

Primjena CRISPR/Cas9 tehnologije u vertikalnoj poljoprivredi

Krajina, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:283508>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-03**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Filip Krajina

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Primjena CRISPR/Cas9 tehnologije u vertikalnoj poljoprivredi

Završni rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Filip Krajina

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer: Bilinogojstvo

Primjena CRISPR/Cas9 tehnologije u vertikalnoj poljoprivredi

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, član
3. dr.sc. Sunčica Kujundžić, član

Osijek, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Završni rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Bilinogojstvo

Filip Krajina

Primjena CRISPR/Cas9 tehnologije u vertikalnoj poljoprivredi

Sažetak:

Završni rad prikazuje aktualno stanje CRISPR/Cas9 tehnologije, osnovne postavke i principe uzgoja u sustavu vertikalnih farmi te njihovu interakciju u vidu pregleda objavljenih znanstvenih istraživanja uređivanja genoma CRISPR/Cas9 tehnologijom u svrhu dobivanja usjeva naj pogodnih za vertikalni sustav uzgoja. Detaljnije, u radu su prikazane prednosti, tehnički i legalni problemi, osnove načina funkcioniranja te moguće implikacije CRISPR/Cas9 tehnologije, zajedno sa ključnim detaljima funkcioniranja vertikalnih farmi. Zbog dostupnosti literature, primjena CRISPR/Cas9 tehnologije u svrhu određivanja fenotipa sa svojstvima pogodnim za vertikalni uzgoj uvelike je prikazana na usjevima voća porodice Solanaceae (rajčica).

Ključne riječi: CRISPR/Cas9, vertikalna poljoprivreda, uređivanje genoma

Broj stranica: 21, Broj tablica: 1, Broj grafikona: 1, Broj slika: 9, Broj literaturnih navoda: 17

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

BSc Thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek

Undergraduate university study Agriculture, course Plant Production

Filip Krajina

Application of CRISPR/Cas9 technology in vertical farming

Summary:

BSc thesis presents the current state of CRISPR/Cas9 technology, basic elements of vertical farming production systems and their interaction in form of reviews of credible published research literature on topic of application of CRISPR/Cas9 technology in purpose of creating most favorable crops for vertical farming production systems. More specifically, this BSc thesis presents advantages, technical and legal problems, mechanism fundamentals and possible implications of CRISPR/Cas9 technology, together with key operating details of vertical farming systems. Because of the limited literature availability, application of the CRISPR/Cas9 technology in purpose of phenotype determination most suitable for vertical farming, is mostly presented on fruit crops of the Solanaceae family (tomato).

Key words: CRISPR/Cas9, vertical farming, genome editing

Number of pages: 21, Number of tables: 1, Number of figures: 10, Number of references: 17

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2.1. Enzimi i njihove funkcije u CRISPR/Cas sustavu.....	2
2.2. Metoda modifikacije DNA korištenjem CRISPR/Cas9 tehnologije.....	3
2.3. Prednosti CRISPR/Cas9 metode nad drugim metodama modificiranja DNA	5
2.4. CRISPR/Cas9 i zakonska regulativa.....	6
3. VERTIKALNA POLJOPRIVREDA	8
4. USPJEŠNE VERTIKALNE FARME U SVIJETU	10
5. IMPLIKACIJA I UTJECAJ CRISPR/Cas9 TEHNOLOGIJE NA KULTURE UZGAJANE U VERTIKALNOM SUSTAVU UZGOJA	13
5.1. CRISPR/Cas9 i ubrzano modificiranje usjeva voća porodice Solanaceae za vertikalnu poljoprivredu.....	13
6. CRISPR/Cas9 TEHNOLOGIJA U UNAPRJEĐIVANJU DRUGIH USJEVA.....	19
7. BUDUĆNOST CRISPR/Cas9 TEHNOLOGIJE U VERTIKALNOJ POLJOPRIVREDI	21
8. ZAKLJUČAK.....	23
9. POPIS LITERATURE.....	24

1. UVOD

Uz konstantan porast ljudske populacije sukladno raste i potražnja za hranom. Iz tog razloga poljoprivredna industrija mora ostati u koraku sa potražnjom tržišta, imajući na umu stroge regulative, s jedne strane u pogledu samog procesa proizvodnje a sa druge strane ekoloških učinaka tog procesa. Kako bi se u navedenim uvjetima održala prehrambena sigurnost ljudske populacije, rješenje tog kompleksnog problema pronalazimo u više znanstvenih područja. Jedno od tih je i genetsko modificiranje biljnog materijala, iz kojega se formirala nova tehnologija modificiranja biljnog genetskog materijala pod nazivom CRISPR/Cas9 (Chen 2019.).

Ova tehnologija ugrubo je prirodniji, brži, jeftiniji i efikasniji sustav modificiranja genetskog materijala biljaka od konvencionalnih metoda genetskog modificiranja u svrhu dobivanja biljnih genotipova veće rodnosti, bolje kvalitete prinosa te fenotipskih svojstava prilagođenijih sustavu uzgoja (Leong, 2018.).

S druge strane neodrživim gospodarenjem poljoprivrednih površina previše intenzivnom eksploatacijom tla i sve većom urbanizacijom nastao je novi problem, ali ujedno i prilika za bolje rješenje. Taj problem je u kvaliteti poljoprivrednih površina, negativnom ekološkom učinku konvencionalne poljoprivrede te velikom potrebom za transportom poljoprivrednih proizvoda od gospodarstava do potrošača. Rješenje ovoga pak kompleksnog problema moglo bi biti u vertikalnoj poljoprivredi, odnosno zatvorenim sustavima poljoprivredne proizvodnje u kojima su svi biotski i abiotski čimbenici pod kontrolom čovjeka, te su negativni ekološki utjecaji proizvodnje i potrebe za površinama uvelike smanjeni (Anetić 2019.).

Prema Fernie i Yan-u (2020.), kombinacijom ovih dvaju tehnologija, CRISPR/Cas9 te vertikalnih poljoprivrednih sustava, potencijalno bi ljudska civilizacija ubrzanim putem mogla riješiti probleme buduće prehrambene sigurnosti, ujedno i smanjiti negativan ekološki otisak poljoprivredne proizvodnje.

Cilj ovoga rada je pregledati aktualno stanje ovih dvaju tehnologija na svjetskoj razini, njihove probleme i prepreke u stvarnoj primjeni pod uvjetom ekonomske isplativosti, isto tako i njihov međusobni utjecaj i potencijale za napredak.

2. CRISPR/Cas

CRISPR/Cas kratica je za obrambeni mehanizam prokariota koji se engleskom naziva *Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ili CRISPR associated protein. Velika je vjerojatnost da će u doglednom vremenu CRISPR/Cas biti od velikog značaja za unaprjeđenje metoda genetičkog modificiranja i liječenja kako biljaka tako i ljudi i životinja. Upravo ovaj mehanizam omogućava bakterijama i archaeobakterijama stjecanje otpornosti na patogene plazmide i bakteriofage. Nakon infekcije, preživjele bakterije spremaju fragmente DNA patogena u vlastiti genom, unutar CRISPR lokusa koristeći se CRISPR/Cas sustavom (Kovačić 2020.).

CRISPR lokus ugrubo se sastoji od palindroma odnosno ponavljajućih sljedova (*CRISPR repeats*) te multiple gena *Cas* koji kodiraju *Cas* enzime sa važnom ulogom u ovom sustavu. Između ponavljajućih sljedova ugrađeni su fragmenti virusnog genoma, koje je bakterija stekla preživljavanjem patogenog napada.

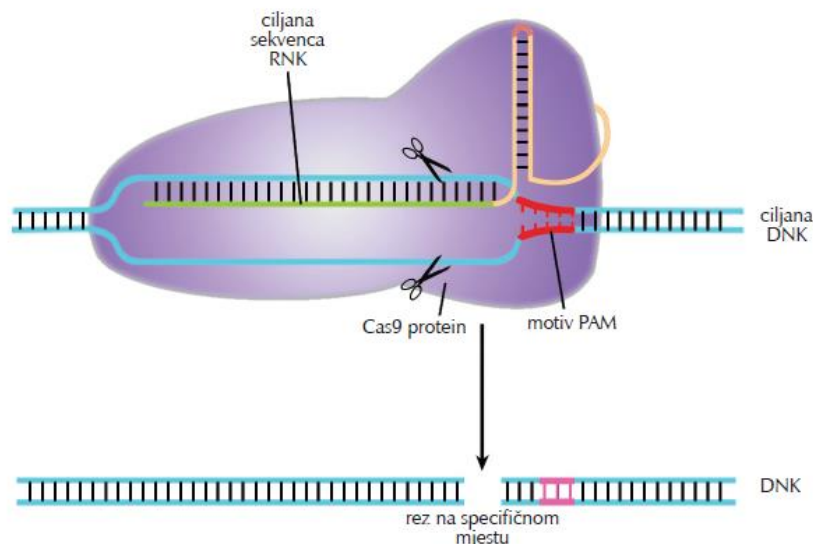
Ovi fragmenti nazivaju se razmaknice te nakon što su ugrađeni u genski lokus, bakterija stječe imunitet. Ovaj stečeni imunitet prenosi se na potomstvo i na taj način su i jedinke sljedeće generacije otporne na taj patogen (Dumančić 2018.).

