신육종 기술 및 작물 개발 동향

박상렬 · 박지희 · 임선형 · 이종렬 · 김범기*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부

Current Status of New Plant Breeding Technologies and Crop Development

Sang-Ryeol Park, Jihee Park, Sun-Hyung Lim, Jong-Yeol Lee, and Beom-Gi Kim*

National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Jeonju, 54874, Republic of Korea

Abstract In recent years, new plant breeding technologies (NPBT) have had enormous effects on breeding and the agricultural industry. In particular, genome editing technology, including site-directed nuclease technologies, has progressed dramatically since the first-generation Zinc finger nucleases to the third-generation clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9). CRISPR/Cas9 technology has yielded a revolutionary breakthrough in the accurate, efficient, and user-friendly genome editing of eukaryotes. Several methods for basic research and applications, such as knock-out, base editing, gene targeting, and transcriptional activation or repression have been derived from CRISPR/Cas9 technology. Herein, we will describe the current progress in NPBTs and also summarize the crops developed by NPBTs. After analyzing the current status of NPBTs and crop development, we have proposed potential strategies for crop development using NPBTs.

Keywords New Plant Breeding Technology, CRISPR/Cas9, genome editing, crops, site directed nuclease

Received on May 15, 2019. Revised on June 15, 2019. Accepted on July 16, 2019.

* Corresponding Author (E-mail: bgkimpeace@gmail.com, Tel: +82-63-238-4614, Fax: +82-63-238-4604)

서 언

보고에 따르면 글로벌 종자시장에서 GM 종자는 2017년 현재 214억불로 전체 종자시장의 약 54.3%를 차지하고 있으며, 재배면적은 1억 8,980만 헥타르에 이르고 있다(ISAAA 2017, McDougall 2018). GM 작물은 개발과 안전성 검사 등에 막대한 비용과 10년 이상의 기간이 소요됨으로써 다국적기업 위주의 독과점 시장이 형성되어 있으며, 국내 종자기업은 GM 작물 재배 및 품종 실용화에 대한 실적이 전무하여 시장진입을 못하고 있는 상황이다. 또한, 외래 DNA를 도입하여 새로운 기능을 갖는 GM 작물에 대한 안전성 논란 및 규제, 그리고 사회 전반의 부정적 인식은 국내 종자기업이 GM 종자시장 진입을 꺼리는 주요한 요인이었다. 이러한 안전성 논란에 대응하기 위해 생명공학 분야 연구자들은 외래 DNA 잔존 없이 식물형질을 개량하고 목표 형질만 개선하기 위해 새로운 육종기술들을 개발하여왔다. 경제개발 협력기구(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)는 GMO 안전성 규제를 적용 받지 않을 가능성이 있는 새로운 육종기술 7 가지를 선정하여 new plant breeding technique (NPBT,

신육종기술)이라고 명명하여 신육종기술이라는 용어가 널리 사용되기 시작하였다(Lusser et al. 2011). 이들 7가지 기술은 site-directed nucleases (SDN), oligonucleotide directed mutagenesis (ODM), cisgenesis/intragenesis, reverse breeding (RB), RNA-directed DNA methylation (RdDM), grafting; t on GM-rootstock 과 agroinfiltration이다. 이들 기술 중 SDN 기술이 현재 가장 널리 활용되고 있으며 많은 작물이 본 기술로 개발되고 있다. 외래 유전자가 존재하지 않으면서 유전자가 교정된 작물들에 대하여 기존의 GM작물과 같은 안전성 평가 절차를 거쳐야 하는지에 대하여 전세계적으로 논의가 진행되고 있다. 2018년 미국 농무성은 유전자교정작물에 대한 안전성 평가 면제를 발표하고, 유럽사법재판소는 SDN 기술 활용 작물을 GM과 동일시하여 안전성 평가를 하여야 한다는 판결을 하여 전 세계적으로 SDN 기술 활용 작물에 대한 안전성 규제 개선 논의가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 시점에서 SDN 기술을 중심으로 신육종 기술의 현황을 분석하고, 이를 토대로 국내의 신육종 작물 개발 전략을 논의하고자 한다.

본 론

신육종 기술의 정의

OECD에서 규정한 GMO 안전성 논란을 회피할 수 있는 신육종 기술 7 가지를 정의하면 다음과 같다. 첫째, site directed nucleases (SDN, 특정 DNA 부분 절단기술)는 특정 DNA 염기서열을 인식하여 결합하는 도메인과 인식한 DNA를 절단하는 도메인으로 구성된 단백질 복합체를 이용하여 게놈 내 특정 DNA 결손, 수정 및 삽입을 유도하여 식물 형질을 변화시킬 수 있는 포괄적 기술을 의미한다. 둘째, oligonucleotide directed mutagenesis (ODM, 올리고뉴클레오타이드 삽입 변이유도기술)은 세포가 갖고 있는 상동 재조합 능력을 이용하는 기술로서 목적 돌연변이를 포함하는 20~100 bp 길이의 합성 올리고뉴클레오타이드를 세포에 주입하여 원하는 돌연변이 염기서열을 가지는 개체를 만드는 기술이다. 셋째, cisgenesis/intragenesis (동종기원)는 상호교배가 가능한 종에서 유래된 목표 유전자를 도입하고 선발 마커와 벡터 등 외래 유전자서열은 전달되지 않도록 하는 기술을 의미한다. 넷째, reverse breeding (RB, 역육종)은 RNA interference 기작을 이용하여 유용형질을 갖고 있는 heterozygote 개체의 감수분열시 재조합을 방해하여 목적형질을 갖고 있는 배우자를 선발한 후 반수체 식물체로 만들고 순차적으로 상동배체를 만드는 기술이다. 다섯째, RNA-directed DNA Methylation (RdDM, RNA주형 DNA 메틸화 기술)은 도입된 dsRNA가 short interfering RNAs (siRNA)로 잘려지고 이 siRNA가 목적 유전자의 프로모터 영역에 메틸화를 유도하여 하위단계 유전자 침묵을 일으키는 기작으로 메틸화된 DNA는 염색체 수준에서의 염기서열 변화 없이 유전자기능에 변화를 가져올 수 있는 기술이다. 여섯째, grafting on GM-root stock (유전자변형 뿌리접목기술)은 유용형질을 갖는 GM 뿌리를 대목으로 활용하여 non-GM 접순에서 non-GM 열매를 생산하는 기술이다. 일곱 번째, agro-infiltration (아그로박테리움 침투에 의한 대량발현 방법)은 재조합된 유전자를 아그로박테리움을 매개로 특정조직에 직접 감염하여 단시간에 고농도의 유전자 발현이 가능하도록 하는 기술이다. 이들 7가지 기술 중에서 현재 가장 활발히 활용되고 있는 기술은 SDN이며, SDN 기술을 이용하여 실제 새로운 형질을 가지는 다양한 작물의 개발이 보고되었다.

SDN기술의 변천사

작물 게놈의 원하는 위치에 목적하는 변이를 유도할 수 있는 유전자 교정기술은 육종분야에서는 변이를 창출할 수 있는 새로

운 기술로서 각광받고 있다(Podevin et al. 2013, Belhaj et al. 2015). Genome editing 기술은 1994년에 보고된 'DNA의 이중나선절단(double strand break, DSB)이 상동재조합(homologous recombination, HR)을 촉진한다'고 하는 연구결과에서 시작했다고 할 수 있다(Rouet et al. 1994). 세포 안에서 DNA 이중나선이 손상되면 DNA 수선기작 중 하나인 비상동 말단 결합(non-homologous end joining, NHEJ)의 수선 에러에 의해 몇 개의 염기쌍이 도입 혹은 결손된다. 이때 목표 DNA를 같이 넣어주게 되면 상동재조합에 의해 목표 DNA의 삽입이 일어나는데 이는 우연히 일어나는 상동재조합에 의존하기 때문에 재조합이 일어날 확률은 극히 낮았다. 따라서 이 재조합 발생 확률을 높이기 위한 노력이 이루어졌으며, 그 결과 식물에서 RNA/DNA 혼성 oligonucleotides를 이용하여 게놈의 특정한 위치에 염기의 치환 또는 삽입을 통한 돌연변이를 유발할 수 있는 ODM 기술로 생체 내에서 목적 유전자 특이 돌연변이를 유도하는데 성공하였다(Beetham et al. 1999).

