri tem je pomembno, da se o vzorcih zbere čim več podatkov in opravi dober opis po mednarodnih deskriptorjih, kot so: izvornost (unikatnost), da se redno pregleduje in ocenjuje njihove lastnosti, v namene, da se v banki ne podvajajo vzorci. Ocenjuje se tudi kakovost semen, živost, vitalnost in zdravstveno stanje. Poleg opisov (karakterizacije) in vrednotenja (evalvacije) ter hranjenja, pa banka zagotavlja tudi žlahtniteljski material za potrebe naročnikov, največkrat kmetov in žlahtniteljskih ustanov (Singh in sod., 2020).

Največji del rastlinskega materiala v indijski semenski genski banki predstavljajo žita (koruza, pšenica, proso), stročnice (soja, čičerika, grah), oljnice (sončnica, žafranika), predivnice (bombaž, juta), zdravilne in aromatične rastline (tobak, opijski mak), zelenjadnice (paradižnik, čili, čebula in ostale) in začimbnice (koriander, triplata) (Status ..., 2024).

#### **4.2.2 Mednarodni center za izboljšave koruze in pšenice**

Mednarodni center za izboljšave koruze in pšenice v Mehiki (ang. International Maize and Wheat Improvement Center - CIMMYT) je nastal v 40. letih 19. stoletja, kot pilotni program, namenjen dvigu kmetijske pridelave. Pod vodstvom Normana Borlauga (Nobelov nagrajenec, 1970) je institut razvil različne sorte pšenice z višjim in kakovostnejšim pridelkom, ki so bile odpornejše na razne bolezni. Mednarodni center za izboljšave koruze in pšenice je danes del mreže - Posvetovalne skupine za mednarodne raziskave v kmetijstvu (CGIAR), ki se zavzema za varno prihodnost prehrane (Genetic resources, 2024).

Sedež CIMMYT se nahaja v El Batanu v Mehiki, vendar sodeluje z laboratoriji in zbirkami tudi na Kitajskem, v Bangladešu, Kolumbiji, Etiopiji, Indiji, Keniji, Turčiji in drugod po svetu (Genetic resources, 2024).

Center upravlja z najbolj raznoliko zbirko koruze in pšenice na svetu. Trenutno se v banki nahaja preko 28.000 vzorcev koruze in preko 153.000 vzorcev žit (navadna oz. krušna pšenica, trda pšenica, divja pšenica, tritikala, ječmen, rž,) (Pardey in sod., 1999; Genetic resources, 2024). Vsako leto tudi pošljejo več kot pol milijona semen kmetom in ostalim uporabnikom po svetu.

#### **4.2.3 Vavilov raziskovalni inštitut za rastlinske genske vire**

Nikolaj Vavilov je bil eden prvih raziskovalcev, ki so prepoznali potrebo po ohranjanju rastlinskega genetskega materiala ob nenehnih spremembah v okolju. Zbirka rastlinskih genskih virov Vavilovega inštituta (ang. N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry) je ena najstarejših kolekcij na svetu (Dzyubenko, 2018). Ustanovljena je bila leta 1894 s strani ministrstva za državno premoženje in urada za uporabno botaniko. Tekom leta se je urad preimenoval v Vavilov raziskovalni inštitut za rastlinske genske vire, ki je postal nacionalni center za ohranjanje, raziskovanje in uporabo RGV (Dzyubenko, 2018).

Na začetku svojega delovanja, leta 1901 se je v zbirki rastlinskih virov hranilo nekaj več kot tristo, natančno 302 akcesij. Tekom let je število akcesij rastlo, upadlo je le med prvo in drugo svetovno vojno. Leta 2006 se je v zbirki nahajalo 323.948 različnih akcesij, leta 2017 pa 346.666 akcesij (Dzyubenko, 2015; Dzyubenko, 2016). Največ hranjenih akcesij pripada pšenici in tritikali (52.658 akcesij), zelenjadnicam (50.089 akcesij), zrnatim stročnicam (46.344 akcesij). Poleg naštetih se v zbirki hranijo tudi rž, oves, krompir, sadje in jagodičevje ter oljnice (Dzyubenko, 2018).

#### **4.2.4 Slovenska rastlinska genska banka**

Slovenska rastlinska genska banka (SRGB), ustanovljena leta 1997, hrani lokalne GV žit, krmnih rastlin, zelenjadnic, zdravilnih in aromatičnih rastlin, hmelja, sadnih rastlin in vinske trte. V okviru SRGB deluje več institucij, ki so specializirane za varno hranjenje in opravljanje s posamezno rastlinsko vrsto in od leta 2018 delujejo v sklopu Javne službe nalog rastlinske genske banke.

Zbirke hranjenih slovenskih GV so v sklopu štirih inštitucij: Kmetijski inštitut Slovenije. Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru in Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Namen zbirk je zbiranje, vrednotenje in hranjenje GV, ki so pomembni za kmetijstvo in prehrano v Sloveniji.

Najpomembnejše so lokalne populacije in domače stare sorte. Na Oddelku za agronomijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, se nahajajo zbirke različnih GV ajde in ostalih žit, koruze, sadnih rastlin - predvsem pečkarjev, trav in detelj ter zdravilnih in aromatičnih rastlin. Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo ohranjajo GV hmelja ter zdravilnih in aromatičnih rastlin.. V trajnih nasadih vzdržujejo in vrednotijo več kot 200 divjih ženskih in moških GV, katerih večina je bila nabranih na rastiščih hmelja na področju Slovenije in manjši del na področju bivše Jugoslavije, Altaja in Kavkaza. Poleg GV vzdržujejo 17 slovenskih sort hmelja in dve nemški sorti vpisani v Slovensko sortno listo (Genska ..., 2024). Zbirke v sklopu Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru hranijo sadne GV koščičarjev, jagodičje in vinsko trto s Štajerskega vinorodnega okoliša. Zbirke Kmetijskega inštituta Slovenije so po številu zbranih GV največje in hranijo GV krmnih rastlin, zelenjadnic, žit, vinske trte iz Primorskega vinorodnega okoliša.

Vseh 5.659 hranjenih akcesij v SRGB imajo izpolnjene osnovne podatke (multicrop passport deskriptorje), ki zajemajo splošne podatke o posamezni akcesiji: kraj in datum zbiranja, opis lokacije, donatorja oz. kdo je nabral vzorec. Zabeleženi podatki so vneseni v Zbirko podatkov rastlinske genske banke, nekateri pa tudi v mednarodno bazo podatkov oz. evropski katalog RGV: The European Search Catalogue for Plant Genetic Resources (EURISCO). Nekatere akcesije pa imajo izpolnjene tudi podrobnejše podatke o opisih (karakterizacija) in vrednotenju (evalvacija), ki so pridobljeni na osnovi opisov in vrednotenja s pomočjo mednarodnih deskriptorjev, ki omogočajo mednarodno primerljivost zbranih opisov (Luthar in sod., 2012).

#### 4 NAJVEČJE GENSKÉ ZBIRKE IN ŠTEVILO HRANJENIH AKCESIJ

V preglednici 1 je zbran pregled nekaterih največjih genskih zbirk in število hranjenih akcesij. Naštete pa so tudi najštevilčnejše rastlinske vrste, ki se nahajajo v določeni genski zbirki.

Preglednica 1: Največje genske banke in število hranjenih akcesij

| Ime inštitucije                                            | Država | Prevladujoča rastlinska vrsta | Št. akcesij | Vir                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------|--------|-------------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Indijska nacionalna genska banka (ICAR-NBPGR)              | Indija | žita stročnice                | 440.000     | <a href="https://doi.org/10.18699/VJ20.622">https://doi.org/10.18699/VJ20.622</a> (9. jul. 2024)                 |
| Vavilov raziskovalni inštitut za rastlinske genske vire    | Rusija | pšenica zelenjadnice          | 346.666     | <a href="https://doi.org/10.1186/s40064-016-2795-z">https://doi.org/10.1186/s40064-016-2795-z</a> (9. jul. 2024) |
| Mednarodni center za izboljšave koruze in pšenice (CIMMYT) | Mehika | koruza pšenica                | 181.000     | <a href="https://www.genebanks.org/genebanks/">https://www.genebanks.org/genebanks/</a> (9. jul. 2024)           |