2.1. Enzimi i njihove funkcije u CRISPR/Cas sustavu

Cas geni koji su dio CRISPR lokusa, kodiraju enzime sa različitim funkcijama u CRISPR/Cas sustavu. Funkcija enzima pod nazivom Cas1 i Cas2 je prepoznavanje, obrada i ugrađivanje dotada nepoznatih fragmenata genoma patogena u obliku razmaknica između ponavljajućih sljedova. Na taj način stvaraju imunnu memoriju bakterija i arheja.

Ako ponovno dođe do infekcije istim patogenom, na temelju DNA fragmenata ugrađenih razmaknica stvara se 20-ak baza duga RNA molekula u kompleksu s enzimom Cas9.

Pojednostavljeni shematski prikaz djelovanja enzima Cas9 prikazan je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz djelovanja Cas9 enzima na DNA

(Izvor: <https://www.tebu-bio.com/blog/2014/05/22/crispr-cas9-specificity-taming-off-target-mutagenesis-technical-bulletin/>)

Ovaj novonastali ribonukleoproteinski kompleks ima sposobnost pretraživanja bakterijskog DNA te prepoznavanja i odsijecanja podudarajućeg patogenog segmenta u bakterijskoj stanici. Na ovaj način CRISPR/Cas sustav pruža bakteriji otpornost od napredovanja ponovljene infekcije (Dumančić 2018.).

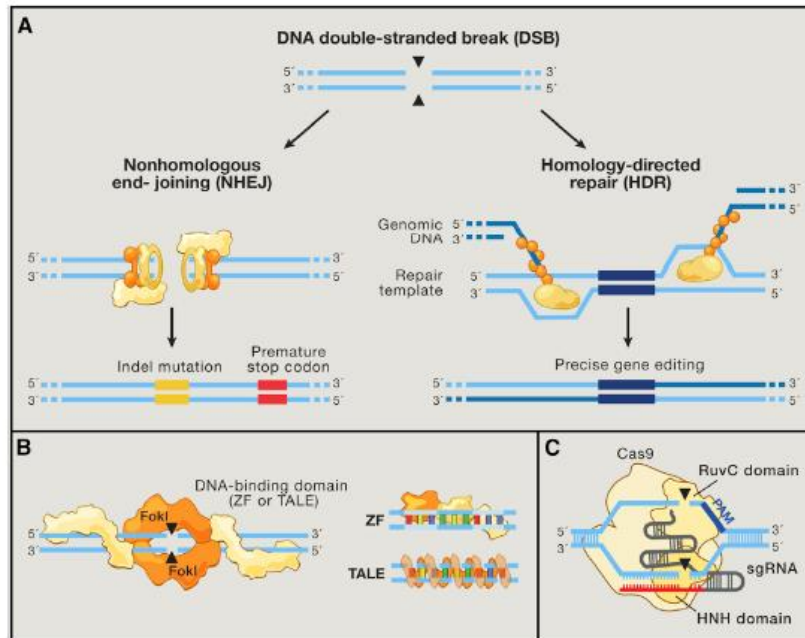
2.2. Metoda modifikacije DNA korištenjem CRISPR/Cas9 tehnologije

Pri modifikaciji genetskog materijala CRISPR/Cas9 metoda koristi se za induciranje DSB-a (engl. *double strand break*), odnosno dvolančanih lomova na molekuli DNA na odabranom mjestu. Induciranjem DSB-a pokreće se reakcijski mehanizam organizma popravka DNA stanice i stvara se prilika unosa drugih sekvenci u DNA odgovornih za željena nasljedna svojstva u vidu modifikacije. Pojednostavljeno, metoda korištenja sustava CRISPR/Cas9 u svrhu modificiranja genoma, utemeljena je na proizvodnji molekula crRNA (kompleks enzima Cas9 i molekule RNA) sa sekvencom komplementarnom ciljanom sekvenci, te proizvodnji komplementarne tracrRNA (transaktivirajuća crRNA) s djelomično komplementarnom sekvencom. Komplementarna tracrRNA pomaže usmjeravati enzim Cas9

jer molekula crRNA sama nema tu sposobnost. Nakon spajanja tracrRNA omogućuje se i spajanje crRNA zajedno s molekulama Cas9 te se odvija DSB (Hsu i sur., 2014.).

Postoje dva prirodno urođena sustava na koje stanica popravlja DSB od kojih je za genetičko modificiranje značajan homologijom usmjeren popravak ili skraćeno HDR (engl. *homology directed repair*). HDR kao predložak koristi egzogenu komplementarnu DNA (ili manje bitno sestrinsku kromatidu), kako bi popravio DSB odnosno sintetizirao ispravan slijed nukleotida. Upravo ovaj HDR mehanizam pruža mogućnost unosa čitavog gena za neka odabrana svojstva na mjesto induciranog DSB-a te se koristi u genetičkom modificiranju (Hsu i sur., 2014.).

S druge strane NHEJ mehanizam (engl. *non-homologous end joining*), kod kojeg se mehanizam temelji na ne-homolognom spajanju krajeva, sklon je pogreškama i često rezultira točkastim mutacijama (inercijama ili delecijama), koje prethode pomaku okvira čitanja (engl. *frameshift*) i inaktivaciji gena. Ipak, NHEJ mehanizam koristi se pri „Gene knockout“ tehnikama prilikom kojih se inaktivacijom određenih gena unaprjeđuju odabrana svojstva usjeva. Na slici 2. shematski su prikazani načini na koje metode uređivanja genoma eksploatiraju endogene mehanizme popravka DNA. (Montecillo 2020.)



Slika 2. Shematski prikaz NHEJ i HDR mehanizma popravka DSB-a i načina na koji se iskorištavaju za uređivanje genoma

(Izvor: Hsu P. (2014): Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering)

2.3. Prednosti CRISPR/Cas9 metode nad drugim metodama modificiranja DNA

CRISPR/Cas9 metoda često se uspoređuje sa ZFN (engl. *Zinc finger nucleases*) i TALEN (engl. *Transcription activator-like effector nucleases*) metodama zbog točaka sličnosti u procesima mehanizama. Naime ZFN, TALEN i CRISPR/Cas9 sustavi temelje se na dizajniranju nukleaza specifičnih za odabrani slijed DNA koje se unose u stanicu te izazivaju DSB. Ipak CRISPR/Cas9 nad navedenim metodama ima određen broj značajnih prednosti. Prva od prednosti je jednostavnost. Razdvajanje odabranih DNA sekvenci bazirano na gRNA (guide RNA, korišteno u CRISPR/Cas9 metodi) temelji se na jednostavnijem komplementarnom sparivanju baza RNA s tom sekvencom te je potrebno manje sofisticirano proteinsko inženjerstvo za pojedine ciljne sekvence (Kubat 2017.).

Nadalje, za razliku od ZFN i TALEN, kod CRISPR/Cas9 metode jedini preduvjet za odabir ciljnog slijeda DNA jest prisutnost motiva pridruženog razmaknici (*protospacer adjacent motif*; PAM) nizvodno od ciljne sekvence. Iako, u slučaju CRISPR/Cas9 sustava može doći do nespecifičnog cijepanja, odnosno da Cas9 pocijepa manje od 100% homologan slijed te je potrebno je vrlo precizno izabrati sekvence konstruirane gen specifične RNA. Iz tog razloga izbor za odabir sekvenci je u praksi smanjen (Kubat 2017.).