그러나, 이 기술은 미생물 시스템과 비교하였을 때 동물과 식물세포에서는 너무 낮은 빈도의 HR 때문에 매우 비효율적이다(Hanin & Paszkowski 2003). 이에 대한 대안으로 염기서열 특이적인 핵산 분해효소 시스템인 zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) 그리고 CRISPR/Cas9으로 이어지는 동·식물 분야에서 공통적으로 활용 가능한 혁신적 SDN기술이 개발되어 유전자교정 분야의 새로운 장이 열리게 되었다(Pabo et al. 2001, Wood et al. 2011, Gaj et al. 2013, Jinek et al. 2012). 이들 유전자교정기술은 기술발전 단계에 따라 ZFN은 1세대, TALEN은 2세대, CRISPR/Cas9은 3세대기술로 구분하여 불리고 있다.

Zinc Finger Nucleases (ZFNs) 과 Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)의 개발

ZFN은 특정 염기서열을 인식하는 Zinc finger 도메인과 DNA를 절단하는 FoKI endonuclease가 결합된 형태로 구성되어있다. 각각의 Zinc finger 도메인은 3 bp를 인식하며 Zinc finger domain과 FoKI가 1개의 단량체를 구성하여 ZFN이 완성되고 한 쌍의 ZFN이 기능단위로서 작동하여 약 18~36 bp를 인식하여 자른다(Miller et al. 1985, Kim et al. 1996, Laity et al. 2001). Zinc finger domain이 목적 DNA 서열을 인식하도록 디자인을 할 수 있으므로 이 기술을 이용해 게놈상의 특정 부위에 DNA 이중나선을 절단하여 유전자 교정을 유도할 수 있다.

식물병원균 *Xanthomonas* 유래 transcription activator-like effector (TAL effector)의 DNA 결합 domain은 잘 보존된 33~35

개의 아미노산으로 이루어져 있으며 이 중 12번과 13번이 특이성과 관련된 DNA 결합 다형성을 보이는 repeat-variable di-residue (RVD)로서 특정 DNA에 결합할 수 있도록 적절하게 RVD를 조합하여 특정 염기서열에 결합할 수 있도록 디자인이 가능한 특징이 있다(Lee 2018). 이를 활용하여 TAL effector DNA 결합 도메인과 FoKI endonuclease를 결합하여 특정 염기서열을 인식하고 절단할 수 있는 TALEN 유전자교정기술을 개발하였다(Römer et al. 2007, Boch et al. 2009, Moscou & Bogdanove 2009, Bogdanove et al. 2010, Christian et al. 2010, Joung & Sander 2013). 이 기술을 이용하여 벼흰잎마름병에 대해 감수성을 보인 유전자인 Os11N3 (OsSWEET 14) 내에 3~55 bp에 해당하는 염기서열의 삽입 또는 결실을 유도하여 흰잎마름병 저항성 벼 개발을 보고하였다(Li et al. 2012). 미국의 Calyxt사는 TALEN 기술을 활용하여 고올레익산을 생산하는 대두를 개발하고, 이 대두를 이용하여 식용유를 생산 판매함으로써 작물 유전자 교정 기술을 세계 최초로 상용화 시켰다. 하지만 이들 유전체 교정 기술은 몇 가지 단점이 있어 일반 연구자들에게 널리 보급되지는 않았다. 먼저 ZFN은 이론상으로 3개의 ZF가 연결되면 9개의 염기 배열을 인식하지만, 여러 개 ZF 모듈을 연결할 때 서로가 염기 인식에 간섭을 일으켜 모든 코돈을 정확히 인식하는데 한계가 있고 5'-GNNGNNGNN-3'와 같은 서열에만 잘 작동하는 제한이 있다. 또한 설계가 어렵고 하나의 유전자 당 수천 달러로 설계 비용이 높다는 문제점과 단백질 설계에 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. TALEN은 결합 부위가 T 염기로 시작해야 하고, 메틸화 cytosine에는 작동하지 못하는 한계를 가지며 ZFN 보다 크기가 커서 세포 속에 도입하기 어려운 단점이 있다(Valton et al. 2012, Ledford 2015, Kim 2017).

CRISPR/Cas9의 개발

2012년 미국 UC Berkeley의 Jennifer Doudna 교수와 스웨덴 Umea 대학의 Charpentier 교수는 새로운 유전자 교정기술로서 CRISPR/Cas9을 보고하였다(Jinek et al. 2012). 기존의 ZFN과 TALEN 기술이 가진 문제점을 극복하고, 정확도와 효율성을 획기적으로 높이면서 실험비용이 저렴하고 사용이 편리한 CRISPR/Cas9 기술이 등장하여 SDN 기술이 본격적으로 광범위하게 사용되기 시작하였다. CRISPR/Cas9은 앞의 2 가지 기술과 비교했을 때 목표 DNA 영역 특이적인 single-guide RNA (sgRNA)가 Cas9 단백질과 결합한 후 protospacer adjacent motif (PAM) 서열 (5'-NGG-3') 및 목표 DNA를 인식하여 유전자 교정을 하게 되는 차이점이 있다(Jansen et al. 2002).

1987년 대장균 등 미생물의 DNA 염기서열을 결정하던 일본의 이시노 교수 그룹에서 우연히 21개 염기마다 회문 구조 (palindrome)가 반복되는 서열을 발견하고 CRISPR 라고 명명하였다(Ishino et al. 1987). 이 후 다른 세균에서도 CRISPR 서열을 확인하였지만 당시에는 이 반복서열의 기능을 알지 못했다(Mojica et al. 1995, Mojica et al. 2005). 그러던 중 2007년 덴마크의 요구르트 회사인 다니스코 연구진이 CRISPR가 세균의 면역반응과 관련이 있음을 최초로 밝히게 되었다. 요구르트 제조 과정에서 유산균 배양 시 bacterio-phage에 감염되면 CRISPR가 작동하여 유산균이 내성을 갖도록 면역기능을 한다는 것을 발견하였다. 내성을 갖는 유산균은 과거에 침입했던 phage의 DNA를 잘게 잘라 자신의 게놈 내에 CRISPR 서열로 보존하여 phage 침입에 대한 기억장치로 역할을 하게하였다(Barrangou et al. 2007, Cong et al. 2013). 하지만 당시에는 CRISPR가 어떤 기능으로 바이러스 공격을 퇴치하는지에 대한 구체적 기작은 밝히지 못했다. 이 후 세균 속 CRISPR 시스템에서 바이러스를 공격하는 Cas9 절단 효소를 발견하고 그 기능을 밝혔다. CRISPR/Cas9 시스템에서 Cas9를 표적부위로 위치하게 하는 역할은 trans-acting crRNA (tracrRNA)와 crRNA (crRNA)가 하고 있으며, pre-crRNA에 RNase III의 가공작용이 더해져 crRNA 형태로 만들어진다. 이 후 tracrRNA와 crRNA의 역할을 결합한 single guide RNA (sgRNA)를 개발하여 CRISPR/Cas9 유전자 편집 시스템을 완성하였다(Jinek et al. 2012). CRISPR/Cas9 기술은 미생물에서 동물과 식물로 급속히 퍼졌으며, 현재까지 *Streptococcus pyogenes*에서 분리한 Cas9을 가장 많이 유전체 교정에 활용해 오고 있다(Ran et al. 2015, Xu et al. 2014, Pan et al. 2016, Wang et al. 2016, Char et al. 2017, Jia et al. 2017, Zhang et al. 2017).