|                                                                      |                         |                               |           |                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mednarodni center za kmetijske raziskave v aridnih območjih (ICARDA) | Maroko                  | ječmen<br>čičerika<br>pšenica | 145.000   | <a href="https://www.genebanks.org/genebanks/">https://www.genebanks.org/genebanks/</a> (9. jul. 2024)                                   |
| Mednarodni inštitut za raziskave riža (IRRI)                         | Filipini                | riž                           | 128.000   | <a href="https://www.genebanks.org/genebanks/">https://www.genebanks.org/genebanks/</a> (9. jul. 2024)                                   |
| Mednarodni center za tropsko kmetijstvo (CIAT)                       | Kolumbija               | kasava<br>fižol               | 65.600    | <a href="https://alliancebioiversityciat.org/colombia-genebank">https://alliancebioiversityciat.org/colombia-genebank</a> (9. jul. 2024) |
| Mednarodni inštitut za tropsko kmetijstvo (IITA)                     | Nigerija                | krmni grah                    | 38.968    | <a href="https://www.genebanks.org/genebanks/iita/">https://www.genebanks.org/genebanks/iita/</a> (9. jul. 2024)                         |
| AfricaRice                                                           | Slonoko-<br>ščena obala | riž                           | 20.000    | <a href="https://www.genebanks.org/genebanks/">https://www.genebanks.org/genebanks/</a> (9. jul. 2024)                                   |
| Mednarodni center za krompir (CIP)                                   | Peru                    | krompir                       | 12.000    | <a href="https://cipotato.org/cip-50/potato-collection/">https://cipotato.org/cip-50/potato-collection/</a> (9. jul. 2024)               |
| Skupno                                                               |                         |                               | 1.377.234 |                                                                                                                                          |

## 5 ZAKLJUČEK

Ohranjanje ogroženih RGV primernih za prehrano in kmetijstvo predstavlja enega ključnih izzivov sodobne biotehnologije, kmetijstva in znanstvenih raziskav. Ob nenehnih podnebnih spremembah, izgubi habitatov in intenzivnem kmetovanju so genske banke ključni varuhi biotske raznovrstnosti. Omogočajo dolgoročno hranjenje RGV, ohranjajo njihovo regeneracijo in zagotavljajo izhodiščni material za sodobne žlahtniteljske programe in razvoj novih sort, ki so primerne za gojenje v trenutnih razmerah in prilagojene izzivom prihodnosti.

V prihodnosti bo tako še bolj potrebno integrirano pristopiti k ohranjanju RGV, pri čemer bodo genske banke ter novejša tehnologija igrale vse bolj osrednjo vlogo. Njihova naloga bo ne le ohranjanje, temveč tudi aktivno sodelovanje pri razvoju rešitev za globalne izzive, kot so prehranska varnost, prilagajanje na podnebne spremembe in trajnostno upravljanje z naravnimi viri. Z zagotavljanjem podpore genskim bankam na lokalni, nacionalni in mednarodni ravni bo človeštvo bolj pripravljeno na prihodnje izzive in sposobnejše varovati svojo naravno dediščino za prihodnje generacije. Zavedati se moramo, da je področje GV zelo ranljivo in ima ključno vlogo pri zagotavljanju prehranske varnosti na nacionalni in mednarodni ravni. Zato države tem problemom in izzivom posvečajo veliko pozornosti, tudi manj razvite ob tuji pomoči, ker se zavedajo strateškega in neodvisnega pomena prehranske samozadostnosti.

## 6 VIRI

- Agrios G. 2005. Genetics of plant disease. *Plant Pathology*, 5: 124-174, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50010-5>
- Asdal A., Guarino L. 2018. The Svalbard global seed vault: 10 years – 1 million samples. *Biopreservation and Biobanking*, 16, 5: 391 – 392, <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0025>
- Begna T. 2020. Importance and impact of ecological approaches to crop domestication. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 10, 8, <https://doi.org/10.7176/JBAH/10-8-04>

- Begna T. 2021. Role and economic importance of crop genetic diversity in food security. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 7: 164–169, <https://doi.org/10.17352/2455-815X.000104>
- Brown W. 1983. Genetic diversity and genetic vulnerability - an appraisal. *Economic Botany*, 37: 4–12, <https://doi.org/10.1007/BF02859301>
- Building on Gender, Agrobiodiversity and Local Knowledge; Food and Agriculture. 2005. Rim, Organization of the United Nations: 4-5, <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/d6a5a842-e58b-47df-b434-fc3ea8474120/content> (20. jul. 2024)
- Cohen J., Loskutov I. 2016. Exploring the nature of science through courage and purpose: a case study of Nikolai Vavilov and plant biodiversity. *SpringerPlus*, 5: 1159, <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2795-z>
- Colombia genebank. 2024. Alliance Bioversity and CIAT, <https://alliancebioversityciat.org/colombia-genebank> (9. jul. 2024)
- Dulloo E., Nagamura Y., Ryder O. 2006. DNA storage as a complementary conservation strategy. V: *DNA Banks - Providing Novel Options for Gene Banks? Topical Reviews in Agricultural Biodiversity*. Vicente M., Andersson M. (ur.). Rim, International Plant Genetic Resources Institute: 11-25, [https://cgkb.cgiar.croptrust.org/images/file/learning\\_space/dnabanks.pdf](https://cgkb.cgiar.croptrust.org/images/file/learning_space/dnabanks.pdf) (25. jul. 2024)
- Dzyubenko N. 2015. Genetic resources of cultivated plants as the basis for Russia's food and environmental security. *Herald of the Russian Academy of Sciences*, 85: 15–19, <https://doi.org/10.1134/S1019331615010013>
- Dzyubenko N. 2016. The Vavilov Institute, yesterday and today. V: *Seeds of the Earth*. Del Curto M (ur.). The Vavilov Institute: 254-257
- Dzyubenko N. 2018. Vavilov's collection of worldwide crop genetic resources in the 21st century. *Biopreservation and Biobanking*, 16, 5: 377-383, <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0045>
- Ellstrand N., Prentice H., Hancock J. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 30: 539–563, <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.30.1.539>
- Genebanks and germplasm health units. 2024. CGIAR, <https://www.genebanks.org/genebanks/> (4. jun. 2024)
- Genetic resources. 2024. CIMMYT, <https://www.cimmyt.org/work/genetic-resources/> (2. jul. 2024)
- Genetic Resources Strategy for Europe. 2020. Kell S., Maxted N. (ur.). European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources: 66 s., <https://www.genresbridge.eu/fileadmin/templates/Genres/Uploads/Documents/GRS4E.pdf> (8. avg. 2024)
- Genska banka hmelja. 2024. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, <https://www.ihps.si/hmeljarstvo/genska-banka-hmelja/> (29. maj 2024)
- Hammer K., Teklu Y. 2008. Plant genetic resources: selected issues from erosion to genetic engineering. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics*, 109, 1: 15-50, <https://jarts.info/index.php/jarts/article/viewFile/72/65> (25. jul. 2024)
- Hoban S., Bruford M., Jackson J., Lopes-Fernandes M., Heuertz M., Hohenlohe P., Paz-Vinas I., Sjögren-Gulve P., Segelbacher G., Vernesi C. 2020. Genetic diversity targets and