Također, razliku od ZFN i TALEN sustava, CRISPR/Cas9 metoda ima sposobnost cijepanja metilirane DNA, što je velika prednost jer je značajan postotak materijala u biljnom genomu metiliran. Ova sposobnost proširuje mogućnosti za uređivanje genoma posebice u slučaju monokotiledona. Još jedna od prednosti CRISPR/Cas9 metode je i manja zahtjevnost preduvjeta *multiplexinga* odnosno višestrukog uređivanja u odnosu na TALEN i ZFN metode. Ovom se tehnikom istovremeno inducira DSB na više mjesta te se modificira više gena istovremeno. Multiplexing se koristi kod inaktivacije gena ili čitavih genskih porodica. Ciljajući široko razdvojene lokacije na kromosomu dizajniraju se i velike genomske inverzije ili delecije (Kubat 2017.).

Prema Malenici (2018.) isto tako je važna i činjenica da CRISPR/Cas9 tehnologija potencijalno ruši monopol jer otvara put malim kompanijama i sveučilištima koja dosad zbog visoke cijene tehnologije genskog modificiranja nisu mogla proizvoditi genetski modificirane organizme.

2.4. CRISPR/Cas9 i zakonska regulativa

Legalni status CRISPR/Cas9 (uključujući i ZFN i TALEN tehnologije) u odnosu na GMO direktivu Suda Europske unije donešenu 2001. donedavno je bio nejasan. Naime, argument za CRISPR/Cas9 (uz ZFN i TALEN) tehnologiju je bila priroda mehanizma koja omogućuje male insercije i delecije ili supstitucije na odabranim lokacijama na kromosomima, te ih je nemoguće (zasada) diferencirati od prirodnih ili kemijsko potaknutih mutacija (Kubat 2017.). Ovo pitanje Sud Europske unije razjasnio je 25.07. 2018, donošenjem Rješenja kojim se svi organizmi produkti navedenih tehnika, podvrgavaju jednakim regulacijama regulative iz 2001. o genetski modificiranim organizmima (GMO) u EU.

Ipak, ostalo je prostora za daljnje argumentacije interpretacijom ove odluke. Argument je da organizmi nastali CRISPR/Cas9 tehnologijom ne spadaju pod GMO po definiciji Europske unije, u koliko postoji mogućnost da nastanu i prirodnim putem. Ukratko, da bi smo zaključili pripada li neki organizam u GMO kategoriju moramo uzeti u obzir tehnologiju stvaranja, ali i razmjenu genetskog materijala, tako da svaka mutacija ne mora rezultirati GMO-om (van der Meer 2021.).

Prema van der Meeru (2021.) sadašnji argument u korist CRISPR/Cas9 tehnologiji je da može uzrokovati promjene i delecije jednog para baze koje mogu nastati i prirodno. S druge strane, može izazvati i kompleksnije promjene koje ne mogu nastati prirodno. Poslan je upit komisiji Europske unije te je 20.4.2021 objavljena studija, od strane iste, pod naslovom *“Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in Case C-528/16”* u kojoj prvo navedeni argument nije demantiran.

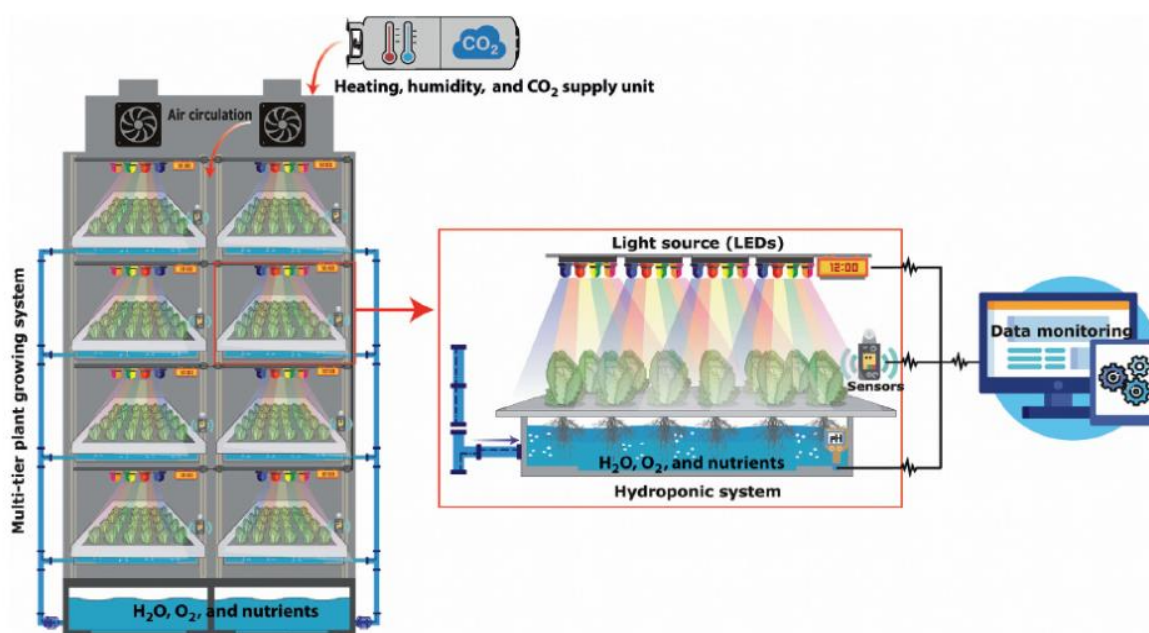
Najavljene su daljnje rasprave na ovu temu od strane komisije Europske unije. Iako promjene odluka na snazi (iz 2018.) trenutno nema, da se zaključiti kako bi se u skoroj budućnosti u EU mogla otvoriti vrata korištenju CRISPR/Cas9 tehnologije i uzgoju biljnih organizama, produkata ove tehnologije, ali uz smjernice, ograničenja i zakone o modifikaciji genetskog materijala propisane od strane EU.

Pristupi regulaciji genetičkih modificiranja ugrubo se mogu podijeliti u one koji se fokusiraju na finalni proizvod i one koji su više zabrinuti procesom stvaranja tog proizvoda.

Ukratko, u određenim dijelovima svijeta (SAD, Australija, Brazil i Argentina) prihvatili su poziciju gdje ako u genotipu modificiranog genoma nema stranog DNA materijala, taj genotip neće biti podvrgnut regulativama o genetski modificiranim organizmima (Zhang i sur., 2021.).

3. VERTIKALNA POLJOPRIVREDA

Vertical farming ili vertikalna poljoprivreda pojam je koji objedinjuje sve vrste uzgoja biljnih kultura u višeslojnom, zatvorenom sustavu proizvodnje u kojem su svi faktori rasta (poput svjetla, temperature, vlage, koncentracije CO₂, vode i nutrijenata) precizno kontrolirani (slika 3.) kako bi se proizvele visoke količine svježeg prinosa visoke kvalitete tokom cijele godine, u potpunosti nezavisno o solarnoj godini i drugim vanjskim čimbenicima. Nadalje ovi svi čimbenici mogu biti kontrolirani kombinacijom tehnologije i umjetne inteligencije.

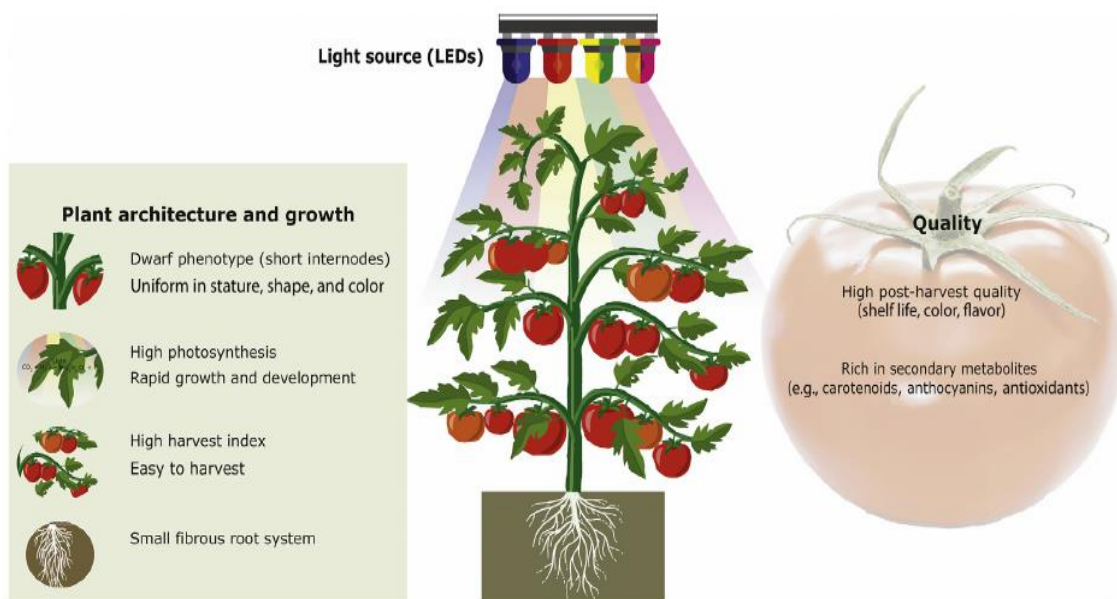


Slika 3. Shematski prikaz postavke vertikalne farme

(Izvor: SharathKumar M. (2020.))