유전자교정 기술의 구조와 작용 기작

지금까지 살펴본 각 세대별 유전자교정기술과 뒤에서 언급할 CRISPR/cpf1의 모식도를 Fig. 1에 나타내었다. 제1세대와 제2세대 유전자 가위는 쌍을 이룬 단백질이 DNA를 인식해서 자르는 반면 제3세대 CRISPR/Cas9은 목표 유전자에 결합하는 guide RNA와 DNA염기서열을 자르는 가위 역할을 하는 Cas9 단백질로 구성된 RNA 유도형 절단 효소이다. CRISPR/Cas9로 절단된 염기서열은 double strand break (DSB)가 일어난 후, 크게 non-homologous end joining (NHEJ) 또는 상동재조합(homologous recombination, HR) 두 가지 형태의 수선 기작이 일어날 수 있다. NHEJ는 절단된 염기서열이 복구되는 과정에서 염기의 결손이나 삽입이 일어나 특정 유전자 기능을 완전히 없애는

Fig. 1. Schematic diagrams of genome editing techniques. ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cpf1.

현상(knock-out)이 일어나 목표 유전자 기능을 상실하는 것이며, 다른 하나인 상동재조합(HR)은 공여 DNA를 함께 도입하여 새로운 염기서열을 추가하거나 교체 할 수 있는 염기 서열의 교정이 가능하다(Fig. 2, Carroll 2014, Chen & Gao 2014, Sander & Joung 2014).

다중 유전자교정 기술의 발달

표적부위의 염기서열을 인식하기 위해 많은 노력이 필요한 ZFN이나 TALEN과 비교했을 때 CRISPR/Cas9 시스템은 비교적 쉽게 다중 표적 유전자에 대한 sgRNA를 디자인할 수 있다는 장점을 가지고 있기 때문에 다중유전자교정(multiplex genome editing)에 훨씬 효율적이다. 다중유전자교정은 여러 개의 유전자를 동시에 표적 할 수 있는 유전자교정 시스템으로, 한 번의 형질전환을 통해 동시에 서로 다른 유전자 부위에서 유전자교정이 일어나게 할 수 있는 기술을 말한다. 이 시스템을 이용하면 여러 유전자를 교정하는 데에 필요한 시간 및 노력을 아낄 수

Fig. 2. The basic mechanisms of genome editing. Nucleases (ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9 & CRISPR/Cpf1) create a double-stranded breaks (DSB) at target site repaired by non-homologous end joining (NHEJ) or homology directed repair (HDR).

있을 뿐 아니라 비슷한 기능의 유전자 군을 한 번에 교정할 수 있기 때문에 유전자 기능 연구에 획기적인 발전을 가져올 수 있을 것으로 평가된다.

2013년 미국 브로드 연구소의 Feng Zhang 교수 연구 팀은 사람 염색체의 서로 다른 유전자 EMX1 (homeobox protein) 및 PVALB (parvalbumin) 부위를 표적하는 crRNA array를 이용하여 두 부위에서 편집이 동시에 일어날 수 있음을 확인하여 다중유전자교정이 가능함을 최초로 보고하였다(Cong et al. 2013). 식물에서는 Ma et al. (2015)에 의해 단자엽인 벼와 쌍자엽인 애기장대에서의 실험으로 다중 유전자편집이 가능함을 보였고, 식물에 최적화된 코돈을 갖는 Cas9을 이용하여 편집 효율을 상당히 높일 수 있었으며, 8개의 다중 sgRNA를 효율적으로 클로닝하기 위해 golden gateway system (혹은 Gibson assembly method)을 이용하였다. 결과적으로 벼에서는 85.4%의 높은 교정 효율을 보였으며, 한 유전자 당 2개의 gRNA를 이용하여 교정하는 것이 훨씬 높은 효율을 보인다고 보고한 바 있다(Ma et al. 2015). 이외에도 다중 sgRNA 단편을 만들기 위한 다양한 시도들이 성공하였다. 진핵생물의 핵 내에서 일어나는 tRNA 가공 과정에서 RNaseP와 RNaseZ의 tRNA 5'말단과 3'말단 제거 원리를 이용한 polycistronic tRNA-gRNA 시스템, ribozyme의 자체 RNase 활성을 이용한 self-ribozyme-flanked RNAs 등이 그 예이다(Gao & Zhao 2014, Xie et al. 2015, Zetsche

et al. 2017). 또한 Csy-type (CRISPR system yersinia) ribonuclease 4 (Csy4)를 이용한 방법 등이 소개된 바 있다(Cermak et al. 2017).

최근에는 CRISPR/Cpf1을 이용해 더 간편하게 다수의 sgRNA를 전달하기 위한 방법들이 개발되고 있다. Cas9과 비교했을 때 Cpf1만이 가지고 있는 여러 장점들을 활용하여 하나의 프로모터 하부에 crRNA-array를 포함하는 비교적 짧은 서열의 cassette 만으로도 다수의 유전자 편집이 가능하다(Zetsche et al. 2017). 또한, 기존의 CRISPR/Cas9이 두 개의 전사단위로 나누어져 Cas9은 RNA pol II 프로모터, sgRNA는 RNA pol III 프로모터를 이용하여 발현되는 것과 달리 하나의 프로모터에 두 유닛을 함께 전사시켜 작동할 수 있음이 보고되었다(Wang et al. 2018).

다양한 nuclease의 개발

CRISPR/Cas 유전자교정 시스템은 multi-subunit crRNA-effector의 존재유무에 따라 class I 과 II로 나뉘며 class I에는 비교적 복잡한 복합체를 형성하는 type1과 3가 속하고, Class II에는 대중적으로 쓰이는 type2의 Cas9이 속한다. 최근에는 Cas9뿐 아니라 *Prevotella* 및 *Francisella* 1 (Cpf1)이라 부르는 type 5의 Class II nuclease인 Cas12a가 다양한 분야에서 널리 활용되고 있다(Schindele et al. 2018, Zetsche et al. 2015, Hur et al. 2016, Kim et al. 2016). Cpf1은 Cas9과 비교했을 때 다른 특성들을 많이 가지고 있다. 먼저 Cas9 nuclease는 DNase 활성만 가지고 있어, 완성된 crRNA로 가공시키기 위해서는 별도로 RNase III의 작용이 필요한데, Cpf1은 DNA 뿐만 아니라 RNA 가수분해효소 활성도 가지고 있기 때문에 RNase III가 없어도 자체의 활성만으로 crRNA의 생성이 가능하다. 또한 tracrRNA가 필요한 Cas9과 달리 crRNA만으로도 작용할 수 있어서 sgRNA (spCas9의 경우 약 ~100 bp의 길이)보다 짧은 서열로도 표적이 가능하다(Cermak et al. 2017, Zetsche et al. 2015).

Cas9는 RuvC domain과 HNH nuclease 도메인을 가지고 있어 PAM서열로부터 3 - 4 bp 떨어진 이중가닥 DNA의 가수분해 후 주로 blunt-end 말단을 만들어 내고 이는 주로 NHEJ 방법에 의해 수선된다. 이에 반해 Cpf1은 RuvC-like domain과 더불어 4 - 5 bp overhang의 sticky-end의 말단을 만들어 내는 Nuc nuclease의 활성을 가진다(Zetsche et al. 2015, Yamano et al. 2016). 이는 식물에서 상보적인 cohesive 말단을 통해 상동재조합이 일어나는 확률을 높여 유전자 단편을 삽입하거나 정교한 유전자 교정 등에 활용 할 수 있다. Cas9은 표적부위의 3' 끝에 있는 G 염기가 풍부한 5'-NGG-3'의 PAM 서열을 인식하는데, Cpf1은 표적부위 5'쪽의 T가 풍부한 PAM (5'-TTTN-3')서열을 인식