- indicators in the CBD post-2020 global biodiversity framework must be improved. *Biological Conservation*, 248: 108654, <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108654>
- Jose D., Lucia D., Isaura M., Luis G., Elena C., Cristina M., Joan C., Joan S., Ana R., German A. 2018. Plant genebanks: Present situation and proposals for their improvement, the case of Spanish network. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1794, <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01794>
- Long C., Li H., Ouyang Z., Yang X., Li Q., Trangmar B. 2003. Strategies for agrobiodiversity conservation and promotion: A case from Yunnan, China. *Biodiversity and Conservation*, 12: 1145–1156, <https://doi.org/10.1023/A:1023085922265>
- Luthar Z., Rozman L., Ostrec G., Čop J. 2012. Genska banka oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. *Acta agriculturae Slovenica*, 99, 3: 301–306, <http://aas.bf.uni-lj.si/december2012/3Luthar%20et%20al.pdf> (1. jul. 2024)
- Malhotra N., Panatu S., Singh B., Negi N., Singh D., Singh M., Chandora R. 2019. Genetic resources: collection, conservation, characterization and maintenance. V: *Lentils*. Singh, M. (ur.), Cambridge, ZDA: 21–41, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813522-8.00003-0>
- Martin C., Iridono J., Benito-Gonzales E., Perez C. 1998. The use of tissue culture techniques in the conservation of plant biodiversity. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*, 9: 37-40, [https://www.researchgate.net/publication/297606353\\_The\\_use\\_of\\_tissue\\_culture\\_techniques\\_in\\_the\\_conservation\\_of\\_plant\\_biodiversity](https://www.researchgate.net/publication/297606353_The_use_of_tissue_culture_techniques_in_the_conservation_of_plant_biodiversity) (1. jul. 2024)
- Martin P. 2005. The taxonomy and ethology of the *Afraxalus stuhlmanni* complex. *Steenstrupia*, 29: 1-38, [https://www.academia.edu/1591250/The\\_taxonomy\\_and\\_ethology\\_of\\_the\\_Afraxalus\\_stuhlmanni\\_complex\\_Anura\\_Hyperoliidae](https://www.academia.edu/1591250/The_taxonomy_and_ethology_of_the_Afraxalus_stuhlmanni_complex_Anura_Hyperoliidae) (3. jun. 2024)
- McCouch S. 2004. Diversifying selection in plant breeding. *Plos Biology*, 2, 10: 347, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020347>
- Minter M., Nielsen E., Blyth C., Bertola L., Kantar M., Morales H., Orland C., Segelbacher G., Leigh D. 2021. What is genetic diversity and why does it matter? *Frontiers for Young Minds*, 9: 656168, <https://kids.frontiersin.org/articles/10.3389/frym.2021.656168> (3. jun. 2024)
- Myers N., Mittermeier R., Mittermeier C., da Fonseca G., Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858, <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Ogwu M., Osawaru M., Ahana C. 2014. Challenges in conserving and utilizing plant genetic resources (PGR). *International Journal of Genetics and Molecular Biology*: 6, 2: 16–23, <https://doi.org/10.5897/IJGMB2013.0083>
- Overview. 2024. CGIAR, <https://www.cgiar.org/initiative/genebanks/?section=research&child=Overview> (4. jun. 2024)
- Pandotra P., Gupta S. 2015. Biotechnological approaches for conservation of plant genetic resources and traditional knowledge. V: *Plant Genetic Resources and Traditional Knowledge for Food Security*. Salgotra R., Gupta B., (ur.). Berlin, Springer: 121–135, [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0060-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0060-7_7)
- Panis B., Nagel M., Van den Houwe I. 2020. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen. *Plants*, 9: 1634, <https://doi.org/10.3390/plants9121634>
- Plant Genetic Resources Strategy for Europe. 2021. European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR), Belgium: 91 s., [https://www.ecpgr.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/PGR\\_STRATEGY\\_LP\\_22\\_Nov\\_revised.pdf](https://www.ecpgr.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/PGR_STRATEGY_LP_22_Nov_revised.pdf) (8. avg. 2024)

- Pardey P., Koo B., Wright B. 1999. Costing the *ex situ* conservation of genetic resources: maize and wheat at CIMMYT. *EconPapers*, 52, <https://www.researchgate.net/publication/5056138> (8. avg. 2024)
- Parsons P. 1963. Migration as a factor in natural selection. *Genetica*, 33: 184-206, <https://doi.org/10.1007/BF01725761>
- Purpose, operations and organisation. 2024. Svalbard global seed vault, <https://www.seedvault.no/about/purpose-operations-and-organisation/> (28. maj 2024)
- Putting the world's largest potato collection in the deep freeze. 2024. International Potato Center, <https://cipotato.org/cip-50/potato-collection> (9. jul. 2024)
- Rauf S., da Silva J., Khan A., Naveed A. 2010. Consequences of plant breeding on genetic diversity. *International Journal of Plant Breeding*, 4: 1–21, [https://www.researchgate.net/publication/283514878\\_Consequences\\_of\\_Plant\\_Breeding\\_on\\_Genetic\\_Diversity](https://www.researchgate.net/publication/283514878_Consequences_of_Plant_Breeding_on_Genetic_Diversity) (23. avg. 2024)
- Ray D., Gerber J., MacDonald G., West P. 2015. Climate variation explains a third of global crop yield variability. *Nature Communications*, 6: 5989 <https://doi.org/10.1038/ncomms6989>
- Salgotra R., Gupta B. 2015. Plant genetic resources and traditional/indigenous knowledge: Potentials and challenges. V: *Plant Genetic Resources and Traditional Knowledge for Food Security*. Springer: 1-21, [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0060-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0060-7_1)
- Salgotra R., Thompson M., Chauhan B. 2021. Unravelling the genetic potential of untapped crop wild genetic resources for crop improvement. *Conservation Genetics Resources*, 14: 109–124, <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01242-3>
- Salgotra R., Chauhan B. 2023. Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14: 174, <https://doi.org/10.3390/genes14010174>
- Singh K., Gupta K., Tyagi V., Rajkumar S. 2020. Plant genetic resources in India: management and utilization. *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii*, 24, 3: 306-314, <https://doi.org/10.18699/VJ20.622>
- Smith B. 1989. Origins of agriculture in Eastern North America. *Science*, 246: 1566–1571, <https://www.science.org/doi/10.1126/science.246.4937.1566> (8. avg. 2024)
- Smolders, H. 2006. Enhancing farmers' role in crop development: framework information for participatory plant breeding in farmer field schools. Netherlands, Centre for Genetic Resources: 60 s., <https://edepot.wur.nl/3667> (8. avg. 2024)
- Spitsbergen. 2024. Wikipedia. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Spitsbergen> (3. jun. 2024)
- Status of collections at national genebank (NGB). 2024. ICAR - NBPGR. [http://www.nbpgr.ernet.in/Research\\_Projects/Base\\_Collection\\_in\\_NGB.aspx](http://www.nbpgr.ernet.in/Research_Projects/Base_Collection_in_NGB.aspx) (3. jun. 2024)
- Svalbard. 2024. Wikipedia, <https://en.wikipedia.org/wiki/Svalbard> (2. jul. 2024)
- The facility. 2024. Svalbard global seed vault, <https://www.seedvault.no/about/the-facility/> (28. maj. 2024)
- The history. 2024. Svalbard global seed vault, <https://www.seedvault.no/about/history/> (28. maj. 2024)
- The state of the world's biodiversity for food and agriculture. 2019. Bélanger J. in Pilling D. (ur.). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*: 529 s., <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/50b79369-9249-4486-ac07-9098d07df60a/content> (8. avg. 2024)
- The storage. 2024. Crop trust, <https://www.croptrust.org/work-1/svalbard-global-seed-vault/> (28. maj 2024)

- Tomšič M. 2016. Kaj je skrito v ledenem bunkerju na koncu sveta? Slovenske novice, 29.11.2016, <https://siol.net/novice/digisvet/kaj-je-skrito-v-ledenem-bunkerju-na-koncu-sveta-430637> (2. jul. 2024)
- Tyagi R., Agrawal A. 2015. Revised genebank standard for management of plant genetic resources. The Indian Journal of Agricultural Sciences, 85, 2: 157-165, <https://doi.org/10.56093/ijas.v85i2.46437>
- Van Hintum T., Brown A., Spillane C., Hodgkin T. 2000. Core Collections of Plant Genetic Resources. Rim, International Plant Genetic Resources Institute: 48 s., [https://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/images/file/learning\\_space/technicalbulletin3.pdf](https://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/images/file/learning_space/technicalbulletin3.pdf) (8. avg. 2024)
- Zakon o kmetijstvu (ZKme-1). 2008. Uradni list RS, 45/08 (s pripombami in dopolnitvami)

## ENDOFITI KOT INOVATIVNA REŠITEV V KMETIJSTVU

Blaž Pavlič, Anže Vozelj in Tjaša Lukan

### IZVLEČEK

Z naraščanjem človeške populacije narašča tudi potreba po hrani. Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) poroča, da se je produkcija primarnih poljščin v zadnjih dvajsetih letih povečala za polovico, a se je sorazmerno povečala tudi uporaba pesticidov in dušikovih gnojil, ki imajo negativen vpliv na okolje in zdravje ljudi. V zadnjem času se kot alternativa vzpostavlja koncept trajnostnega kmetijstva, ki temelji na zaščiti rastlin pred patogenimi mikroorganizmi (MO) na okolju prijazen način. Velik potencial za naravno zaščito predstavljajo tudi endofiti, ki kolonizirajo notranjost rastlin brez negativnih učinkov nanje. V nekaterih primerih zmanjšajo vpliv abiotičnih stresov, kot so slanost, suša, preobilica vode in nedostopnost hranil, hkrati pa lahko služijo tudi kot biokontrola proti različnim patogenom. Poznamo glivne in bakterijske endofite. Navkljub vsem pozitivnim učinkom se mora stroka spoprijeti še z veliko izzivi, da bodo izdelki, ki vsebujejo endofite, enako dostopni in konkurenčni kot komercialni pesticidi in gnojila. Potrebno je zagotoviti dolg rok uporabe, enostavne metode aplikacije in učinkovito ter ugodno proizvodnjo, po drugi strani pa je o endofitih potrebno poučiti uporabnike in nadaljevati s temeljitim proučevanjem o možnih vplivih na okolje.