Kako bi se ustanovila isplativost ovakvog modela proizvodnje, potrebno je kreirati sustav sa pozitivnim omjerom inputa i outputa. Iako je u pogledu vode, gnojiva, površina, te produktivnosti vertikalna poljoprivreda vrlo efektivna, visoki početni ulozi, te visoko korištenje energije i dalje postavljaju izazov. Razina individualnih činitelja okoliša i njihove interakcije razlikuje se od konvencionalnih sustava proizvodnje. Kao posljedica, procesi upravljanja uzgoja i kvalitete prinosa također se pojavljuju u drugačijim stopama (SharathKumar 2020.).

Zaključno, kako bismo realizirali vertikalnu poljoprivredu kao održiv sustav proizvodnje najvažniji su napredci u samoj znanosti o genetici, morfologiji i fiziologiji biljaka (Slika 4.).



Slika 4. Prikaz kako na biljni fenotip s poželjnim svojstvima utječe vertikalna poljoprivreda

(Izvor: SharathKumar M. (2020.))

4. USPJEŠNE VERTIKALNE FARME U SVIJETU

Prema Nex (2021.), jedan od primjera uspješnih vertikalnih farmi u svijetu najveća je tvrtka SAD-a koja se bavi vertikalnim uzgojem biljnih kultura pod nazivom AeroFarms.

Obuhvaća devet farmi u SAD-u a njezin princip rada temelji se na odabiru lokacija u blizini velikih centara populacije te na taj način razbija stari model proizvodnje koji ima velike transportne potrebe. Potočarka, kelj, rikola i dvadesetak drugih vrsta zeljastog povrća rastu na policama visokim do sedam katova, a njihovo korijenje raste u magljenu mješavinu vode i nutrijenata. Proizvode godišnje oko 770 tona zeljastog povrća uz godišnje prihode od oko 22 milijuna američkih dolara. Kompletna ulaganja iznose 63 milijuna američkih dolara (Nex 2021.).

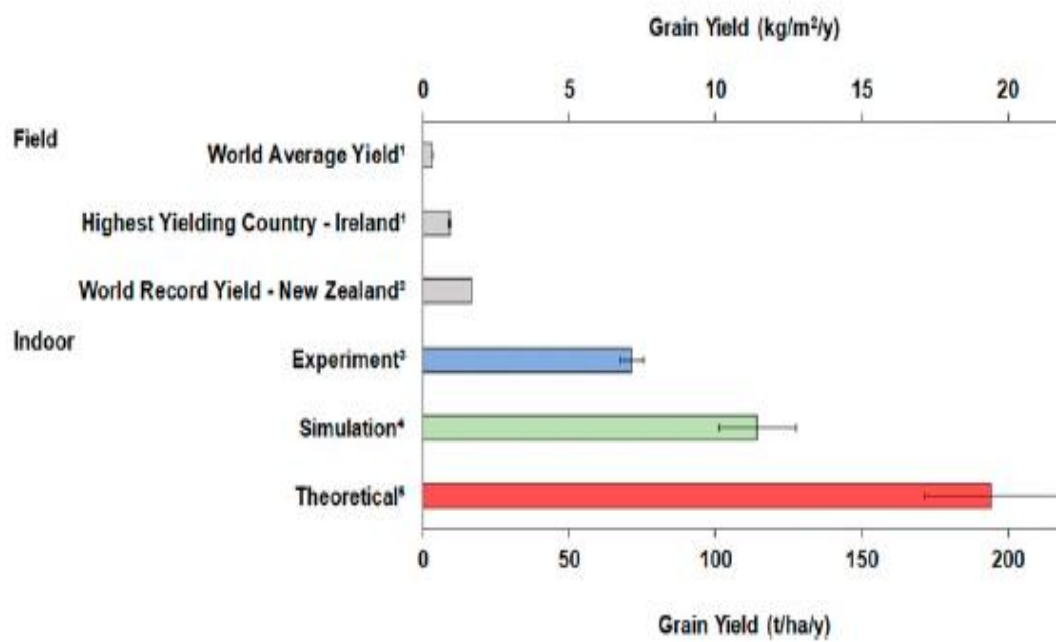
Prehrambena sigurnost aktualan je problem u zemljama Bliskog istoka. Zalihe vode i plodnog tla na ovim aridnim, pustinjским područjima su ograničene, te se zemlje Zaljeva oslanjaju na uvoz za oko 80% hrane koju konzumiraju. Potencijalno rješenje prva je komercijalna vertikalna farma u regiji je tvrtka Badia Farms. Otvorila se ranije ove godine i nudi održivo rješenje poljoprivrednoj proizvodnji u pustinji; kulture su uzgajane u supstratima kokosovih ljusaka (engl. *coco coir* ili *coconut fiber*) i koriste 90% manje vode nego konvencionalno uzgojene. Tvrtka Badia Farms trenutno u svojim vertikalnim farmama proizvodi zeljaste kulture i začinsko bilje. Kapitalni ulozi u tvrtku Badia farms iznose oko 41 milijun američkih dolara uz prihode od oko 4 milijuna američkih dolara godišnje (Nex 2021.).

Prema Assengu (2020.) visok potencijal za uzgoj u zatvorenom vertikalnom sustavu prikazuje pšenica. Naime, u članku spomenutog autora objavljenom od strane odsjeka Poljoprivrednog i Biološkog Inženjeringa sveučilišta Floride, prikazani su statistički podatci godišnjih prinosa usjeva pšenice uzgajane na površini jednog hektara u 10-slojnom zatvorenom vertikalnom sustavu proizvodnje. Nadalje, zaključeno je da ovaj način uzgoja u usporedbi sa konvencionalnim poljskim uzgojem može dati 220-600 puta veći prinos po hektaru godišnje. Ovaj zaključak temelji se na činjenici da su prosječni prinosi pšenice u svijetu pri konvencionalnom poljskom uzgoju u rasponu od <1 t/ha/godišnje, kada su voda ili nutrijenti ograničavajući čimbenici, pa sve do >10 t/ha/godišnje pri uzgoju u hladnijim, dobro navodnjenim uvjetima, uglavnom duljeg razdoblja vegetacije (8-11 mjeseci).

Usuprot tome, kada je pšenica uzgajana u kontroliranim zatvorenim uvjetima pri konstantnoj pogodnoj temperaturi, fenološki razvoj usjeva je brži, te je u članku teoretizirano mogućih pet žetvi usjeva pšenice godišnje na jednoj površini. Također navedeno je i kako pšenica može iskoristavati svjetlost za fotosintezu i rast do 24 sata dnevno, s gotovo linearnim rastom usjeva. Poznato je i da pšenica pozitivno reagira na povišene koncentracije atmosferskog CO₂ ako ostali čimbenici, poput nutrijenata i vode, nisu ograničavajući (Asseng i sur., 2020.).

Proveden je eksperiment uzgoja pšenice sa povišenom koncentracijom atmosferskog CO₂ i opskrbe svjetlom, te neograničavajuće opskrbe nutrijentima i vodom.