한다. 따라서 Cpf1을 이용했을 때 표적 서열의 이용범위가 더 넓어져 유전자 편집이 더 용이하다. 최근의 발견에 의하면 FnCas12a에서 5'-TTN-3', AsCas12a (*Acidaminococcus* sp. BV3L6)와 LbCas12a (*Lachnospiraceae bacterium* ND2006)에서 5'-TTTN-3'의 PAM 서열을 사용할 수 있으며, 특히 5'-TTTV-3'(V=A/G/C)에서 더 높은 편집효율을 보였다(Kim et al. 2017, Zetsche et al. 2015). 또한, 단백질공학 기법에 의해 새로이 개선된 Cpf1은 유전자교정의 효율성이나 표적특이성의 감소 없이 5'-TYCV-3', 5'-TATV-3'의 서열도 인식할 수 있다(Zetsche et al. 2015, Gao et al. 2017). Cpf1의 가장 큰 장점은 Cas9에 비하여 off-target 비율이 현저히 낮다는 것이다. 하지만, Cpf1을 이용한 유전자 교정 산물은 키메라 혹은 이질접합체의 특성을 자주 보이는데, 이것은 Cpf1의 활성이 시차를 두고 일어나기 때문이라고 짐작되며 Cpf1을 활용하기 위해 해결해야 할 과제 중 하나이다. Cpf1 이외에도 다양한 유형의 nuclease가 밝혀지고 있는데, 그 중 Class II에 속하는 type 6의 C2c2 (Cas13a)가 새롭게 각광받고 있다(Shmakov et al. 2015). C2c2는 단일가닥의 RNA를 절단할 수 있는 활성을 가지기 때문에 mRNA를 표적으로 유전자 knock-down 기술에 활용할 수 있다. 또한 식물체에 주로 침투하는 RNA Virus 대사에서 생산되는 RNA 형태의 핵산을 가수분해하는 역할에도 쓰일 수 있다. *Nicotiana benthamiana*에서 TuMV (turnip mosaic virus)와 potyvirus의 침입을 막을 수 있음을 확인하였으며 infiltration assay에서 50%의 TuMV GFP발현 감소를 보인바 있다(Aman et al. 2018).

Base editor의 개발

정교한 유전자교정을 위해서는 외부공여 DNA를 이용하는 상동재조합 방법이 있으나 그 성공률이 높지 못하다는 한계성이 있다. 이의 극복을 위해 Komor et al. (2016)이 CRISPR/Cas9 시스템과 cytidine deaminase 효소를 융합하여 cytidine을 uridine으로 치환하고 결국 C→T (or G→A)로의 염기교정에 성공하였고, 이는 base editor (BE) 혹은 유전자 연필이라 불리며 새로운 유전자교정 수단으로 떠오르고 있다(Komor et al. 2016). BE는 기존 CRISPR/Cas9의 guideRNA를 이용한 시스템은 그대로 이용하면서 nuclease 활성에 변형을 가한 dCas9 (deactivated Cas9) 또는 nCas9 (nickase Cas9)의 형태를 이용한다. Cytidine의 아민기를 제거하는 효소 4 가지(인간 AID 및 APOBEC3G, 생쥐 APOBEC1, 그리고 칠성장어 CDA1)중 생쥐 APOBEC1의 활성이 가장 높다고 평가되었으며, XTEN linker의 도입으로“activity window”가 향상(3~6 nt) 된다는 사실에 기초해 초기의 BE1은 APOBEC1-X TEN-dCas9의 형태를 띄었다. 그리고 BE에 UGI (uracil glycosylase)

lase inhibitor)를 함께 더하면 DNA에 존재하는 uracil을 교정하기 위한 base-excision repair 작용이 저해되어 교정성공률을 15~75%까지 상향시킬 수 있음이 보고되었다(BE2: APOBEC1-XTEN-dCas9-UGI)(Komor et al. 2016). 가장 보편적인 형태인 BE3는 nickase 활성을 추가하여, 교정되지 않은 가닥에 nick을 유기시켜 세포 내 복구 시스템을 활용할 수 있도록 하였다(Komor et al. 2016, Komor et al. 2017). 식물에서는 동물에 비해 상동재조합의 효율이 매우 낮기 때문에 기존의 CRISPR/Cas시스템 기반으로 생성된 indel을 이용한 유전자 기능연구를 초점으로 하였지만, 대부분의 식물육종에 있어서 중요한 형질이 single nucleotide polymorphisms (SNP)에 의한다는 사실을 감안하면 BE의 도입이 필수적이다(Huang et al. 2010, Hu et al. 2015). 식물에서는 벼, 밀, 옥수수, 그리고 토마토에 BE 적용 연구가 진행되었는데, 그 중에서도 벼에서의 연구가 가장 활발하다. Li et al. (2018)의 연구에 의해 rice base editor: APOBEC1-XTEN-dcas9-UGI-NLS (rBE3)와 hAID^{*}- Δ -XTEN-dcas9-UGI-NLS (rBE5) 및 더 진전된 형태의 BE 들도 소개되었다(Lu & Zhu 2017, Ren et al. 2017, Shimatani et al. 2017, Zong et al. 2017, Li et al. 2018). 최근에는 Adenine을 Guanine으로 치환하는 tRNA adenosine deaminase (TadA)와 nCas9의 결합으로 Adenine base editor (ABE)도 등장하였다. Gaudelli 등은 단백질 공학 등을 이용해 발전된 형태의 ABE7를 만들었고, 이를 통해 인간세포주에서 50%의 효율로 A-T 염기쌍을 G-C 염기쌍으로 치환하였다고 밝혔다(Gaudelli et al. 2017). 벼의 ABE 연구에서 ecTadA와 ecTadA*7.10 (돌연변이형태)을 32-아미노산의 linker로 연결시킨 후, 이를 spCas9 (D10A)의 N-말단에 융합시키고, virD2 NLS를 spCas9 (D10A)의 C-말단에 더해 Adenine base editor plant version1 (ABE-P1)를 만들었다. 이를 이용하여 IPA1 (OsSPL14)유전자와 SLR1 유전자 등에 염기교정을 시도한 결과 각각 26%와 12.5%의 교정율을 보였고, 목표로 한 protospacer내의 치환된 A의 범위가 포유동물에서의 범위보다 더 넓은 것으로 나타났다(Hua et al. 2018).

CRISPR-activator/repressor의 개발

CRISPR/Cas9을 이용하면 쉽고 간편하게 유전자 부위를 표적할 수 있기 때문에 유전자 교정 이외에 유전자 발현 조절 연구분야에도 다양하게 활용되고 있다. Cas9의 활성부위 변형으로 핵산가수분해 능력을 없앤 dCas9 (dead Cas9: D10A, D840A)에 activator, repressor, acetyltransferase 등의 여러 조절 단백질을 결합하면 표적유전자의 발현을 조절할 수 있다. VP64의 C-말단 도메인과 dCas9을 결합하여 HEK (human embryonic kidney) 293T 세포

에 발현시킨 결과 목표 유전자의 발현이 증가되었다(Perez-Pinera et al. 2013). 애기장대에서 dCas9-VP와 gRNA를 이용하여 promoter 부위를 표적으로 했을 때 promoter 하부 유전자의 발현이 증가됨을 보였고, 또한 다중 sgRNAs를 이용하였을 때도 다양한 유전자의 발현이 함께 증가하였다(Lowder et al. 2015). VP 이외에 EDLL 및 TAL effector 등의 activator도 위와 같은 양상을 보였다(Lowder et al. 2015, Piatek et al. 2015). Repressor로는 SRDX repression 도메인과 dCas9을 결합한 실험 결과 하부유전자의 발현이 감소하였다(Lowder et al. 2015, Piatek et al. 2015). Qi et al. (2013)은 이러한 유전자 저해방법을 CRISPR interference (CRISPRi)라고 명명하였다. 이뿐만 아니라 후성조절 (epigenetic regulation)도 가능하다고 밝혀진 바 있다. Hilton et al. (2015)의 보고에 의하면 인간 acetyltransferase p300의 촉매중심(catalytic core)에 융합된 dCas9 단백질로 구성된 프로그램 가능한 CRISPR/Cas9-기반 acetyltransferase가 표적부위 히스톤 H3 lysine 27의 아세틸화를 촉매하여 강력한 전사 활성화를 보였고, Kearns et al. (2015)은 dCas9-LSD1 (히스톤 demethylase)이 유전자 전사를 저해하는 것을 확인하였다(Hilton et al. 2015, Kearns et al. 2015). Cpf1은 nuclease의 기작이 Cas9과 달라 RuvC 도메인만 변형시켜도 nuclease 능력을 소실시켜 더 용이하게 dead Cpf1 (dCpf1)을 만들 수 있다(Yamano et al. 2016). 또한, Cpf1의 PAM 서열에 티아민이 풍부하기 때문에 AT 염기가 풍부한 프로모터 서열을 표적하기에 적합하다. 식물에서는 애기장대를 모델로 한 연구에서 dead *Acidaminococcus* sp. BV3L6 Cpf1 (dAsCpf1) 과 dead *Lachnospiraceae bacterium* Cpf1 (dLbCpf1)의 활성을 비교하였는데, 두 종류의 불활성화된 Cpf1과 SRDX를 각각 융합하여 miRNA159b의 전사조절을 관찰했을 때 두 종류의 Cpf1-SRDX 모두에서 전사저해 활성을 나타냈고, 그 능력은 dAsCpf1에서 훨씬 더 높게 나타났다(Tang et al. 2017).

