밀 육종소재 개발을 위한 식물 형질전환과 정밀육종 기술 현황

이건희¹ · 최창현² · 김재윤^{1*}

¹공주대학교 식물자원학과, ²국립식량과학원 밀연구팀

Current Status of Precision Breeding Technology and Plant Transformation for Development of Wheat Breeding Material

Geon Hee Lee¹, Chang Hyun Choi², and Jae Yoon Kim^{1*}

¹Department of Plant Resources, College of Industrial Science, Kongju National University, Yesan, 32439, Republic of Korea

²National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju, 55365, Republic of Korea

Abstract Wheat transformation was first initiated in 1992, and several studies were conducted to increase its efficiency; however, a very low probability of less than 0.3% was achieved. In 2011, the EU Commission announced a new plant breeding technology that modifies the DNA of seeds and plant cells to develop new varieties with desired characteristics. With the commercialization of the CRISPR/Cas9 technology, a site-directed nuclease technology, the possibility of its application in agriculture has increased with the rapid development of the technology. Recently, genome editing studies have been conducted in wheat, and they have been used for the functional analysis of genes related to various agricultural traits. The wheat full-length genome information was released in the form of a draft sequence in 2018, belatedly in comparison to other crops owing to allohexaploidy and a large genome (17 Gb) size. The recent pre-harvest sprouting resistance wheat breeding material developed in Japan suggests that it is possible to rapidly develop breeding materials through precision breeding technology. Finally, it is necessary to systematically achieve the goal of optimizing agricultural traits of crops through precise breeding technology to increase the breeding accuracy of allohexaploid wheat and rapid genetic fixation using the reduction in generation technology.

Keywords wheat, allohexaploid, precision breeding, CRISPR/Cas9

Received on June 6, 2021. Revised on June 7, 2021. Accepted on June 24, 2021.

* Corresponding Author (E-mail: jaeyoonkim@kongju.ac.kr, Tel: +82-41-330-1203, Fax: +82-41-330-1209)

서 언

6배체(hexaploid) 밀 또는 보통 밀(*Triticum aestivum* L.)은 식량 작물을 논의할 때 가장 중요한 작물 중 하나로 여러 국가에서 식량 자급률 채고가 주요 문제로 나타나지만 대부분의 국가들이 국제 무역에 의존하기 때문에, 최근 발생한 COVID-19 대유행과 같은 글로벌 공급망(global supply chains)을 혼란에 빠지게 하는 사건이 발생하였을 때 경기 침체나 정치적 이유로 인한 수요 충격(demand shock)에 쉽게 영향을 받지 않도록 하는 취약성 개선이 필요하다(Gutiérrez-Moya et al. 2021). 국내 식용 밀 수입량은 2016년 225만 톤에서 2020년 250만 톤(Korea customs service 2021)으로 매년 상승하고 있으나 사료용을 포함한 국내 밀 생산량은 2016년 약 4만 톤에서 2018년 2만 5천 톤으로 감소하였고, 자급률은 3년간 평균 1.5%대로 매우 낮았다(Kim et al. 2020b, KOSIS 2020). 최근 정부에서 안정적인 국산 밀

공급 체계 구축을 위한 2018년 밀 산업 중장기 발전 대책을 시작으로 밀 산업 육성법을 제정하여 2020년 2월 28일 시행되어 11월 19일에 제1차 밀 산업 육성 기본계획을 발표하여 밀 자급률 목표를 2025년까지 5%, 2030년까지 10%로 설정하였다(MAFRA 2020). 정부의 정책 취지에 맞춘 밀 산업 전반에 사용될 우수한 국산 밀 품종 개발을 위해서는 환경스트레스 내성, 품질 향상 및 가공 적성과 같은 다양한 우수 형질을 가진 여러 육종 소재 개발과 육종 프로그램의 개선이 필요하다.

식물체 내로 외부유전자를 도입(integration)하기 위한 기술인 형질전환은 1980년대 *Agrobacterium tumefaciens* 박테리아를 이용하여 처음 이루어졌으며 이후 식물 유전 공학은 큰 발전을 이루게 된다(Newell 2000). *Agrobacterium tumefaciens*는 그람 음성균(gram-negative)인 토양 박테리아로 쌍자엽 식물의 상처에 감염되어 근두암종(crown gall tumor)을 일으키는 병원균이다(Winans et al. 1988). *Agrobacterium*이 식물의 상처 난 부위로