Koristeći model simulacije usjeva pšenice koji obuhvaća eko-fiziološke interakcije usjeva i abiotičkih čimbenika rasta (DSSAT-NWheat model), precizno su reproducirani rast biomase i prinos pod različitim uvjetima proizvodnje. Preciznije, DSSAT-NWheat modelom dobiveni su simulirani rezultati rasta biomase i prinosa pri optimalnoj CO₂ koncentraciji i maksimiziranoj opskrbi svjetlom. Završno dobivena je i simulacija prinosa pri optimalnoj CO₂ koncentraciji, maksimiziranoj opskrbi svjetlom, bez ograničavajuće opskrbe nutrijentima i vodom te uz najveći teoretski mogući žetveni indeks pšenice (pod utjecajem genetskih i okolišnih čimbenika). Usporedba rezultata eksperimentalnog uzgoja, te obiju simulacija u vidu godišnjeg prinosa pšenice, s godišnjim prosječnim svjetskim prinosom pšenice i prosječnim prinosima pšenice u Irskoj (zemlja s najvišim prosječnim prinosom pšenice t/ha/g) i Novom Zelandu (svjetski rekorder u prinosu pšenice t/ha/g), prikazana je na Slici 3. Ipak, naglašena je mala vjerojatnost da će se vertikalni uzgoj pšenice moći natjecati s tržišnim cijenama u skoroj budućnosti, no kako bi mogao imati važnu ulogu u ograđivanju od budućih klimatskih promjena ili neočekivanih problema u globalnom sustavu proizvodnje hrane (Asseng i sur., 2020.).



Grafikon 1. Usporedba količine prinosa pod različitim uvjetima proizvodnje

(Izvor: Asseng S.(2020.))

5. IMPLIKACIJA I UTJECAJ CRISPR/Cas9 TEHNOLOGIJE NA KULTURE UZGAJANE U VERTIKALNOM SUSTAVU UZGOJA

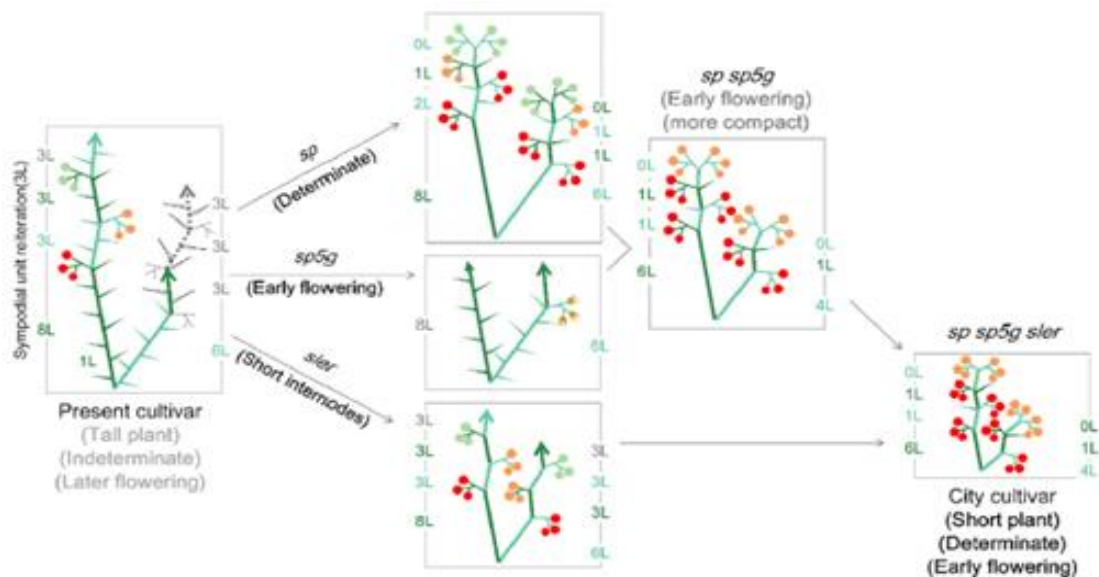
Uzgoj nasada bliže potrošaču jedan je od načina predloženih kako bi se smanjio ekološki otisak pri proizvodnji hrane. Ovaj prijedlog je dodatno zakompliciran sve više urbanom populacijom, manjkom dostupnih obradivih površina u gradovima te posljedičnom potrebom za bržim ciklusima usjeva. Uzeći u obzir ove čimbenike, do danas jedino su zelena salata i druge zeljaste kulture uzgajane u mjerilu u urbanim farmama. Zadnjih nekoliko godina postoji visok interes za uzgoj bobičastog i drugih vrsta voća u urbanim farmama, ali zapreku postavlja činjenica da su komercijalni genotipovi uzgajani kako bi bili visokorodni pri pod tipičnim vanjskim i stakleničkim uvjetima. Nasuprot tome, smanjena udaljenost transporta čini stavku roka trajanja proizvoda manje imperativnom, te se više pažnje može posvetiti kvalitativnim svojstvima voća (Fernie i Yan 2020.).

5.1. CRISPR/Cas9 i ubrzano modificiranje usjeva voća porodice Solanaceae za vertikalnu poljoprivredu

Prema nedavnom istraživanju Kwonu (2020.), korišteno je svojstvo višestrukog uređivanja mehanizma CRISPR/Cas9 kako bi se restrukturirali stabljikasti genotipovi rajčice u kompaktne ranozrele jedinke, sukladne za urbane farme.

Kao važan dio prehrane čovjeka i jedan od glavnih voćnih usjeva, rajčica je obećavajući kandidat za uzgoj u urbanim farmama. Slika 5. prikazuje kako mutacije na dva regulatora

cvatnje u univerzalnom hormonskom sustavu florigena može preobraziti visoke, neodređene rajčice u rano zrele kompaktne genotipove (Fernie i Yan 2020.).



Slika 5. Shema brzog uređivanja genotipa rajčice

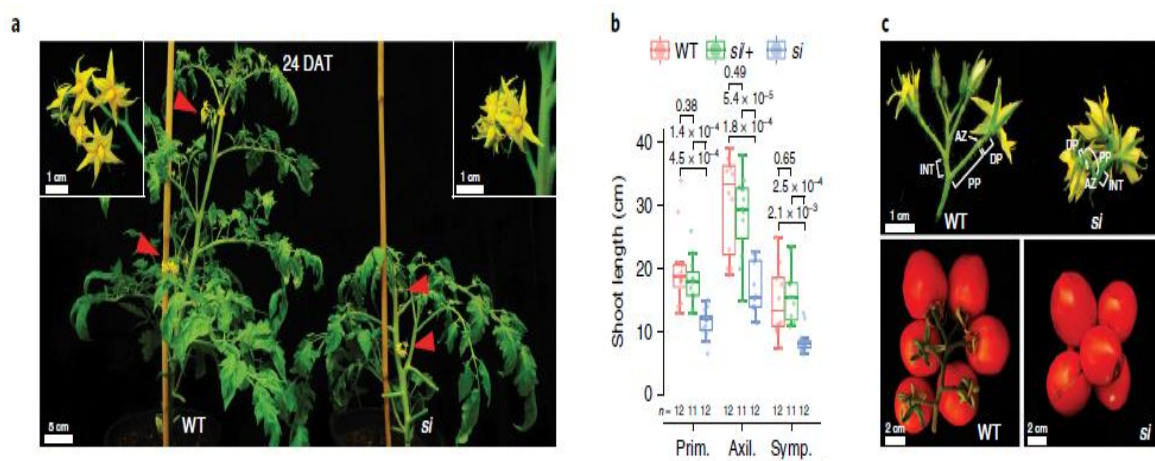
(Izvor: Fernie (2020.))

Kuack (2021.) u objavljenom je članku citatima istraživača sveučilišta University of California definirao rajčicu kao kandidata za uzgoj u vertikalnim farmama, zbog fenotipske kompatibilnosti sa načinom uzgoja. Ova činjenica obrazložena je nastojanjem spomenutih znanstvenika da istraže maksimizaciju žetvenog indeksa usjeva, kao i komercijalnom važnošću rajčice. Upravo iz ovih razloga rajčica je trenutno najistraženiji usjev glede uređivanja genoma s ciljem određivanja fenotipskih sredstava kompatibilnih sa vertikalnim sustavom uzgoja.

Mutacije inducirane CRISPR/Cas9 mehanizmom te prirodno inducirane mutacije na genu represoru klasičnog cvjetanja, skraćeno SP gen (engl. self pruning gene), dodjeljuju jedinki svojstvo određenog rasta, te mutiranje njegovog paralognog gena *SP5G* u SP pozadini ubrzava cvjetanje i poboljšava kompaktnost biljke. Iako ovi SP *SP5G* dvostruko određeni genotipovi imaju ubrzane cikluse i veliku produktivnost pri uzgoju u gustom sklopu na vanjskim površinama i staklenicima, za vertikalnu poljoprivredu bolje bi odgovarale čak i

manje biljke koje proizvode opravdane prinose. Preciznije, iako bi omjer ploda i biljaka bio lošiji kod manjih biljaka, ovo smanjenje bilo bi kompenzirano uzgojem većeg broja jedinki i na taj način bi se održala produktivnost u ograničenom prostoru (Kwon 2020.).