Cas13 (C2c2)의 HEPN 도메인을 불활성화시켜 만든 dCas13은 RNA에 결합하는 능력이 있기 때문에 Cas9이나 Cpf1과는 다른 부분에서 응용될 수 있다. Abudayyeh 등은 동물세포에서 dLwaCas13a (dead *Leprotichia wadei* Cas13a)과 형광단백질을 결합하여 살아있는 세포에서 mRNA의 이동을 관찰하였다(Abudayyeh et al. 2017).

유전자교정기술을 활용한 육종소재 개발 사례

작물의 생산성, 저항성, 기능성 증진을 목적으로 ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 기술이 활용되어 다양한 성공사례가 보고되고 있다. 기능성 증진과 작물의 생산성 증진 크게 두 개의 형질로 구분하여 기술하였다.

유전자교정기술을 활용한 기능성 증진 작물 개발

벼, *Camelina*, 유채와 대두에서 *FAD* 유전자를 제거하여 지방산 조성을 변경한 작물이 발표되었으며 특히 *Camelina sativa*에서는 oleic acid 함량을 16~50%까지 증가시켰다고 보고하였다(Jiang et al. 2017, Abe et al. 2018, Okuzaki et al. 2018). 미국의 Calyxt 사에서는 TALEN 기술을 이용하여 *FAD* 유전자를 제거하여 고올레익산 생산 대두를 제작하였으며 계약재배를 통하여 생산한 유전자교정 대두를 이용하여 식용유를 제작 시판하여 세계 최초로 유전자교정 작물의 상업화에 성공하였다. 미세조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*에서 *CHLOROPLAST SIGNAL RECOGNITION PARTICLE RECEPTOR (CpFTSY)* 유전자와 *ZEAXANTHIN EPOXIDASE (ZEP)* 유전자를 동시에 결손 시켜 zeaxanthin이 집적되고 광합성 효능이 증진된 계통을 개발하였다(Baek et al. 2016). 토마토에서 lycopene대사에 관여하는 *STAY GREEN 1 (SGR1)*, *LYCOPENE-ε CYCLASE (LCY-E)*, *β-LYCOPENE CYCLASE (BLC)*, *LYCOPENE β-CYCLASE 1 (LCY-B1)*, *LYCOPENE β-CYCLASE 2 (LCY-B2)* 등 5종의 유전자에 대하여 CRISPR/Cas9 다중유전자교정을 수행한 결과 과실에 lycopene 함량이 대조구에 비하여 5.1배 증가한 토마토 계통을 개발하였다고 보고하였다(Li et al. 2018). 플라보노이드 생합성 대사 경로의 주요 효소인 SICHs의 발현을 조절하는 전사인자인 SIMYB12를 CRISPR/Cas9 시스템으로 교정하여 naringenin chalcone의 축적이 감소된 분홍색 토마토를 개발하였다(Deng et al. 2018). 밀에서 celiac disease의 주요한 epitope으로 알려진 α-GLIADIN의 33-mer 펩타이드를 목표로 CRISPR 유전자 교정을 시도하여 α-GLIADIN 함량이 현저하게 줄어들고 면역반응이 85% 이하로 감소된 밀을 개발하였다(Sánchez-León et al. 2018). Starch branching 효소 유전자인 SBEIIB를 Knock-out 시켜 아밀로스 함량이 대조구에 비하여 25% 증가하고 저항성 전분 함량은 9.8% 증가된 벼를 개발하였다(Sun et al. 2017). 식물 특이적인 부가적 당쇄사슬을 제거하기 위하여 담배 현탁 배양 세포에서 β(1,2)-XYLOSYLTRANSFERASE (XYLT)와 α(1,2)-FUCOSYLTRANSFERASE (FUCT) 유전자를 교정하였다. 재조합 DNaseI을 교정한 세포에서 발현시켜 N-linked β(1,2)-xylose와 α(1,3)-fucose 잔기가 없는 단백질이 생산됨을 확인하였다(Hanania et al. 2017). 토마토에서 γ-aminobutyric acid (GABA) 생산을 증진시키기 위하여 생합성 경로에 있는 5개의 유전자에 대하여 multiplex 유전자 교정을 시도하여 다양한 조합의 돌연변이를 제작하고 이들에 대한 GABA 축적을 조사한 결과 현저한 증가를 확인하였다(Li et al. 2018). 나팔꽃에서 안토시아닌 생합성에 주요

한 유전자인 *DIHYDROFLAVONOL-4-REDUCTASE-B (DFR-B)*를 대상으로 유전자 교정을 시도하였다. 안토시아닌 함량이 낮아져 꽃색이 흰색이나 옅은 보라색으로 나타내었으며, 꽃잎의 노화에 관여하는 *NAC* 전사인자인 *EPHEMERAL1 (EPL1)*을 목표로 유전자 교정을 수행한 결과 노화가 현저하게 지연됨을 확인하였다(Watanabe et al. 2017, Shibuya et al. 2018).

유전자교정기술을 활용한 생산성 증진 작물 개발

바이러스 복제에 필수적인 *EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E (eIF4E)* 유전자의 아미노말단과 카르복실 말단 부위를 목표로 유전자교정을 실시하여 cucumber vein yellowing virus, Zucchini yellow mosaic virus 및 Papaya ring spot mosaic virus-W 3종의 바이러스에 대한 저항성 오이를 개발하였다(Chandrasekaran et al. 2016). 벼 RTSV (rice tungro spherical virus)에 감수성인 IR64 품종을 대상으로 *TRANSLATION INITIATION FACTOR 4 GAMMA (eIF4G)* 유전자의 RTSV와 연관된 것으로 알려진 3개의 아미노산 잔기인 YVV를 중심으로 CRISPR/Cas9 유전자교정을 시도한 결과 인접 아미노산인 NL 부위에 in frame 돌연변이가 일어났을 경우 RTSV 저항성을 획득하였다(Macovei et al. 2018). 중국에서 널리 재배되고 있는 Kuiku131 품종에서 *ERF922 (ethylene responsive factors 922)* 전사인자를 CRISPR/Cas9으로 knock-out 시켜 도열병저항성 벼를 개발하였다(Wang et al. 2016). 감귤궂양병(citrus canker)에 대한 저항성 계통을 개발하기 위하여 감수성 유전자인 *CsLOB1*를 교정하여 저항성 계통을 개발하였으며, 애기장대에서 기공개폐에 주요한 역할을 수행하는 공변세포의 *PROTON ATPase (OST2)* 유전자를 target으로 CRISPR 유전자 교정을 시도하여 가뭄저항성 작물 개발 가능성을 제시하였다(Osakabe et al. 2016, Peng et al. 2017). 옥수수의 에틸렌 생합성의 negative regulator인 *ARGOS8* 유전자의 프로모터를 발현양이 보다 높은 *GOS2* 유전자 프로모터로 교체하기 위하여 HR기작을 이용한 CRISPR 유전자 교정에 성공하였다. 또한 유전자 교정 옥수수는 포장에서 생식생장기 가뭄 처리시 대조구에 비하여 수량이 증가하였으며, 무처리시에는 수량의 변화가 없음을 확인하였다(Shi et al. 2017). 토마토 *J2 (jointless)*, *EJ2 (enhancer-of-jointless2)*, *S (compound inflorescence 2)* 유전자를 교정하여 착과수가 증대하여 수량이 증가한 결과를 얻었다(Soyk et al. 2017). 토마토의 *SELF-PRUNING 5G (SP5G)* 유전자를 교정하여 조기개화 계통을 확보하였다. 벼 ABA 수용체 유전자 전체를 유전자 교정하여 수량성이 증진된 벼 계통을 선발하였다(Soyk et al. 2017, Miao et al. 2018). F₁ 잡종벼