**Ključne besede:** trajnostno kmetijstvo, endofiti, *F. oxysporum*, *B. subtilis*, mutanti, abiotični stres, endofitske interakcije

### Endophytes as an inovative solution in agriculture

#### Abstract

As the human population grows, so does the need for food. The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) reports, that the production of primary crops has increased by half in the last twenty years, but the use of pesticides and nitrogen fertilizers, which have a negative impact on the environment and human health, has also increased proportionally. Recently, the concept of sustainable agriculture, based on protecting plants from pathogenic microorganisms (MOs) in an environmentally friendly manner, has emerged as an alternative. There is also great potential for natural protection, as endophytes colonize the interior of plants without adverse effects on them. In some cases, they reduce the impact of abiotic stresses such as salinity, drought, overabundance of water and lack of nutrient availability, while also serving as biomarkers against various parasites. We know fungal and bacterial endophytes. Despite all the positive effects, the industry still faces many challenges to ensure that products containing endophytes are as accessible and competitive as commercial pesticides and fertilisers. There is a need to ensure a long shelf life, simple application methods and efficient and cost-effective production, while on the other hand, users need to be educated about endophytes and the potential impact on the environment needs to be further study.

**Key words:** sustainable agriculture, endophytes, *F. oxysporum*, *B. subtilis*, mutants, abiotic stress, endophyte interactions

## 1 UVOD

Z naraščanjem človeške populacije narašča tudi potreba po hrani. Po ocenah Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (angl. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO) je žlahtnjenje usmerjeno v razvoj visoko tolerantnih sort, pripomoglo k povišanju pridelkov osnovnih poljščin za polovico, med leti 2000 in 2020. A vendar ima to svojo ceno, saj je ugotovljeno, da se je uporaba pesticidov med leti 2000 in 2018 povečala za kar tretjino, uporaba dušikovih gnojil pa za 58 % (Statistical Yearbook, 2022). Pesticidi in ostale okolju škodljive kemikalije imajo negativen vpliv na zdravje ljudi, zato v zadnjem času v ospredje vstopa koncept trajnostnega kmetijstva, ki si prizadeva za njihovo zmanjšano uporabo. Ta temelji na zaščiti rastlin pred patogenimi mikroorganizmi (MO) na okolju prijazen način. Velik potencial za naravno zaščito rastlin pred neugodnimi biotskimi in abiotskimi dejavniki predstavljajo tudi endofiti, posebna skupina MO, ki kolonizirajo notranjost rastlin brez negativnih učinkov nanje (Kamran in sod., 2022). Področje endofitov je dandanes že dobro raziskano. Na trgu je namreč kmetom dostopnih že nekaj izdelkov, ki vsebuje tako endofitne glive kot bakterije. Eden takšnih je RootShield, produkt podjetja BioWorks, ki vsebuje T-22 sev glive *Trichoderma harzianum*. Gliva zmanjša vpliv abiotskih stresov, kot so slanost, suša, poplave in nedostopnost hranil, hkrati pa služi tudi kot biokontrola proti različnim parazitom. Zanimivo je, da so nekateri sevi odporni na fungicide, kar omogoča učinkovito uporabo izdelkov, ki vsebujejo te seve tudi v s fungicidi obremenjeni prsti (Harman, 2024).

Navkljub vsem pozitivnim učinkom se mora stroka spoprijeti še z veliko izzivi, da bodo izdelki, ki vsebujejo endofite, enako dostopni in konkurenčni kot komercialni pesticidi in gnojila. Endofitna učinkovitost je namreč odvisna od številnih okoljskih dejavnikov. Potrebno je zagotoviti dolgi rok uporabe, enostavne metode aplikacije in učinkovito ter ugodno proizvodnjo, po drugi strani pa je treba o endofitih izobraziti porabnike (kmete) in še naprej raziskovati možne vplive na okolje (Harman, 2024).

## 2 ENDOFITI

Rastline kolonizirajo kompleksne mikrobne združbe, ki lahko njihovo rast okrepijo ali pa so za njih uničujoče. Endogene bakterije ali glive, ki kolonizirajo rastline in jim ne škodijo, imenujemo endofiti (Mengistu, 2020). Nahajajo se v številnih rastlinskih vrstah, njihovi najstarejši fosilni ostanki pa so starejši od 400 milijonov let, kar priča o njihovi prisotnosti že v času, ko so rastline začele prehajati na kopno (Kamran in sod., 2022). Večinoma na rastline nimajo vpliva, vendar nekateri vseeno vzpostavijo mutualističen odnos z gostiteljem. Endofiti od gostiteljske rastline pridobijo organske spojine, zaščito in v primeru vegetativnega razmnoževanja rastline tudi zagotovljeno razširjanje, medtem ko kolonizirana rastlina pridobi odpornost na nekatere biotske in abiotske dejavnike, kot so slanost, suša, nedostopnost hranil in paraziti (Mengistu, 2020). K endofitom prištevamo tako glive kot bakterije.

## 2.1 BAKTERIJSKI ENDOFITI

Bakterijski endofiti so endosimbionti, ki naseljujejo inter ter intracelularne dele rastlin vključno s cvetovi, plodovi in semeni. Njihovo število se med gostitelji in tipi tkiv razlikuje in variira med  $9$  in  $100 \times 10^9$  bakterij na gram tkiva. Praviloma je gostota bakterij višja v podzemnih delih rastlin, vendar se lahko zaradi migracij v liste razmerje tudi spreminja. Na gostoto in razporejenost bakterijskih endofitov po rastlini vplivajo biotski in abiotski dejavniki (Kamran in sod., 2022). Najpogostejši endofitni predstavniki so *Cronobacter sakazakii*, *Pseudomonas granadensis*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus velezensis* ter drugi (Adeleke in sod., 2021)

## 2.2 GLIVNI ENDOFITI

Večina rastlin je v simbiozi z mikoriznimi ali endofitnimi glivami. Podobno kot bakterijski endofiti, tudi endofitne glive naseljujejo podzemne in nadzemne dele rastlin. Lahko se razširjajo horizontalno, kar pomeni direkten ali indirektnen prenos glive med rastlinami iste generacije ali vertikalno, kjer gre za prenos iz gostiteljske rastline na njene potomce. Glede na nabor gostiteljev in načina razširjanja se endofitne glive delijo v 4 razrede. Prvi razred zastopajo glive iz družine *Clavicipitaceae*, kjer sta prisotna tako horizontalni kot vertikalni prenos. Drugi razred predstavlja endofite, ki naseljujejo podzemne in nadzemne dele rastlin ter se razširjajo horizontalno in vertikalno. Tretji razred zajema glive s horizontalnim prenosom, ki kolonizirajo nadzemne dele. Zadnji, četrti razred, vključuje glive, ki se nahajajo v podzemnih delih in se prenašajo horizontalno (Kamran in sod., 2022). Najpogostejši predstavniki glivnih endofitov so *Aspergillus oryzae*, *Acaulospora colombiana*, *Sarocladium strictum*, *Penicillium olsonii*, *Anthracyctis floculosa* in ostali (Adeleke in sod., 2021).

## 3 MEHANIZMI KOLONIZACIJE

Ne glede na to ali rastlino kolonizirajo patogeni ali koristni MO, so mehanizmi za vstop v rastlino, razširjanje in načini izoginitve rastlinski imunosti, podobni. Na uspešno naselitev MO vplivajo tip tkiva, genotip rastline, vrsta in starost rastlin ter ostali okoljski dejavniki. Še posebej pomemben je genotip MO, ki med drugim kodira pomembne kolonizacijske lastnosti, kot so zmožnost nastanka biofilma, plavalna gibljivost in specifični encimi (Mengistu, 2020).