Prema Kwonu (2020.) skraćivanje stabljike modifikacijom gena dodatno bi povećalo kompaktnost SP/SP5G dvostruko određenih biljaka bez da se kompromitira količina prinosa po jedinki. U prethodno provedenom eksperimentu mutageneze EMS (etil metansulfonat) identificirana je patuljasta mutirana jedinka sa skraćenim internodijima i ekstremno kompaktnim cvatom koji formira tijesno zbijene grozdove plodova (slika 6.).



Slika 6. a) Usporedba Wt i si fenotipova (internodiji i cvat)

b) Usporedba Wt, si i si/+ fenotipova (duljina izdanka)

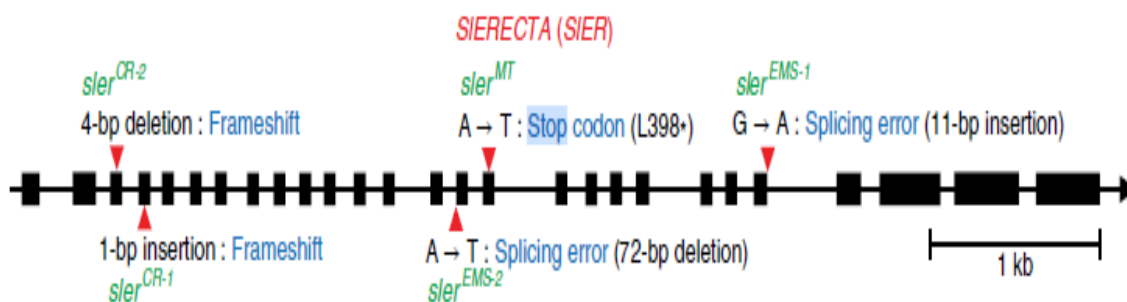
c) Usporedba Wt i si fenotipova (kompaktnost plodova i cvata)

(Izvor: Kwon C.T. (2020.))

Ovaj mutirani genotip nazvan je *si* (engl. *Short internodes*). Mutirani genotip *si* pokazao je dobro formiranje mladog ploda iz cvijeta uz visoku plodnost. Svi vegetativni i reproduktivni internodiji te cvijetne peteljke bili su znatno kraći od WT (engl. *wild type*) biljaka, te *si* heterozigota (nadalje *si/+*). Spomenuta tri fenotipa blisko su nalikovali na monogenetskog recesivnog mutanta nazvanog *spd1* (engl. *short pedicel 1*) koji je bio izoliran u odvojenom

eksperimentu mutagenize. Potvrđen je alelizam, te je tehnikom mapping-by-sequencing uspoređen si i *spd1* fenotip na velikom intervalu kromosoma 8.

Ova regija uključivala je ortolog klasičnog *Arabidopsis ERECTA* (skraćeno *ER*) gena rajčice, za koji je znano da utječe dužinu internodija. Za napomenuti je da su tri alela iz ovog eksperimenta, a jedan od njih je bio iz patuljastog fenotipa, sadržavali točkaste mutacije koje su uzrokovale defekte pri spajanju gena, i preuranjeni stop kodon (Slika 7.)



Slika 7. Shematski prikaz defekata pri spajanju i preuranjenog STOP kodona na alelu koji utječe na dužinu internodija

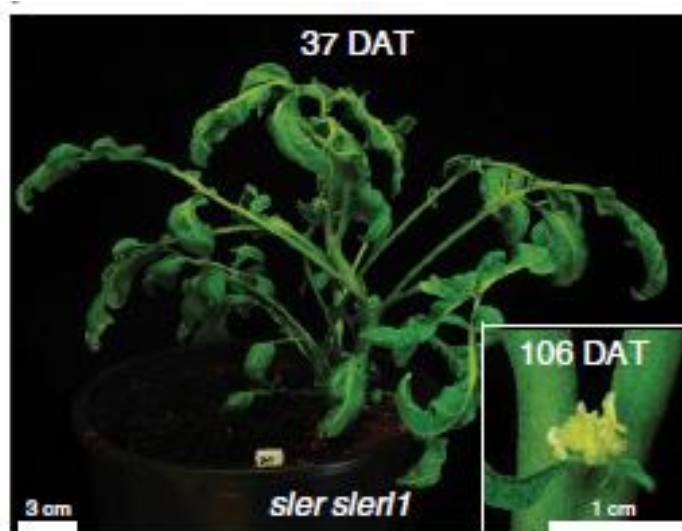
(Izvor: Kwon (2020.))

Kao dodatak, mutageneza rajčice pokrenuta metodom CRISPR/Cas9 (genotip nazvan *Sl*) navedenog gena *ERECTA*, rezultirala je nefunkcionalnim jedinkama s identičnim fenotipovima kao *si/spd1* (Slika 8.) (Kwon 2020.).

Nadalje, identificiran je i gen odgovoran za fenotip kratkih peteljki nazvan *spd2* (engl. short pedicel 2), mutirani genotip skraćenih internodija istog razreda kao i genotip *sl*, ali s dodatnim razvojnim defektima koji ga čine neodgovarajućim za poljoprivredni uzgoj, od kojih je jedan sterilnost.

Mapiranjem i kloniranjem pokazalo se da tri alela jedinki iz eksperimenta EMS mutageneze roda *Arabidopsis*, imaju mutacije u homologu rajčice pod nazivom *SERK1* (engl. kratica od somatic embryogenesis receptor kinase 1) na kromosomu 4. *SERK1* u vrstama iz roda *Arabidopsis* obavlja svoju funkciju u kompleksu s *ER* genom. Otkriveno je da *slSERK1* mutirane jedinke (jedinke kojima je na *SERK1* genima inducirana mutacija tehnikom

CRISPR/Cas9) razvijaju vrlo izražene razvojne defekte uključujući srasle stabljike, deformacije cvata, partenokarpiju plodova i pojednostavljenu građu lista.



Slika 8. Nefunkcionalna jedinka patuljastog fenotipa dobivena mutagenезom potaknutom CRISPR/Cas9 metodom

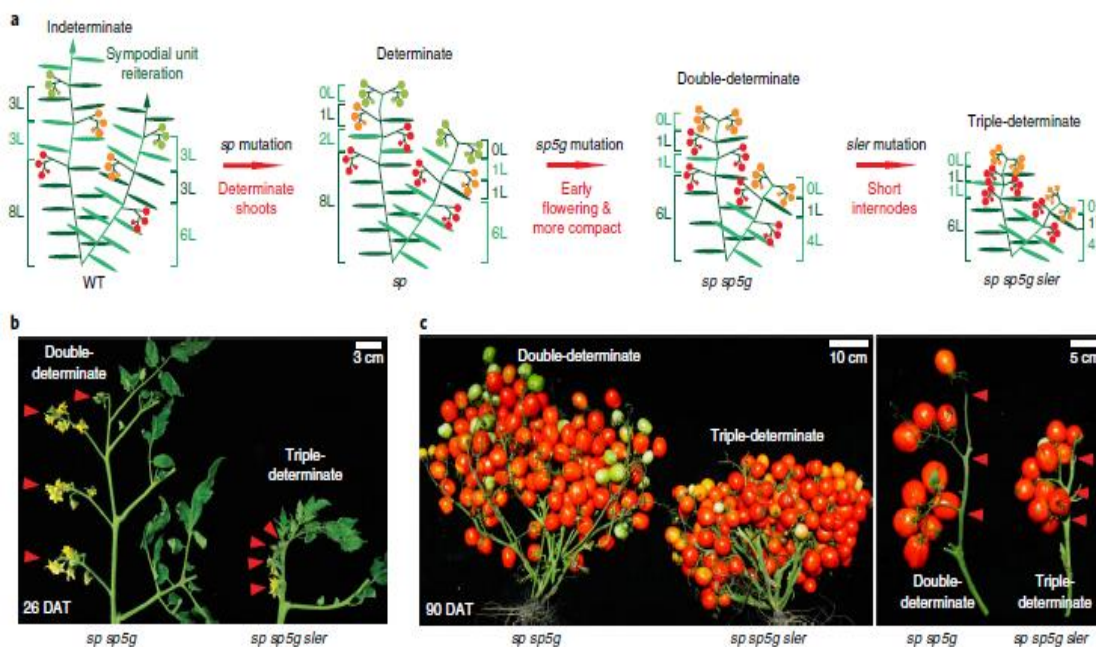
(Izvor: Kwon (2020.))