Table 1. Genome editing crops under 'Am I regulated' of USDA

Date	Applicant	Organisms	Trait	Technique	Modification
2011.12.6	Collectis S.A./collectis Plant Science	Plants	-	meganuclease	Class #1 targeted gene Knock-outs
2012.3.8	Dow AgroSciences	Plants	-	ZFN	Targeted gene deletion
2012.3.8	Dow AgroSciences	Corn	Reduced phytate production	ZFN	Deletion at the IPK1
2014.8.28	Collectis Plant Sciences	Potato	-	TALEN	Targeted gene knock-out
2015.5.8	Collectis Plant Sciences	Soybean	High oleic acid	TALEN	Deletion of two genes
2015.5.21	Collectis Plant Sciences	Soybean	High oleic acid	TALEN	Deletion of two genes
2015.5.29	Iowa state Univ	Rice	Increased disease resistance	TALEN	Deletion of promoter of the two genes
2015.11.12	Agrivida	Corn	Increased Starch	Meganuclease	Deletion
2016. 2.11	Calyxt, Inc.	Wheat	Improved disease resistance to powdery mildew	TALEN	Knockout of MLO
2016. 4. 13	Penn State	Mushroom	Anti-browning	CRISPR/Cas9	Small deletion in a polyphenol oxidase gene
2016.4.18	Dupont Pioneer	Corn	Waxy	CRISPR/Cas9	Targeted deletion of waxy gene
2016.9.15	Calyx. Inc.	Potato	Anti-browning	TALEN	PPO-KO
2016.12.2	Simplot Plant Sciences	Potato	Reduced Black Spot	TALEN	PPO5-KO
2017.4.7	Donald Danforth Plant Science Center	Setaria viridis	Delayed flowering	CRISPR/Cas9	Deactivation of Zea may IDI homolog
2017.8.29	Yield 10 Bioscience	Camelina sativa	-	CRISPR/Cas9	Single nucleotide insertion in all three copies of the target gene
2017.9.25	Calyxt, Inc	Alfafa	Improved nutritional quality	TALEN	Deletion of target gene
2017.10.16	USDA ARS	Soybean	Drought and Salt tolerance	CRISPR/Cas9	Deactivation of double stranded RNA binding protein 2 (Drb2a and Drb2b)
2017.12.29	North Carolina State University	Tobacco	Low levels of Nicotine	Meganuclease	Beberine Bridge Enzyme like genes(BBL)
2018.1.16	DuPont Pioneer	Corn	Improved Resistance to Northern Leaf Blight	CRISPR/Cas9	NLB-sensitive allele of the Corn NLB18 gene
2018.3.19	Benson Hill Biosystems, Inc	Corn	Yield increase	Gene editing but undisclosed	Alteration of two codon of target gene
2018.3.20	Calyx, Inc	Wheat	Nutritionally-enhanced wheat	TALEN	Targeted knockout
2018.5.14	University of Florida	Tomato	Fruit comes cleanly off the plant when harvested	CRISPR/Cas9	Deletion in J2 gene
2018.7.12	Iowa State University	Maize	-	CRISPR/Cas9	-
2018.8.6	Illinois State University	Pennycress	-	CRISPR/Cas9	-
2018.9.27	Yield 10 Bioscience	Camelina	-	CRISPR/Cas9	-

생산에 중요한 음성불임계통 제작을 위해 thermo-sensitive male sterility (TGMS)에 관여하는 것으로 알려진 TMS5 유전자의 유전자교정을 수행하여 TGMS 계통을 선발하였으며, 유채 종자의 내탈립성을 증진시키기 위하여 2종의 ALCATRAC homolog를 대상으로 유전자 교정을 수행하여 대조구에 비하여 내탈립성이 현저히 증가함을 보고하였다(Zhou et al. 2016, Braatz et al. 2017).

미국 농무성의 안전성 심사 제외 유전자교정 작물 현황

미국 농무성은 유전자 교정 기술이 적용된 작물 중 외래유전자 단편이 존재하지 않는 작물들은 미국 농무성(USDA) 동식물검역소(APHIS)의 홈페이지에 개설된 “Am I regulated?” process 프로그램을 통하여 실험과정 또는 개발과정에 대하여 자료를 제출하고 심의 및 자문을 통하여 안전성 심사과정에서 제외여부를 판단한다. 따라서, 미국 농무성 동식물검역소의 Am I regulated? 목록을 보면 상업적 목적으로 개발된 유전자교정 작물의 현황을 파악할 수 있다. 2011년부터 2018년 11월까지 미국 농무성 동식물검역소로부터 안전성 심사 제외된 유전자 교정 기술 적용 작물을 아래와 같이 조사하여 정리하였다(Table 1). 자세한 유전자 교정 방법 등이 기술되어 있지 않은 경우가 많아 파악할 수 있는 한도에서 정보를 정리하였다. 밀감 녹화병 저항성 증진을 위하여 CRISPR/Cas9 기술을 사용 하였으며(플로리다 주 농업회사 Southern Garden Citrus), TALEN 기술을 이용하여 기름에 튀길 때 발생하는 acrylamide 형성을 억제하는 acrylamide free 감자를 개발하였다(Collectis plant sciences). ZFN 기술을 활용하여 옥수수종자의 phytic acid 함량을 낮추어 사료의 품질을 높였다(Dow AgroSciences). TALEN 기술을 이용하여 콩 종자 내 oleic acid 함량을 높였다(Collectis Plant Sciences). 옥수수의 WAXY 유전자를 CRISPR/Cas9을 이용 교정하여 고 amylopectin 옥수수 종자를 개발하였다(Dupont Pioneer). CRISPR/Cas9을 이용하여 양송이 버섯의 POLYPHENOL OXIDASE를 교정함으로써 갈변방지 양송이를 개발하였다(Pennsylvania University, Dr. Yinong Yang).

유전자교정이외의 신육종기술 적용 육종소재 개발 사례

ODM 기술은 SDN을 제외하면 가장 많이 활용된 유전자 교정기술로서 벼와 토마토에서 ACETOLACTATE SYNTHASE 유전자를 교정하여 체초제 저항성 작물을 개발하였다는 보고가 있으며, ODM 기술과 SDN 기술을 함께 사용하여 5'-ENOLPYRUVYL-SHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE 유전자를 교정하여 높은 효율로 체초제 저항성 아미를 개발하였다고 보고하였다(Sauer et al. 2016).

Cisgenesis/Intragenesis

Cisgenesis를 활용하여 곰팡이(Phytophthora infestans) 저항성 감자를 와게닝겐 대학에서 개발하여 상업적 감자품종의 계통 성능을 시험 평가 중이다(Devi et al. 2013).

Reverse Breeding

기업에서의 연구 활동은 활발하지 않으나, 네덜란드 와게닝겐 대학, 미국 UC Davis 등 학계를 중심으로 애기장대 등 모델 식물과 옥수수를 대상으로 연구를 진행 중에 있다(Wijnker et al. 2012, Guan et al. 2015).

Grafting

아직 실용적인 활용이 보고된 바는 없으나 국내 연구진이 세계 최초로 cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)에 저항성을 갖는 GM 수박대목 개발을 보고하였다(Park et al. 2005).