Nekateri endofiti so prisotni že v kalečih semenih. Vegetativno razmnoževanje omogoča enostavno kolonizacijo rastline, druge vrste MO, med njimi tudi endofite, pa privlačijo koreninski izločki, kot so flavnoidi, sladkorji, aminokisline ipd. Možne točke vstopa za endofite so razpoke, ki se nahajajo ob stranskih koreninah ali coni elongacije. Glivni endofiti pred vstopom z deacetilacijo zamaskirajo svoje hitozanske oligomere, da jih rastlinski receptorji za prepoznavanje vzorcev PRR (angl. Pattern recognition receptors) ne zaznajo. Podobno bakterijski endofiti odvržejo svoje z mikrobi povezane molekularne vzorce MAMPS (angl. microbe associated molecular patterns) in s tem onemogočijo prepoznavo rastlinskih receptorjev za prepoznavanje vzorcev PRR (Kamran in sod., 2022). Po uspešnem vstopu v rastlino, se MO nahaja v novem okolju, kjer mora preživeti oksidativni stres in druge neugodne

vplive. *Enterobacter* sp. na primer za premagovanje oksidativnega okolja sintetizira encime, kot so katalaza, superoksid dismutaza in hiperoksid reduktaza. V nadaljevanju sledi sistematična kolonizacija, ki ne zajema vseh tkiv in organov, saj so endofiti tkivno in organsko specifični (Mengistu, 2020).

### 3.1 IMUNSKI ODZIV RASTLINE

Rastlinski odziv na vdor patogenih MO se razlikuje od vdora endofitnih MO (Mengistu, 2020). Rastlina se na okužbo patogenov odzove z vzorci posredovano imunostjo PTI (angl. Pattern triggered immunity) ali z efektorji posredovano imunostjo ETI (angl. Effector triggered immunity). Na začetku rastlina s svojimi PRR zazna mikrobne MAMP oz. patogene PAMP molekulske vzorce (angl. Pathogen-associated molecular patterns) in s tem sproži PTI. Če so patogeni uspešni kolonizatorji, sledi sproščanje njihovih efektorjev, ki se vmešajo v PTI odziv in omogočijo prosto pot po rastlini. V primeru *F. oxysporum* so najbolj znani mehanizmi odgovora na PTI z efektorji Avr2, kar vodi v inhibicijo sinteze reaktivnih kisikovih zvrsti ROS (angl. reactive oxygen species), nalaganje kaloze in MAPK fosforilacijo. Če pride do uspešne prepoznavne efektorjev z rastlinskimi NB-LRR receptorji (angl. Nucleotide-binding site, Leucine-rich repeat), se sproži še z efektorji posredovana imunost ETI (angl. Effector triggered immunity), ki pogosto predstavlja prag za induciranje hipersenzitivne celične smrti (de Lamo in Takken, 2020).

V primeru endofitnega seva *F. oxysporum* Fo47 so dokazali, da je poleg ustaljenih imunskih odzivov kot sta inducirana sistemska odpornost ISR (angl. Induced systemic resistance) in sistemska pridobljena odpornost SAR (angl. Systemic acquired resistance), delujočih v poganjkih, prisoten še dodaten mehanizem z endofiti posredovane odpornosti, imenovan EMR (angl. Endophyte-mediated resistance), ki je omejen na korenine. Povzročijo ga lahko le endofiti, saj v primerjavi s patogeni ne vsebujejo kromosoma patogenosti. EMR med drugim zajema akumulacijo PR-5 in  $\beta$ -glukanaze v ksilemu, sekrecijo fenolnih spojin, ki so z ROS udeležene v lignifikaciji celičnih sten in nalaganju kaloze ter induciranju celičnih smrti. Slednje so se izkazale za ključno gonilo pri vzpostavitvi EMR, saj endofitne mutante *F. oxysporum*, ki ne povzročajo celičnih smrti, posledično ne vzbudijo EMR odziva (de Lamo in Takken, 2020). de Lamo in Takken sta v študiji iz leta 2020 pokazala, da EMR zmanjša biomaso patogenega seva *F. oxysporum* Fol007, med drugim pa omeji tudi njegovo napredovanje po prevodnih tkivih

### 3.2 ENDOFITNO DELOVANJE NA RASTLINO IN BLAŽENJE ABIOTSKEGA STRESA

Endofiti lahko svoje gostiteljske rastline pomagajo varovati pred patogeni z direktno vpletenostjo v produkcijo sekundarnih metabolitov in protimikrobnih substanc, kot so antibiotiki, siderofori in hidrolitični encimi ter z indirektno kot tekmeci patogenov za prostor in hranila. Prav tako je znano, da so udeleženi v procesih SAR in ISR, saj imajo nekatere vrste povišano izražanje fitohormonov (salicilna kislina in jasmonska kislina), ki sprožijo prej omenjena odziva proti patogenom. Med drugim imajo rastline, ki so naseljene z endofiti, zmožnost nalaganja polimerov, kot so celuloza, pektin in kaloza na ranljiva mesta, s čimer

zmanjšajo svojo občutljivost in pridobijo odpornost na nekatere biotske in abiotske dejavnike, kot so slanost, suša, nedostopnost hranil in paraziti (slika 1) (Mengistu, 2020; Kamran in sod., 2022).

### 3.2.1 Temperatura

Temperatura je najpogostejši abiotski stres, ki prizadene rastline in hkrati eden najhitreje spreminjajočih se okoljskih dejavnikov. Glavne poškodbe, ki jih povzroča, so spremembe v membranski aktivnosti in transpiraciji, zmanjšana intenzivnost fotosinteze, nefunkcionalni encimi in celične delitve. Nekateri bakterijski endofiti lahko ublažijo vpliv mraza s kopičenjem metabolitov, kot so prolin, škrob in fenolne spojine. Spet drugi kljubujejo ekstremnim razmeram s povečano sintezo na vročino in mraz odpornih proteinov, kjer so ključni šaperoni in struktura proteinov (Kamran in sod., 2022). Khan in sod. (2020) so poročali o termotolerantnem sevu *Bacillus cereus* SA1, ki je s povišanjem koncentracije antioksidativnih encimov in spremembo hormonalnega ravnovesja zmanjšal vročinski stres pri soji. V nekaterih primerih pa je odnos med rastlino in endofiti pomemben za oba partnerja. Takšen primer predstavljata gliva *Curvularia protuberata* in trava *Dichanthelium lanuginosum*, ki individualno ne moreta rasti pri temperaturah nad 38 °C, v simbiotskem odnosu pa tolerirata temperature do 65 °C. Ključen del simbioze predstavlja mikovirus CThTV (*Curvularia* thermal tolerance virus), brez katerega simbiotska gliva in trava pri višjih temperaturah prav tako odmre (Kamran in sod., 2022).

### 3.2.2 Slanost

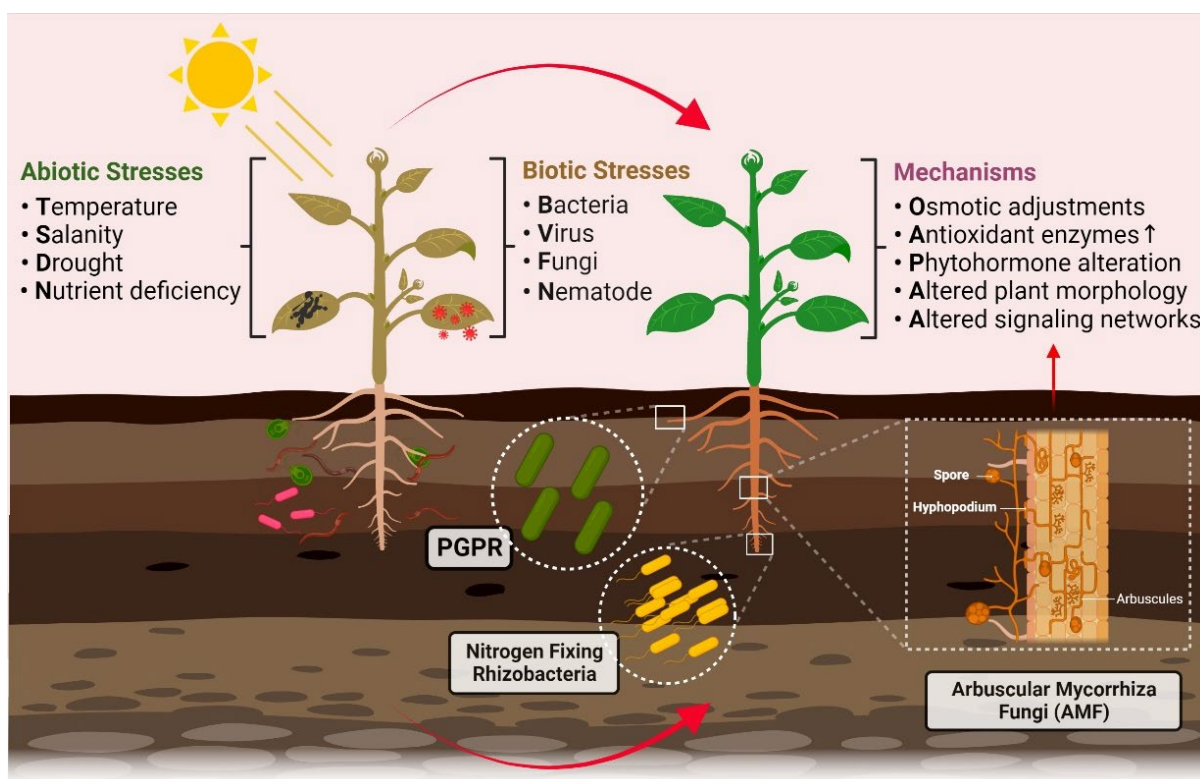
Za blažitev stresa, ki ga povzroča sol, endofiti v rastlinah vršijo različne mehanizme. Ena izmed načinov z endofiti posredovane tolerance za slanost sta kopičenje visokih koncentracij organskih osmolitov in reprogramiranje antioksidativnih obrambnih sistemov ter hormonskega profila (Kamran in sod., 2022). Bakterijski endofit *Bacillus subtilis* poviša toleranco pri repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) s simultanim znižanjem ekspresije visoko-afinitetnih kalijevih transporterjev v koreninah in povišanjem v vršičkih, kar se odraža na manjšem privzemu natrijevih ionov (Zhang in sod., 2008). Nekateri drugi endofiti pa privzem natrija upočasnjujejo s sekrecijo eksopolisaharidov, ki že v koreninah vežejo katione (predvsem natrijeve) in tako preprečijo njihovo širjenje po rastlini (Nautiyal in sod., 2013).