Obrasci izraženih fenotipskih svojstava genotipa *SISERK1* bili su slični onima genotipa *SIER*. Jedinke kojima su inducirane mutacije oba gena, pod nazivom *sler slerk1* pokazali su epistatično djelovanje ER I *SERK1* gena. Nakon induciranja *SISERK1* genotipa metodom CRISPR/Cas9 uspješno je dobiveno nekoliko transgeničnih jedinki (nadalje pod nazivom T₀) koje su bile kimerične za velike mutacije delecije I pokazivale su raspon izrazitih defekata na alelima proučavanim u EMS eksperimentu.

Zaključno, kreiran je genotip pod nazivom *SIER-like 1* (dalje *SIERL1*), paralog *SIER* genotipa koji dijeli slične fenotipske obrasce. Dok su jedinke genotipa proizvedenog metodom CRISPR/Cas9 bile nerazlučive od WT jedinki, jedinke proizvedene dvostrukom mutacijom razvile su pleiotropne defekte, koji podsjećaju na *spd2/SISERK1* genotipove (slika 6.) (Kwon 2020.).

Kako bi testirali poljoprivredni učinak *sler* genotipova, specifično njihov potencijal povećanja kompaktnosti dvostruko determinantnih jedinki, proizvedene su sve kombinacije

dvostruko i trostruko determinantnih genotipova. Odabranim dobivenim jedinkama procijenjena je struktura izdanaka i komponente prinosa u staklenicima i na vanjskom uzgoju (Slika 9.).



Slika 9. Prikaz dvostruko i trostruko determinantnih fenotipa, generiranih CRISPR/Cas9 metodom

(Izvor: Kwon (2020.))

U usporedbi sa jednostruko determinantnim jedinkama, *sp sler* biljke razvile su kompaktnije izdanke bez gubitaka prinosa. Značajnije, *sp sp5g sler* trostruko determinantne jedinke bile su najkompaktnije od svih genotipova te su i dalje bile rano cvjetajuće, te su razvijale jednak broj cvatova i cvjetovi kao i dvostruko determinantne jedinke. Iako je manja veličina ploda uzrokovala smanjenje prinosa po biljci, žetveni indeks trostruko determinantnih genotipova nadmašio jednostruke te se podudaraao s trostruko determinantnim genotipovima (Kwon, 2020.).

Zajedno, ovi rezultati predlažu da koristeći se metodom CRISPR/Cas9 na samo tri gena, (SP, SP5G I SIER) moguće je preobraziti bilo koji genotip rajčice u kompaktan, ranozreli oblik zadržane funkcionalnosti, čime se potvrđuje održivost ove metode.

6. CRISPR/Cas9 TEHNOLOGIJA U UNAPRJEĐIVANJU DRUGIH USJEVA

Nakon uspješne demonstracije CRISPR/Cas9 metode kao programibilnog sustava za modifikaciju gena navođenog od strane RNA, proveden je velik broj istraživanja te je dokazana učinkovitost ovog sustava u raznim organizmima. Primjena ove platforme uvelike je utjecala na napredak manipulacije genima u biljnim sustavima. Korištenje sposobnosti ove platforme kako bi se inducirali DSB-ovi, omogućava tehniku „*Gene knockout*“ te njoj suprotnu „*Gene knock in*“ tehniku, kojima se inaktiviraju postojeći ili dodaju strani aleli u gene putem endogenih mehanizama za popravak DSB-a (Montecillo, 2020.).

Rane primjene modifikacija gena na bazi CRISPR/Cas9 tehnologije na biljnim kulturama demonstrirale su raznovrsnost sistema kod induciranja mutacija ciljanih gena i napredaka odabranih svojstava mnogih biljnih vrsta, u rasponu od testnih kultura sve do gospodarski važnih usjeva. CRISPR/Cas9 tehnologija vrlo brzo napreduje kao alat za modifikaciju genetskog materijala te je primijenjena u svrhu unaprjeđenja kvalitete biljaka i prinosa, promjene metaboličkih puteva, dodjeljivanja svojstava otpornosti na stres te opisivanju i rasvjetljavanju važnih genskih funkcija (tablica 1.) (Montecillo, 2020.).

Tablica 1. Primjeri vrsta, modificiranih gena i rezultata promjena fenotipskih svojstava

Usjev	Gen od interesa	Fenotip/funkcija
<i>Oryza sativa</i>	OsGS3, OsGW2, OsGn1a SBEIIb OsFAD2-1 TMS5	Poboljšan prinos (duljina i širina zrna, broj i masa 1000 zrna) Visoka koncentracija amiloze Povećana koncentracija oleinske kiseline Temperaturno osjetljive muško sterilne linije
<i>Brassica napus</i>	FAD2	Povećana koncentracija oleinske kiseline
<i>S. lycopersicum</i>	SGR1, LCY-E, B1c, LCY-B1 AND LCY-B2 SlyPDS, SlyGABA-TP1, SlyGABA-TP2, SlyGABA-TP3, SlyCAT9, SlySSADH	Visoka koncentracija likopena Akumulacija γ -aminomaslačne kiseline (GABA)
<i>Zea mays</i>	ZmTMS5	Temperaturno osjetljive muško sterilne linije
<i>T. aestivum</i>	Ms1	Temperaturno osjetljive muško sterilne linije
<i>C. sativus</i>	eIF4E	Stvaranje usjeva otpornih na stres Otpornost na infekciju Ipomovirusom u krastavaca i otpornost na potyvirus; na virus žutog mozaika tikvice i virusa prstenaste pjegavosti. papaje -W
<i>Oryza sativa</i>	eIF4G OsERF922 OsRR22	Otpornost na <i>tungro spherical virus</i> (RTVS) Otpornost <i>rice blast</i> bolest Otpornost na salinitet
<i>C. sinensis Osbek</i> <i>C. paradisi Macf.</i>	CsLOB1	Otpornost Canker zaraze
<i>S. lycopersicum</i>	Mlo	Otpornost na pepelnicu
<i>Zea mays</i>	ARGOS8	Otpornost na sušu

7. BUDUĆNOST CRISPR/Cas9 TEHNOLOGIJE U VERTIKALNOJ POLJOPRIVREDI

CRISPR/Cas9 tehnologija dokazala se uspješnom u raznim biljnim vrstama uključujući *Arabidopsis*, sirak, te duhan i rižu. Do sada se ovom tehnologijom proizvelo nekoliko komercijaliziranih sorti za uzgoj na otvorenom i plastenički uzgoj, ali nijedna za uzgoj u unutarnjim poljoprivrednim sustavima odnosno vertikalnu poljoprivredu. Primjeri uspješnih sorti razvijenih CRISPR/Cas9 tehnologijom uključuju gljive i krumpire s razvijenim svojstvom otpornosti na potamnivanje. Ova je svojstvo postignuto funkcije „*gene knockout*“ tehnikom, tj. inaktivacijom odnosno izbacivanjem iz funkcije genskog koda za enzim zvan polifenol-oksidaza, koji uzrokuje potamnivanje. Pošto se CRISPR/Cas9 tehnikom može inducirati više genetskih modifikacija odjednom, ona ima i velik potencijal za stvaranje genotipova koji su otporni na razne biotske i abiotske stresove isto kao i povećanje prinosa. Komercijalni primjer je korporacija *DuPont Pioneer* želi demonstrirati moć ove tehnike u nadolazećim godinama s CRISPR/Cas9 genotipovima kukuruza koji je genetski modificiran da ima poboljšano svojstvo voštanosti zrna, koje je izrazito cijenjeno u prehrambenoj industriji i industriji materijala. Ovaj genotip razvijen je i testiran te bi se u doglednom vremenu trebao naći na tržištu (Leong, 2018.).

Stvaranje hibrida voštanog kukuruza CRISPR/Cas9 tehnologijom, navode i Gao (2020.) modificirajući voštani alel u 12 elitnih inbred linija kukuruza, sam proces je trajao više od godinu dana kraće nego li konvencionalna introgresija svojstava koja koristi povratna križanja i selekciju uz pomoć molekularnih markera.

CRISPR/Cas9 tehnologija itekako može biti korištena kao pristup uzgoju u budućim zatvorenim sustavima proizvodnje, takozvanim PFAL sustavima (engl. *Plant factories with artificial lighting*). Bilo bi mnogo jednostavnije uzgojiti novi visokoprinosni usjev visoke kvalitete uklanjanjem gena nositelja svojstava tolerancije stresa. Bez tolerantnosti, usjev bi i dalje mogao bujati u zatvorenim sustavima optimiziranim za taj usjev.