결론

유전자교정 기술은 작물 계능상의 목표위치에 원하는 변이를 저비용, 고효율로 신속하게 유도할 수 있는 혁신적인 기술이며, 이를 활용하여 육성된 작물은 기존의 GM작물과 차별화되어 안전성 규제를 벗어날 가능성이 높아지고 있다. 따라서, 전 세계적으로 본 기술을 활용한 작물 개발에 많은 투자가 이루어지고 있으며, 지식재산권 선점을 위한 경쟁이 치열해지고 있다. 글로벌 종자기업이 독점했던 GM작물의 전철을 밟지 않기 위해서는 첫째, 신육종작물개발과 관련된 기술 요소들에 관한 지식재산권을 선제적으로 확보하고, 둘째, 국내 민간 종자기업이 기술 경쟁력을 갖고있는 품목에 집중하여 신육종작물을 개발하되 셋째, 국민 눈높이에 맞는 실용화 전략으로 사회적 반발을 최소화할 수 있도록 개발 전략을 수립하여야 한다. 넷째, 유전자 교정 작물의 안전성 규제에 대한 국가적 논의를 진행하여 발전된 기술에 적합한 법과 제도의 정비가 이루어져야 할 것이다. 이러한 전략을 통하여 신육종 기술을 활용한 작물 개발 및 실용화로 국내 종자기업의 글로벌 경쟁력을 확보하여 농업 분야의 새로운 성장 동력화할 수 있을 것이다.

사사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발 사업(과제번호: PJ01246303)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

1. Abe K, Araki E, Suzuki Y, Toki S, Saika H. 2018. Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. *Plant Physiol Biochem* 18: 30191-30198.
2. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, Verdine V, Cox DBT, Kellner MJ, Regev A, Lander ES, Voytas DF, Ting AY, Zhang F. 2017. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature* 550: 280-284.
3. Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding S, Mahfouz M. 2018. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol* 19: 1.
4. Baek K, Kim DH, Jeong J, Sim SJ, Melis A, Kim JS, Jin ES, Bae S. 2016. DNA-free two-gene knockout in *chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Sci Rep* 6: 30620.
5. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709-1712.
6. Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD. 1999. A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 8774-8778.
7. Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekrasov V. 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol* 32: 76-84.
8. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509-1512.
9. Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T. 2010. TAL effectors: Finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol* 13: 394-401.
10. Braatz J, Harloff HJ, Mascher M, Stein N, Himmelbach A, Jung C. 2017. CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Physiol* 174: 935-942.
11. Carroll D. 2014. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem* 83: 409-439.
12. Cermak T, Curtin SJ, Gil-Humanes J, Cegan R, Kono TJY, Konecna E, Belanto JJ, Starker CG, Mathre JW, Greenstein RL, Voytas DF. 2017. A Multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *Plant Cell* 29: 1196-1217.
13. Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Aarazi T, Gal-On A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol* 17: 1140-1153.
14. Char SN, Neelakandan AK, Nahampun H, Frame B, Main M, Spalding MH, Becraft PW, Meyers BC, Walbot V, Wang K, Yang B. 2017. An agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J* 15: 257-268.
15. Chen K, Gao C. 2014. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep* 33: 575-583.
16. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Boqdanove AJ, Voytas DF. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186: 757-761.
17. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini L. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823.
18. Deng L, Wang H, Sun C, Li Q, Jiang H, Du M, Li CB. 2018. Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system. *J Gen Genom* 45: 51-54.
19. Devi EL, Chongtham SK, Holeyachi P, Kousar N, Singh M, Behera C, Telem RS, Singh NA, Wani SH. 2013. Cisgenesis and Intragenesis: Twin sisters for crop improvement. *Res J Agric Fores Sci* 1: 22-26.
20. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31: 397-405.
21. Gao L, Cox DBT, Yan WX, Manteiga JC, Schneider MW, Yamano T, Nishimasu H, Nureki O, Crosetto N, Zhang F. 2017. Engineered cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nat Biotechnol* 35: 789-792.
22. Gao Y, Zhao Y. 2014. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J Integr Plant Biol* 56: 343-349.
23. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. 2017. Programmable base editing of A · T to G · C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551: 464-471.
24. Guan Y, Wang B, Feng Y, Li P. 2015. Development and application of marker-assisted reverse breeding using hybrid maize germplasm. *J Integr Agric* 14: 2538-2546.

25. Hanania U, Ariel T, Tekoah Y, Fux L, Sheva M, Gubbay Y, Weiss M, Oz D, Azulay Y, Turbovski A, Forster Y, Shaaltiel Y. 2017. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins. *Plant Biotechnol J* 15: 1120-1129.
26. Hanin M, Paszkowski J. 2003. Plant genome modification by homologous recombination. *Curr Opin Plant Biol* 6: 157-162.
27. Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* 33: 510-517.
28. Hu B, Wang W, Ou S, Tang J, Li H, Che R, Zhang Z, Chai X, Wang H, Wang Y, Liang C, Liu L, Piao Z, Deng Q, Deng K, Xu C, Liang Y, Zhang L, Li L, Chu C. 2015. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nat Genet* 47: 834-838.
29. Hua K, Tao X, Yuan F, Wang D, Zhu JK. 2018. Precise A · T to G · C base editing in the rice genome. *Mol Plant* 11: 627-630.
30. Huang X, Wei X, Sang T, Zhao Q, Feng Q, Zhao Y, Li C, Zhu C, Lu T, Zhang Z, Li M, Fan D, Guo Y, Wang A, Wang L, Deng L, Li W, Lu Y, Weng Q, Liu K, Huang T, Zhou T, Jing Y, Li W, Lin Z, Buckler ES, Qian Q, Zhang QF, Li J, Han B. 2010. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nat Genet* 42: 961-967.
31. Hur JK, Kim K, Been KW, Baek G, Ye S, Hur JW, Ryu SM, Lee YS, Kim JS. 2016. Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 34: 807-808.
32. ISAAA. 2017. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: Biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. ISAAA Brief No. 53. ISAAA, Ithaca, NY.
33. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the IAP gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in escherichia coli, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169: 5429-5433.
34. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43: 1565-1575.
35. Jia H, Zhang Y, Orbović V, Xu J, White FF, Jones JB, Wang N. 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J* 15: 817-823.
36. Jiang WZ, Henry IM, Lynagh PG, Comai L, Cahoon EB, Weeks DP. 2017. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnol J* 15: 648-657.
37. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821.
38. Joung JK, Sander JD. 2013. TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 49-55.
39. Kearns NA, Pham H, Tabak B, Genga RM, Silverstein NJ, Garber M, Maehr R. 2015. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat Methods* 12: 401-403.
40. Kim EJ. 2017. CRISPR/Cas9 gene editing. LG Economic Research Institute.
41. Kim HK, Song M, Lee J, Menon AV, Jung S, Kang YM, Choi JW, Woo E, Koh HC, Nam JW, Kim H. 2017. In vivo high-throughput profiling of CRISPR-Cpf1 activity. *Nat Methods* 14: 153-159.
42. Kim Y, Cheong SA, Lee JG, Lee SW, Lee MS, Baek IJ, Sung YH. 2016. Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 34: 808-810.
43. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1156-1160.
44. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533: 420-424.
45. Komor AC, Zhao KT, Packer MS, Gaudelli NM, Waterbury AL, Koblan LW, Kim YB, Badran AH, Liu DR. 2017. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci Adv* 3: eaao4774.
46. Laity JH, Lee BM, Wright PE. 2001. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* 11: 39-46.
47. Ledford H. 2015. CRISPR, the disruptor. *Nature* 522: 20-24.
48. Lee SW. 2018. Strengthening the competitiveness of agricultural biotechnology through practical application of gene editing technology. *J Plant Biotechnol* 45: 155-170.