### 3.2.3 Suša

Suša je opisana kot obdobje, ko organizmu ni dostopne dovolj vode za normalen razvoj. Endofiti lahko odzive rastlin na sušo tudi spreminjajo. Lahko proizvajajo fitohormone, ki pospešujejo rast in razvoj rastlin ali v boju proti oksidativnemu stresu sintetizirajo antioksidativne obrambne encime, ki pomagajo rastlini. Suša močno načne tudi mikrobno raznolikost rizosfere in koreninske endosfere, medtem ko mikrobna diverziteteta v okoliški zemlji navkljub suši ostane enaka, kar nakazuje na možno tesno izmenjavo hranil in ostalih snovi v obdobju suše med mikrobnimi združbami in rastlino (Kamran in sod., 2022).

### 3.2.4 Pomanjkanje hranil

Pomanjkanje hranil je definirano kot suboptimalna dostopnost potrebnih snovi ali pa prevelika, toksična količina mikrohranil, ki ključno vpliva na rastline. Eden največjih evolucijskih izzivov kopenskih rastlin je bilo pridobivanje netopnih hranil iz prsti. Kot odgovor na to so se vzpostavili simbiotski odnosi z mikroorganizmi, ki lahko s svojo površino (npr. hife) in zmožnostjo transformacije netopnih hranil v topne, pomagajo rastlinam. Choi in sod. (2008) navajajo, da *Pseudomonas* sp. s spreminjanjem sinteze giberelinske kisline omogoča večjo dostopnost fosfatov v rižu. Drug primer so *Rhizoscyphus* sp., izolirani iz rudniške prsti, ki so zaradi povečanja absorpcije kalija v vršičkih in zmanjšane absorpcije bakra, cinka in niklja v korenine, povečali rast *C. barbinervis*. Zaradi nekaterih ugodnih vplivov bi karakterizacija endofitov iz rudniških območij lahko pomagala najti nove vrste, ki bi podprle razvoj odpornejših rastlin (Kamran in sod., 2022).



Slika 1: Mehanizmi, ki jih rastline uporabljajo za blaženje abiotkega in biotskega stresa (Kamran in sod., 2022)

### 4 PRIMERJAVA S PATOGENI

Čeprav endofiti v veliko pogledih promovirajo rast, so odnosi med MO in rastlinami zelo občutljivi na spremembe v okolju. MO, ki je bil pod določenimi pogoji endofit, je lahko v drugem gostitelju ali pri drugih pogojih patogen. Ta preskok lahko sprožijo pomanjkanje in neravnovesje v izmenjavi hranil med rastlino in MO ali daljše obdobje ekstremnega vremena. V primeru inokulacije večjega števila različnih endofitov je izjemno pomembna tudi njihova kombinacija. Rezultati so pokazali, da so kompatibilni endofiti inokulirani na čičeriko dosegli sinergistični učinek na rast rastline. Dodajanje nekompatibilnih MO pa lahko ima na rastlino

škodljiv vpliv, zato se pred aplikacijo svetuje opravljanje testa kompatibilnosti (Kamran in sod., 2022).

Najpomembnejša faktorja za izražanje določenega življenjskega stila sta genotip endofita in gostiteljske rastline (Mengistu, 2020). Leta 2010 so poročali o primeru seva *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), ki je imel specifičen kromosom patogenosti. Ta se od jedrnih kromosomov loči po visoki vsebnosti transpozonov in nizki frekvenci kodirajočih genov ter visoki vsebnosti efektorjev patogenosti. S horizontalnim prenosom kromosoma patogenosti iz Fol na nepatogeni sev Fo47 je tudi slednji postal patogen za paradižnik. Kasneje so z eliminacijo kromosoma patogenosti pri Fol in sledeči izgubi patogenosti dognali, da je le-ta povezana z omenjenim kromosomom. Genske analize so pokazale tudi, da ta kromosom nosi zapis za efektorje – vrstno specifične virulenčne proteine, ki jih gliva izloča v paradižnikov ksilem. Gre za SIX efektorje (angl. Secreted in xylem effectors) (de Lamo in Takken, 2020).

#### 4.1 *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* je gliva, ki sodi med askomicete. Njeni številni sevi so splošno razširjeni v prsti in pogosto saprofitski. Nekateri od njih, kot sta Fo47 in CS-20, varujejo rastline pred koreninskimi patogeni, čeprav so ti v manjšini, saj je večina sevov asimptomatskih. Po drugi strain *F. oxysporum* sodi med 10 najbolj uničujočih glivnih patogenov na svetu. Bolezen venenja in gnitje korenin sta posledici, ki najresneje prizadeneta poljščine. Patogenost *F. oxysporum* je rastlinsko specifična, kar pomeni, da sevi tipično okužijo le rastline posamezne vrste. Pojasnilo za pojav vrstno-specifičnih sevov morda leži v ekstenzivnem monokulturnem kmetijstvu. Zanimivo je, da kot alternativo kemijskim agentom proti patogenemu *F. oxysporum* uporabljajo kar njegove nepatogene seve, ki zmanjšajo pojavnost bolezni. Na podlagi ozkega nabora patogenov v posameznih gostiteljih, so bili patogeni sevi razvrščeni v neformalno taksonomsko skupino *formae speciales* (de Lamo in Takken, 2020; Redkar in sod., 2022).

Tudi kolonizacija korenin se med patogenim in endofitnim *F. oxysporum* močno razlikuje. V obeh primerih se začne z germinacijo spor in rastjo micelija, ki ju sprožijo izločki korenin. Na tej stopnji razlike med endofitnimi in patogenimi *F. oxysporum* še niso zaznavne, saj oboji naselijo korteks. Razlike se kažejo v biomasi, kjer patogeni sev prevladuje. To nakazuje na boljše kolonizacijske zmožnosti patogenov v zgodnjih fazah naseljevanja. Poleg biomase se razlikujejo še v razširjenosti, saj lahko načeloma le patogeni vstopajo v prevodna tkiva in tako kolonizirajo še nadzemne dele rastlin. V manjši meri lahko kolonizirajo tudi odporne rastline. Tudi povečano izražanje encimov za razkrajanje celičnih sten pri patogenih smiselno dopolni dejstvo o njihovi večji razširjenosti po rastlinah. Študija iz leta 2020 je med drugim proučevala rastlinski odziv (do 20 ur) na endofitni in patogeni sev *Fusarium oxysporum*. Zanimiva razlika se je pokazala v indukciji celične smrti, kjer je endofitni sev po 14 h induciral več celičnih smrti kot patogen. Prav tako je endofit v rastlini sprožil več tvorbe ROS in več vdora  $\text{Ca}^{2+}$  v celice kot patogen (de Lamo in Takken, 2020).