CRISPR/Cas9 može omogućiti takav “nepraktičan” pristup uzgoju kako bi se postigle uspješne i učinkovite PFAL farme.

U proizvodnji usjeva visoke vrijednosti ciljanjem metaboličkih puteva, CRISPR/Cas9 sustav može biti prilagođen da cilja odabrane lokacije. Može biti potrebno ciljati nekoliko gena te se razlikuju razine izražaja svojstava kod različitih biljnih tkiva ili u različitim stadijima razvoja. Postoje brojni načini mijenjanja i razvoja CRISPR/Cas9 sustava kako bismo zadovoljili naše potrebe u genetičkom i metaboličkom inženjeringu u svrhu stvaranja novih genotipova. DNA-free CRISPR/Cas9 metoda trenutno dobiva na popularnosti u znanosti o usjevima pošto nema strane DNA introducirane u proizvedene biljke, što može ublažiti regulatorna pitanja, te bi mogla biti bolje prihvaćena od strane društva ako se svrstaju u non-GMO usjeve. Prethodno složeni kompleksi izoliranog Cas9 enzima i gRNA su transficirani u protoplast biljke. Uspješno ciljana mutageneza DNA-free metodom je već prikazana u rodu *Arabidopsis* i usjevima poput zelene salate, duhana i riže. Čitav proces od ciljanja gena do uspješnog CRISPR/Cas9 modificiranja i testiranja proizvedene biljke mutanta u PFAL sustavu proizvodnje traje oko godinu dana, mnogo kraće od konvencionalnih metoda križanja.. Pri usporedbi s drugim tehnikama modificiranja gena poput TALEN i ZFN metoda, CRISPR/Cas9 je isplativija metoda s manje tehničkih problema.

Podudarajuće pozitivne povratne informacije o CRISPR/Cas9 metodi u pogledu proizvodnje usjeva za PFAL sustave nagovještavaju porast uloge CRISPR/Cas9 tehnologije shodno rastu uloge PFAL sustava na prehrambenom tržištu. Isto tako CRISPR/Cas9 tehnologija mogla bi podići kompetitivnost PFAL sustava na tržištu znatno povećavajući rodost usjeva inaktivacijom gena nositelja svojstava za otpornost na stres (Leong, 2018.).

8. ZAKLJUČAK

CRISPR/Cas9 i Vertikalni sustavi poljoprivredne proizvodnje relativno su nove tehnologije te kao takve nisu još ostvarile svoj puni potencijal. Razlog tome, brojni su (no ne i nepremostivi) problemi koji zbog svoje kompleksnosti i visokih potreba kapitalnog ulaganja te isto tako visokih rizika, jednostavno trebaju više vremena kako bi se riješili. S jedne strane CRISPR/Cas9 tehnologija nudi jeftinije, prirodnije brže i efikasnije riješene od konvencionalnih (i konkurentnih) metoda modifikacija biljnog genetskog materijala, u svrhu dobivanja genotipova veće rodnosti, bolje kvalitete i prilagođenijih svojstava načinu proizvodnje odnosno potrebama i zahtjevima potrošača. Ona naravno ima svoje probleme. Problemi tehničke prirode su u vidu heritabilnosti svojstava, neuspjelih izražavanja željenih svojstava nakon induciranih mutageneza te razvoj nefunkcionalnih jedinki nakon modifikacije genskog materijala. Ipak velikim brojem kombinacija može se doći do funkcionalnih genotipova poboljšanih i prilagođenih fenotipskih svojstava. Drugi problemi, i to oni koji manje ovise o znanstvenoj strani tehnologije su oni regulativni. Naime od 2018. svi biljni produkti nastali upravo ovim sistemom modifikacije podložni su regulativi o genetski modificiranim organizmima iz 2001. Trenutna prilika da odobri proizvodnja genotipova proizvedenih CRISPR/Cas9 sustavom leži u DNA-free tehnici modifikacije genskog materijala. S druge strane, vertikalna poljoprivreda svoje mjesto u svijetu našla je tek u vrlo malim i specifičnim uvjetima. Bio to uzgoj vrsta koje su kao takve kompatibilne s ovim načinom proizvodnje (zelena salata i rajčica) ili uzgoj na aridnim, urbanim predjelima svijeta, gdje je zbog tih čimbenika ovaj način proizvodnje isplativ.

Uz rješenje legalnih problema i primjenu CRISPR/Cas9 tehnologije na modifikaciju usjeva za uvjete vertikalnog sustava poljoprivredne proizvodnje, potencijalno bismo brzo i efikasno mogli riješiti problem isplativosti i održivosti vertikalne poljoprivrede, a samim time i uvelike smanjiti ekološki otisak poljoprivredne proizvodnje općenito. Unatoč brojnim tehničkim i ekonomskim zaprekama, čini se kako će utjecaj ovih dvaju tehnologija u dogledno vrijeme samo rasti.

9. POPIS LITERATURE

Radovi u časopisima:

1. Anetić Z.: Vertikalne farme. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek, 2019.
2. Dumančić E.: CRISPR/Cas9 tehnologija: značenje i primjena. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Osijek, 2018.
3. Kovačić M. (2020.): CRISPR revolucija na pomolu. Tehnološke zabilješke 69 (3-4) 202–203
4. Kubat M.: Primjena CRISPR/Cas9 tehnologije u biljaka i implikacije na zakonodavnu regulativu, Završni rad , Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2017.

Akademski članci:

1. Alisdair R. F, Jianbing Y. (2020.): Targeting key genes to tailor old and new crops for a greener Agriculture. Dostupno na: <https://ur.booksc.eu/book/81123764/ed6696> (pristupljeno 20.06.2021.)
2. Choon-Tak K i su (2021.): Rapid customization of Solanaceae fruit crops for urban agriculture Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31873217/> (pristupljeno 24.6.2021)
3. Hsu, P., Lander,E., Zhang, F. (2015.): Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4343198/> (pristupljeno 22.07.2021)
4. Huirong G., Gadlage, M., Lafitte, H., Lenderts, B. (2020.): Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR–Cas9 Dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/339801080_Superior_field_performance_of_waxy_corn_engineered_using_CRISPR-Cas9 (pristupljeno 19.07.2021.)
5. Kuack, D. (2021): Will Tomatoes Be The Next Big Commercial Crop For Vertical Farms? Dostupno na: <https://urbanagnews.com/blog/exclusives/will-tomatoes-be-the-next-big-commercial-crop-for-vertical-farms/> (pristupljeno 14.9.2021.)
6. Meer, P. i su. (2021.): The Status under EU Law of Organisms Developed through Novel Genomic Techniques Dostupno na:

<https://www.cambridge.org/core/journals/european-journal-of-risk-regulation/article/status-under-eu-law-of-organisms-developed-through-novel-genomic-techniques/4812A77647B94B3BB789D3532379C081> (pristupljeno 22.06.2021)

7. Montecillo, J., Chu, L., Hanhong B. (2020.): CRISPR-Cas9 System for Plant Genome Editing: Current Approaches and Emerging Developments Dostupno na: <https://www.mdpi.com/2073-4395/10/7/1033> (pristupljeno 20.06.2021.)
8. Asseng i su. (2020.): Wheat yield potential in controlled-environment vertical farms Dostupno na: <https://www.pnas.org/content/117/32/19131> (pristupljeno 24.07.2021)
9. Zhang Y., Restall, J., Crisp, P., Godwin, I., Liu, G. (2021.): Current status and prospects of plant genome editing in Australia. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-021-10188-y> (pristupljeno 25.06.2021.)

Internetske stranice:

1. John Innes Centre. (2021.): A CRISPR picture emerges on European Union GMO directive Dostupno na: <https://www.jic.ac.uk/news/a-crispr-picture-emerges-on-european-union-gmo-directive/>
2. European Commission (2021.): Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in Case C-528/16 Dostupno na: https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-04/gmo_mod-bio_ngt_eu-study.pdf (pristupljeno 25.07.2021.)
3. Ewen Callaway. (2018.): CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union . Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/d41586-018-05814-6> (pristupljeno 15.07.2021.)
4. RocketReach: AeroFarms information. Dostupno na: https://rocketreach.co/aerofarms-profile_b5cfb80cf42e0a08 (pristupljeno 20.07.2021.)