49. Li C, Zong Y, Wang Y, Jin S, Zhang D, Song Q, Zhang R, Gao C. 2018. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol* 19: 59.
50. Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, Tian H, Luo Y, Zhu H. 2018. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnol J* 16: 415-427.
51. Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 30: 390-392.
52. Li X, Wang Y, Chen S, Tian H, Fu D, Zhu B, Luo Y, Zhu H. 2018. Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Front Plant Sci* 9: 559-571.
53. Lowder LG, Zhang D, Baltes NJ, Paul JW, Tang X, Zheng X, Voytas DF, Hsieh TF, Zhang Y, Qi Y. 2015. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol* 169: 971-985.
54. Lu Y, Zhu JK. 2017. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* 10: 523-525.
55. Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E. 2011. New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development. JRC Reference Reports: EUR 24760 EN. European Commission. pp. 4-23.
56. Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu YG. 2015. A Robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot Plants. *Mol Plant* 8: 1274-1284.
57. Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, Jonson GB, Slamet-Loedin I, Cermak T, Voytas DF, Choi IR, Chadha-Mohanty P. 2018. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to rice tungro spherical virus. *Plant Biotechnol J* 16: 1918-1927.
58. Miao C, Xiao L, Hua K, Zou C, Zhao Y, Bressan RA, Zhu JK. 2018. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 6058-6063.
59. Miller J, McLachlan AD, Klug A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *xenopus oocytes*. *EMBO J* 4: 1609-1614.
60. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60: 174-182.
61. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodriguez-Valera F. 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the archaea *haloferax mediterranei* and *haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol* 17: 85-93.
62. Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326: 1501.
63. Okuzaki A, Ogawa T, Koizuka C, Kaneko K, Inaba M, Imamura J, Koizuka N. 2018. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *brassica napus*. *Plant Physiol Biochem* 131: 63-69.
64. Osakabe Y, Watanabe T, Sugano SS, Ueta R, Ishihara R, Shinozaki K, Osakabe K. 2016. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Sci Rep* 6: 26685.
65. Pabo CO, Peisach E, Grant RA. 2001. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem* 70: 313-340.
66. Pan CC, Ye L, Qin LI, Liu X, He Y, Wang X, Chen LI, Lu G. 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Sci Rep* 6: 247-255.
67. Park SM, Lee JS, Jeal S, Jeon BY, Jung M, Park YS, Han SL, Shin YS, Her NH, Lee JH, Lee MY, Ryu KH, Yang SG, Han CH. 2005. Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus) infection. *Plant Cell Rep* 24: 350-356.
68. Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, Wu L, Yao L, Zou X. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnol J* 15: 1509-1519.
69. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, Thakore PI, Glass KA, Ousterout DG, Leong KW, Guilak F, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. 2013. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods* 10: 973-976.
70. Phillips McDougall P. 2018. Evolution of the seed market between 1999 and 2017. Phillips McDougall's Seed Service.
71. Piatek A, Ali Z, Baazim H, Li L, Abulfaraj A, Al-Shareef S, Aouida M, Mahfouz MM. 2015. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol J* 13: 578-589.
72. Podevin N, Davies HV, Hartung F, Nogué F, Casacuberta JM.

2013. Site-directed nucleases: A paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends Biotechnol* 31: 375-383.
73. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152: 1173-1183.
74. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. 2015. *In vivo* genome editing using *staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520: 186-191.
75. Ren B, Yan F, Kuang Y, Li N, Zhang D, Lin H, Zhou H. 2017. A CRISPR/Cas9 toolkit for efficient targeted base editing to induce genetic variations in rice. *Sci China Life Sci* 60: 516-519.
76. Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauß T, Bonas U, Lahaye T. 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 318: 645-648.
77. Rouet P, Smih F, Jasin M. 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Bio* 14: 8096-8106.
78. Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Gimenez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F. 2018. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J* 16: 902-910.
79. Sander JD, Joung JK. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32: 347-355.
80. Sauer NJ, Narvaez-Vasquez J, Mozoruk J, Miller RB, Warburg ZJ, Woodward MJ, Mihiret YA, Lincoln TA, Segami RE, Sanders SL, Walker KA, Beetham PR, Schopke CR, Gocal GF. 2016. Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. *Plant Physiol* 170: 1917-1928.
81. Schindele P, Wolter F, Puchta H. 2018. Transforming plant biology and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13. *FEBS Lett* 592: 1954-1967.
82. Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte H, Archibald R, Yang M, Hakimi S, Mo H, Habben J. 2017. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J* 15: 207-216.
83. Shibuya K, Watanabe K, Ono M. 2018. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the EPHEMERAL1 locus that regulates petal senescence in Japanese morning glory. *Plant Physiol Biochem* 131: 53-57.
84. Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T, Kondo A. 2017. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol* 35: 441-443.
85. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. 2015. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell* 60: 385-397.
86. Soyk S, Lemmon ZH, Oved M, Fisher J, Liberatore KL, Park SJ, Goren A, Jiang K, Ramos A, van der Knaap E, Eck JV, Zamir D, Eshed Y, Lippman ZB. 2017. Bypassing negative epistasis on yield in tomato imposed by a domestication gene. *Cell* 169: 1142-1155.
87. Soyk S, Muller NA, Park SJ, Schmalenbach I, Jiang K, Hayama R, Zhang L, Eck JV, Jimenez-Gomez JM, Zachary B, Lippman ZB. 2017. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nat Genet* 49: 162-170.
88. Sun YW, Jiao GA, Liu ZP, Zhang X, Li JY, Guo XP, Du WM, Du JL, Francis F, Zhao YD, Xia LQ. 2017. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front Plant Sci* 8: 298-313.
89. Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, Zhong Z, Chen Y, Ren Q, Li Q, Kirkland ER, Zhang Y, Qi Y. 2017. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat Plants* 3: 17103.
90. Valton J, Dupuy A, Daboussi F, Thomas S, Maréchal A, Macmaster R, Melliand K, Juillerat A, Duchateau P. 2012. Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J Biol Chem* 287: 38427-38432.
91. Wang F, Wang C, Liu P, Lei P, Hao W, Gao Y, Guang Y, Zhao K. 2016. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PLoS One* 11: e0154027.
92. Wang M, Mao Y, Lu Y, Wang Z, Tao X, Zhu JK. 2018. Multiplex gene editing in rice with simplified CRISPR-Cpf1 and CRISPR-Cas9 systems. *J Integr Plant Biol* 60: 626-631.
93. Watanabe K, Kobayashi A, Endo M, Sage-Ono K, Toki S, Ono M. 2017. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B) locus in the

- Japanese morning glory *Ipomoea* (Pharbitis) *nil*. Sci Rep 7: 10028-10037.
94. Wijnker E, Van Dun K, de Snoo CB, Lelivelt CL, Keurentjes JJ, Naharudin NS, Ravi M, Chan SW, de Jong H, Dirks R. 2012. Reverse breeding in *arabidopsis thaliana* generates homozygous paprental lines from a heterozygous plant. Nat Genet 44: 467-471.
95. Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, Amora R, Miller JC, Leung E, Meng X, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Umov FD, Meyer BJ. 2011. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. Science 333: 307.
96. Xie K, Minkenberg B, Yang Y. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proc Natl Acad Sci USA 112: 3570-3575.
97. Xu R, Li H, Qin R, Wang L, Li L, Wei P, Yang J. 2014. Gene targeting using the *agrobacterium tumefaciens* mediated CRISPR-Cas system in rice. Rice 7: 5.
98. Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, Fedorova I, Nakane T, Makarova KS, Koonin EV, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. 2016. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. Cell 165: 949-962.
99. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided 624 endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell 163: 759-771.
100. Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, DeGennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Wu WY, Scott DA, Severinov K, van der Oost J, Zhang F. 2017. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. Nat Biotechnol 35: 31-34.
101. Zhang Y, Bai Y, Wu G, Zou S, Chen Y, Gao C, Tang D. 2017. Simultaneous modification of three homologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. Plant J 91: 714-724.
102. Zhou H, He M, Li J, Chen L, Huang Z, Zheng S, Zhu L, Ni E, Jiang D, Zhao B, Zhuang C. 2016. Development of commercial thermosensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system. Sci Rep 6: 37395.
103. Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu JL, Wang D, Gao C. 2017. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. Nat Biotechnol 35: 438-440.