## 4.2 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* sodi med po Gramu pozitivne bakterije, ki jo lahko zasledimo na koreninah številnih rastlin. Zaradi stimulacije rasti, se pogosto uporablja kot biognojilo, saj z izločanjem citokinskih hormonov in hlapnih snovi spreminja ravnovesje rastlinskih hormonov. Posredno lahko sproči ISR, kar rastlini zagotavlja zaščito pred širokim naborom patogenov (Gallegos-Monterrosa in sod., 2016). Med letoma 1993 in 1997 je potekala raziskava, kjer so rastline krompirja izpostavili različnim sevom *Bacillus subtilis* in patogenoma *Rhizoctonia solarii* ter *Streptomyces scabies*. Tako pri poljskih poskusih kot poskusih v rastlinjaku so dokazali, da je v primeru obeh patogenov aplikacija *Bacillus subtilis* zmanjšala pojavnost bolezni. Pridelek krompirjevih gomoljev je bil v primerjavi z netretiranimi rastlinami večji (Schmiedeknecht in sod., 1998).

*B. subtilis* je dobro poznan po zmožnosti diferenciacije dela bakterijske populacije v številne celične tipe. Poleg spor lahko celice postanejo kompetentne ali gibljive, lahko sintetizirajo ekstracelularni matriks in encime ter toksine, ki jim omogočajo napad na sosednje celice (Lopez in sod., 2008). Zelo pomembna je tudi lastnost zaznavanja kvoruma, ki bakterijam na podlagi gostote celic omogoča medcelično komunikacijo. Pri *B. subtilis* zaznava kvoruma pomeni direkten in indirekten nadzor nad sintezo skupnih snovi in sodelovanjem med posameznimi celicami. Dejstvo, da do sedaj še niso izolirali mutante *B. subtilis*, ki bi imela okvarjeno zaznavanje kvoruma, namiguje, da je zmožnost medcelične komunikacije ključna za preživetje. (Kalamara in sod., 2018).

Mutant *B. subtilis* 168 je nepatogen, za triptofan auksotrofen sev z dobro raziskanim genetskim in fermentativnim ozadjem (Wu in sod., 2019). Z mutagenezo X-žarkov sta ga pridobila Paul Burkholder in Norman Giles, univerzitetna botanika iz Yale-a. Zaradi zmožnosti učinkovitega privzemanja DNA je pogosto uporabljen tudi kot modelni organizem za gensko manipulacijo. Ne sintetizira surfaktina in eksopolisaharidov (EPS), kar se kaže v njegovih majhnih in brezobličnih kolonijah ter nezmožnosti ustvarjanja biofilmov (Gallegos-Monterrosa in sod., 2016; Wu in sod., 2019).

### 4.2.1 PS-216 $\Delta$ *srfA*

Surfaktin je amfifatični ciklični lipopeptid z molekulsko formulo  $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ . Je eden bolj preučenih sekundarnih metabolitov, ki primarno kot biosurfaktant znižuje površinsko napetost in s tem omogoča rojenje *B. subtilis* (Rahman in sod., 2021). Pomembno vlogo igra tudi pri tvorbi biofilmov, kolonizaciji korenin in indukciji rastlinskega obrambnega sistema. Povpraševanje po njegovih novih izomerah zaradi biotehnološke uporabnosti in širokega spektra delovanja narašča. Na njegovo izražanje vplivajo okoljski dejavniki, kot so vir ogljika, temperatura in pH. Sinteza surfaktina pri *B. subtilis* je odvisna od signalnih molekul, ki ob dovolj visoki koncentraciji aktivirajo mnoge kaskadne reakcije povezane z regulacijo sporulacije in kompetence. Geni, ki ga kodirajo, obsegajo 25 kb velik surfaktinski operon (Vozelj, 2022).

#### 4.2.2 PS-216 $\Delta spo0A$

Spo0A je eden glavnih transkripcijskih regulatorjev pri *B. subtilis*, čigar aktivnost je odvisna od fosforilacije. Vpliva na več kot 500 genov, od tega je 121 takšnih, na katere verjetno vpliva direktno (Lopez in sod., 2008). Ti geni so organizirani v 24 operonov in 30 samostojnih genov. Od tega jih je 40 pod pozitivno 81 pa pod negativno kontrolo spo0A (Molle in sod., 2003). Tudi kot regulator je uravnavan na transkripcijskem in posttranslacijskem nivoju s 5 histidin kinazami. Njegova regulacija je kompleksna in vsebuje številne zanke. Uravnava transkripcijo genov pomembnih za gibanje, sporulacijo in produkcijo matriksa. Za sprožitev sporulacije je potrebna višja raven Spo0A, za ekspresijo genov matriksa pa nižja (Lopez in sod., 2008).

#### 4.2.3 PS-216 $\Delta tasA$

TasA je funkcionalen amiloidni protein, ki zunajceličnemu matriksu v bakterijskem biofilmu zagotavlja strukturno podporo v obliki vlaken. Podaljšuje življenjsko dobo ter izboljšuje kolonizacijo, saj je najpomembnejši bakterijski faktor med primarno pritrditvijo in nadaljnjo kolonizacijo rastline. Pri bakterijah, ki imajo izbit *tasA* gen, so opazili zgodnjo aktivacijo sekundarnega metabolizma in akumulacijo poškodovane celične vsebine. Manjko funkcionalnega proteina TasA vodi v številne fiziološke spremembe, verjetno sprožene zaradi razlik v stabilnosti in dinamiki celične membrane in s tem zmanjšan bakterijski fitnes (Cámara-Almirón in sod., 2020).

#### 4.2.4 PS-216 $\Delta eps$

Eps operon, ki regulira 15 genov, kodira eksopolisaharide, ki so ključni pri formaciji biofilmov. Uravnavan je s Spo0A transkripcijskim faktorjem in SinI ter SinR regulatornima proteinoma, ki sta si antagonistična. SinI se izrazi le v subpopulacijah celic, kjer je Spo0A aktiviran in inhibira SinR z direktno vezavo nanj ter tako omogoči izražanje *eps* genov. Zrel biofilm je sestavljen iz daljših celic, ki so med seboj močno povezane. Mutante *eps* genov so pri *B. subtilis* 3610 pokazale upad kompleksnosti pelikule in ogljikovodikov v biofilmih (Lopez in sod., 2008; Marvasi in sod., 2010; Nagórska in sod., 2010;).

### 5 INTERAKCIJE MED ENDOFITI

Večino bakterij, ki ima na okoliške MO pozitiven vpliv, lahko najdemo v rizosferi, nekatere pa lahko uspevajo tudi kot endofiti. Slednje lahko poleg biostimulacije rastline, vstopajo tudi v hife endofitnih gliv in tako včasih ključno vplivajo na njihovo preživetje. Hife so hranilna niša za razvoj bakterij, te pa za glivo predstavljajo zalogo vitaminov, dušika, fosforja, sladkorjev in sekundarnih metabolitov. Primer interakcije med endofiti so gliva *Serendipita indica* in njene simbiotske bakterije. *S. indica* med drugim v rastlini sproži ISR, vpliva na koncentracijo antioksidantov in mobilizira hranila. Zanimivo je tudi, da že gliva sama gosti endofitno endobakterijo *Rhizobium radiobacter* (del Barrio-Duque in sod., 2019).

del Barrio-Duque je s sodelavci (2019) opravil eksperiment, s katerim so na podlagi rasti micelija določili tip interakcije med *S. indicum* in simbiotskimi bakterijami. Na sredino PDA

gojišča so na 1 cm<sup>2</sup> razmazali bakterije, nanjo pa položili košček aktivnega micelija glive. Kontrolo je predstavljala gliva, ki je na gojišču rasla sama. Petrijevke so 13 dni inkubirali v temi pri 26 °C in nato s programom ImageJ izmerili površino micelija. Če je gliva v prisotnosti bakterije zrasla 90 % manj kot kontrola, so to označili za popolno inhibicijo. Zmanjšanje rasti med 20 in 90 % v primerjavi s kontrolo je pomenilo negativno interakcijo, 20 % povečanje ali zmanjšanje rasti pa nevtralno interakcijo. Za pozitivno interakcijo se je smatrala rast, ki je bila v primerjavi s kontrolo višja za vsaj 20 %. Ugotovili so, da je vsako interakcijo zastopala približno četrtnina preiskanih bakterij. Najbolj neugodne za rast glive so se izkazale družine *Bacillaceae*, *Enterobacteraceae* in *Burkholderiaceae*. Družina, ki je izkazala najbolj pozitivno interakcijo z glivo pa je bila *Mycobacteriaceae*. Zanimivo je dejstvo, da izbrani sevi rodu *Mycolicibacterium* pozitivno vplivajo na *S. indica*, ne promovirajo pa rasti patogene *F. oxysporum*. V nekaterih primerih so v primerjavi s kontrolo rast hif celo zavirali (del Barrio-Duque in sod., 2019).