이동하여 식물세포와 접촉하면 Ti (tumor-inducing)라 불리는 거대한 플라스미드(plasmid) 중 일부분을 식물체 내로 옮긴다 (Beijersbergen & Hooykaas 1994). Ti 플라스미드는 두 가지의 중요한 유전요소가 포함되어 있는데, 첫 번째는 T-DNA라고 불리며 양 끝 경계(border)에 25개 염기쌍(base pair)의 반복 때문에 구분되어 이 경계 사이의 T-DNA만이 식물세포로 도입되며, 두 번째는 Ti plasmid virulence (*vir*) 영역으로 T-DNA가 식물체 내로 도입되기 위한 *trans*-acting 역할을 하는 서열을 코딩하는 영역이다(Stachel et al. 1985, Zambryski 1992). 생명 공학자들은 이러한 특성을 지닌 *Agrobacterium*을 식물 유전공학을 위한 도구로 개발하기 위해 생물학의 다양한 측면에서 관찰하였고, 식물세포로의 T-DNA 전달 과정에 대한 초기 연구 결과 종양 형성은 식물세포로 T-DNA가 도입 후 발현되는 과정이며, T-DNA의 전사는 식물세포에서만 전사되고 유전자 전이와는 무관하며, T-DNA 경계 사이의 염기서열은 어떤 것에 관계없이 식물세포로 옮길 수 있다고 밝혔다(Christie 1997, Gelvin 2000, Hamilton 1997, Hooykaas & Schilperoort 1992, Riva et al. 1998, Tzfira & Citovsky 2000). 이러한 사실을 통해 식물 형질전환을 위한 최초의 벡터 및 박테리아 군주 시스템이 구축되었다 (Deblaere et al. 1985, Torisky et al. 1997).

형질전환 기술 개발을 기반으로 식물에서 처음 유전자 편집 (genome editing)으로 분류된 기술은 미생물 및 세포 기관 염색체에서 발견된 nuclease를 활용하여 특정 DNA 염기서열을 절단하는 기술로써 유전자가위라고도 불리우는 기술이다. 최초 유전자 교정 기술에 응용된 nuclease는 Meganucleases (MNs) 또는 homing endonuclease로 불리며, 대표적으로 I-CreI 단백질이 옥수수에서 이용되었으나, 이러한 핵산분해효소(nuclease)는 12-40 bp 범위의 DNA 서열을 인식하는 특징으로 인해 원하는 표적 부위가 한정적으로 나타나게 되어 이용이 제한되었다 (Jurica et al. 1998). 이후 개발된 이용자 맞춤형 핵산분해효소 (custom-designed endonucleases)는 염색체의 원하는 부분의 인산다이에스테르결합(phosphodiester bond)을 특이적으로 절단함에 따라 이용성과 정밀성 면에서 우수하다(Rocha-Martins et al. 2015).

본 논문은 최근 밀과 같은 다배체(polyploidy) 식물에 유전체 편집 기술을 도입하기 위한 식물 형질전환 방법의 연구 발달 과정과 유전체 편집 기술의 동향을 살펴봄으로써 밀 육종 분야에 정밀육종기술의 적용 방안을 모색하고자 한다.

본 론

식물 형질전환의 발달과 보통 밀(*Triticum aestivum*) 형질전환 특징

*Agrobacterium*을 이용한 식물 형질전환 기술은 애기장대, 담배, 토마토, 포플러, 대두를 포함하여 많은 쌍자엽 식물 종에서 수행되었다(Chee et al. 1989, Marton et al. 1979, McCormick et al. 1986, Parsons et al. 1986, Valvekens et al. 1988). 하지만 단자엽 식물은 *Agrobacterium* 종의 자연적인 숙주가 아니기 때문에 형질전환의 도구로 이용하기에 어려움이 있었고 경제적으로 중요한 단자엽 식물의 형질전환체 개발을 위해 polyethylene glycol (PEG) 전이법, 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 미세입자 충격법(particle bombardment) 및 원형질체를 이용한 유전자 전달방법과 같은 조직이나 세포 내로 DNA를 직접 주입하는 형질전환이 개발되었다(De la Peña et al. 1987, Fromm et al. 1985, Lörz et al. 1985, Sanford 1988, Uchimiya et al. 1986). 하지만 이러한 방법들을 이용한 형질전환은 매우 낮은 빈도로 일어났으며, 원형질체를 다시 생식력있는 식물로 재분화(regeneration) 시키기에 어려움이 있었다(Potrykus 1990). 이후 1991년 옥수수에서 유효 정단부위(shoot apex)를 이용한 *Agrobacterium*-mediated 형질전환을 처음 수행하였다(Gould et al. 1991). 이러한 기술을 이용하여 1980년대부터 2000년까지 식물 형질전환의 모든 측면에 대해서 급증하여 많은 양의 논문과 데이터가 보고되었다(Newell 2000).