Genska analiza izbranih sevov rodu *Mycolicibacterium* je pokazala, da bi na pozitivno interakcijo s *S. indica* lahko vplivala prisotnost številnih genov, ki kodirajo vitamine. Poleg tega je analiza glivnega genoma pokazala manjko genov, ki regulirajo dušikov metabolizem, a so po drugi strani v vseh izbranih simbiotskih bakterijskih sevih našli gene za amonijeve transporterje, nitrit ter nitrat reduktaze, glutamin sintaze in trehaloze, kar ravno pokrije omenjeni primanjkljaj *S. indica* (del Barrio-Duque in sod., 2019).

## 6 UPORABA ENDOFITOV

Endofiti, predvsem bakterijski, igrajo pomembne vloge na številnih področjih. V farmaciji jih lahko zasledimo kot proizvajalce bioaktivnih in antimikrobnih sestavin, prav tako pa posedujejo potencial za bioremediacijo. V prehrambeni industriji se lahko uporabijo za izboljšanje fermentacijskih procesov ter izboljšanje varnosti in hranilne vrednosti živil. Velik potencial pa imajo tudi na področju okoljske remediacije in razkroja barvil v tekstilni industriji. Področje, ki veliko obeta in je za prihodnost ključnega pomena pa je kmetijstvo (Muhammad in sod., 2024).

V zadnjih letih so bile raziskave naravnane v iskanje endofitov, ki bi lahko izboljšali pridelek na okolju prijazen način. Poleg tega se osredotočajo tudi na pomen endofitov kot naravne biokontrole proti škodljivcem in zmožnosti povečanja odpornosti rastlin proti stresu. Posledično se je močno začela uveljavljati tudi ideja o trajnostnem pristopu v kmetijstvu, ki se osredotoča na ohranjanje narave in naravnih virov ter zmanjšanje uporabe sintetičnih dodatkov. *Azospirillum brasilense* na primer promovira rast in v prsti pretvori nedostopen dušik v dostopnega. *Bacillus* in *Pseudomonas* pretvorita fosfor v dostopno obliko in tako preprečita odpadanje cvetov, kar posredno zmanjša uporabo dodatkov, ki vsebujejo fosfor, prav tako pa vzpodbujata rast mikoriznih gliv. *B. subtilis* je zaradi prilagodljivosti uporaben kot biokontrola pred boleznimi. Izjemno pomembne zmožnosti nekaterih endofitov pa so tudi izboljšanje učinkovitosti porabe vode, ohranjanje rodovitnosti zemlje in biodiverzitete ter povečanje učinkovitosti izrabe hranil (Muhammad in sod., 2024).

## 7 ZAKLJUČEK

Na trgu je pridelovalcem dostopnih že nekaj izdelkov, ki vsebuje tako endofitne glive kot bakterije. Eden takšnih je RootShield, produkt podjetja BioWorks, ki vsebuje T-22 sev glive *Trichoderma harzianum*. Gliva zmanjša vpliv abiotičnih stresorjev kot so slanost, suša, preobilica vode in nedostopnost hranil, hkrati pa služi tudi kot biokontrola proti različnim parazitom. Zanimivo je, da so nekateri sevi odporni na fungicide, kar omogoča učinkovito uporabo izdelkov, ki vsebujejo te seve tudi s fungicidi obremenjeni prsti (Harman, 2024).

Navkljub vsem pozitivnim učinkom se mora stroka spoprijeti še z veliko izzivi, da bodo izdelki, ki vsebujejo endofite, enako dostopni in konkurenčni kot komercialni pesticidi in mineralna gnojila. Potrebno je zagotoviti dolg rok uporabe, enostavne metode aplikacije in učinkovito ter ugodno proizvodnjo, po drugi strani pa je o endofitih potrebno poučiti uporabnike in v prihodnje preučiti možne dolgoročne vplive na okolje (Muhammad in sod., 2024).

## 8 VIRI

- Adeleke B. S., Babalola O. O. 2021. The endosphere microbial communities, a great promise in agriculture. *International Microbiology*, 24, 1: 1-17, <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00140-2>
- Cámara-Almirón J., Navarro Y., Díaz-Martínez L., Magno-Pérez-Bryan M. C., Molina-Santiago C., Pearson J. R., de Vicente A., Pérez-García A., Romero D. 2020. Dual functionality of the amyloid protein TasA in *Bacillus* physiology and fitness on the phylloplane. *Nature communications*, 11, 1: 1859, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15758-z>
- Choi O., Kim J., Kim J. G., Jeong Y., Moon J. S., Park C. S., Hwang I. 2008. Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology*, 146, 657, 10.1104/pp.107.112748
- De Lamo F. J., Takken F. L. 2020. Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11, 37, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00037>
- del Barrio-Duque A., Ley J., Samad A., Antonielli L., Sessitsch A., Compant S. 2019. Beneficial Endophytic Bacteria-Serendipita indica Interaction for Crop Enhancement and Resistance to Phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2888, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02888>
- Statistical Yearbook. 2022. World Food and Agriculture. Rome: 365 s. <https://doi.org/10.4060/cc2211en>
- Gallegos-Monterrosa R., Mhatre E., Kovács Á. T. 2016. Specific *Bacillus subtilis* 168 variants form biofilms on nutrient-rich medium. *Microbiology*, 162, 11: 1922-1932, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000371>
- Harman G. E. 2024. Integrated benefits to agriculture with *Trichoderma* and other endophytic or root-associated microbes. *Microorganisms*, 12, 7: 1409, <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071409>
- Kalamara M., Spacapan M., Mandic-Mulec I., Stanley-Wall N. R. 2018. Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond. *Molecular microbiology*, 110, 6: 863-878, <https://doi.org/10.1111/mmi.14127>

- Kamran M., Imran Q. M., Ahmed M. B., Falak N., Khatoon A., Yun B. W. 2022. Endophyte-mediated stress tolerance in plants: A sustainable strategy to enhance resilience and assist crop improvement. *Cells*, 11, 20: 3292, <https://doi.org/10.3390/cells11203292>
- Khan M. A., Asaf S., Khan A. L., Jan R., Kang S. M., Kim K. M., Lee I. J. 2020. Thermotolerance effect of plant growth-promoting *Bacillus cereus* SA1 on soybean during heat stress. *BMC Microbiology* 20, 175, 10.1186/s12866-020-01822-7
- Lopez D., Vlamakis H., Kolter R. 2008. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews*, 33, 1: 152-163, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00148.x>
- Marvasi M., Visscher P. T., Casillas Martinez L. 2010. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS microbiology letters*, 313, 1: 1-9, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02085.x>
- Mengistu A. A. 2020. Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism. *International Journal of Microbiology*, 1: 6927219, <https://doi.org/10.1155/2020/6927219>
- Molle V., Fujita M., Jensen S. T., Eichenberger P., González-Pastor J. E., Liu J. S., Losick R. 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 50, 5: 1683-1701, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03818.x>
- Muhammad M., Wahab A., Waheed A., Mohamed H. I., Hakeem K. R., Li L., Li W. J. 2024. Harnessing bacterial endophytes for environmental resilience and agricultural sustainability. *Journal of Environmental Management*, 368, 122201, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.122201>
- Nagórska K., Ostrowski A., Hinc K., Holland I. B., Obuchowski M. 2010. Importance of eps genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *Journal of applied genetics*, 51: 369-381, <https://doi.org/10.1007/BF03208867>
- Nautiyal C. S., Srivastava S., Chauhan P. S., Seem K., Mishra A., Sopory S. K. 2013. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66: 1-9, 10.1016/j.plaphy.2013.01.020
- Rahman F. B., Sarkar B., Moni R., Rahman M. S. 2021. Molecular genetics of surfactin and its effects on different sub-populations of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Reports*, 32: e00686, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00686>
- Redkar A., Sabale M., Zuccaro A., Di Pietro A. 2022. Determinants of endophytic and pathogenic lifestyle in root colonizing fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 67: 102226, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102226>
- Schmiedeknecht G., Bochow H., Junge H. 1998. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105, 4: 376-386, <https://www.jstor.org/stable/43215255>
- Vozelj A. 2022. Moduliranje sinteze protimikrobnih učinkovin pri bakteriji *Bacillus subtilis*: magistrsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta
- Zhang H., Kim M. S., Sun Y., Dowd S. E., Shi H., Pare P. W. 2008. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 737-744, <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0737>
- Wu Q., Zhi Y., Xu Y. 2019. Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic engineering*, 52: 87-97, <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.11.004>