현재까지 식물의 형질전환을 위해 사용되는 주요 기술은 *Agrobacterium*-mediated 방법과 미세입자 충격법이 식물 형질전환에 가장 많이 이용되고 있다(Barampuram & Zhang 2011). *Agrobacterium*-mediated는 다른 형질전환 방법과 비교하여 비교적 높은 확률로 DNA 삽입이 이루어지며 T-DNA의 경계에 알려진 말단 서열을 가지고 있고, 적은 수의 DNA 단편(copy)을 식물 염색체로 도입시키기 때문에 잠재적으로 염기서열이 도입된 부위의 유전자 발현이 공동억제(co-suppression) 및 불안정한 문제를 감소시킨다(Hansen et al. 1997). 반면에 미세입자충격법은 *Agrobacterium*에 과민반응을 일으키는 식물 종을 형질전환하고자 할 때 *Agrobacterium* 대신하여 사용되거나 형질전환을 준비하는 과정이 다른 방법에 비해서 간단한 이점이 있다. 하지만 형질전환 효율이 *Agrobacterium*을 이용한 방법에 비해 낮을 수 있으며 사용되는 소모품이 비싼 단점이 있을뿐만 아니라 많은 연구자들에 의해 보고된 복잡한 DNA의 도입 조건과 여러 개의 DNA 단편(copy)의 삽입으로 인한 유전자 침묵(gene silencing)

을 유발할 수 있다고 보고 하였다(Fu et al. 2000, Srivastava & Ow 2002, Taylor & Fauquet 2002). 또한 여러 방법을 통한 DNA 전달방법에 상관없이 생성된 형질전환체는 벡터의 플라스미드 서열(backbone)이나 선발 표지유전자(selectable marker gene)의 존재가 안정성 면에서 문제의 대상이 된다. 이러한 문제점 때문에 표지인자가 없는 형질전환체를 생산하기 위해 두 개의 마커 유전자를 동시에 형질전환 시키는 방법(co-transformation), 염색체 내의 transgene 단편의 이동(transposition), 상동성이 아닌 두 개의 특정 서열 간의 재조합(site-specific recombination) 등이 다양한 방법들이 개발되었다(Darbani et al. 2007). 생명공학기술의 진보를 통해 식물세포로의 유전자 전달을 위한 효율성과 편리성을 높이는 많은 기술이 개발되고 제공되었지만, 실제로는 거의 모든 형질전환체 개발은 식물에 안정적이고 효율적으로 적용되기 위하여 미세입자충격법과 *Agrobacterium*-mediated infiltration 방법이 대부분 사용되고 있다(Keshavareddy et al. 2018).

밀 형질전환은 미세입자충격법을 이용하여 1992년 비 선택성(non-selective) 제초제인 Basta의 저항성 유전자 *bar* (bialaphos resistance gene)를 캘러스(callus) 내로 도입하여 생식력이 있는 식물(fertile plant)로 재분화시키는 실험이 성공적으로 이루어졌다(Vasil et al. 1992). 이후 형질전환 효율과 최적의 요건 및 방법을 찾기 위한 개선 연구가 지속적으로 이루어졌다(Altpeiter et al. 1996, Cheng et al. 1997, Ke et al. 1997, Przetakiewicz et al. 2003, Rashid et al. 2011, Shewry et al. 1999). 하지만 형질전환은 캘러스 유도 환경과 사용 형질전환 방법 및 이용된 조직에 따라서 0.3% 미만의 매우 낮은 확률로 발생했다. 형질전환 기술은 여러 가지 육종 소재를 개발하기 위한 매우 좋은 방법이나 성공률을 높이기 위한 선행 요건이 필요하다. 형질전환 효율에 있어서 가장 중요한 요소는 식물의 일부분인 외식편(explant)을 이용한 *in vitro* 조직배양 과정에서 미분화된 세포(callus)가 정상적인 식물체로 재분화하는 능력이다(Alikina et al. 2016). 밀의 경우 배 발생 캘러스(embryogenic callus) 및 재분화의 효율이 유전형이나 배지의 조성 외에도 외식편의 종류에 따라 크게 차이가 발생하는 등 밀 조직배양 최적 요건을 찾기가 까다롭다. 따라서 밀 형질전환 성공에 유리한 외식편과 유전자형(genotype) 및 식물 호르몬을 이용한 최적의 배지 조성이 선택 되어야 한다(Mahmood & Razzaq 2017). 보통 밀에서 이용되는 외식편으로는 성숙한 배아(mature embryo), 배유와 함께 배양되는 성숙한 배아(endosperm-supported mature embryo), 미성숙 배아(immature embryo), 새싹의 정단 분열 조직(shoot apical meristem), 잎(leaf) 등이 사용된다(Mahmood & Razzaq

2017). 그 중 높은 재분화 효율로 인하여 가장 많이 사용되는 외식편은 미성숙 배아이며(Alikina et al. 2016), 질 좋은 배발생 캘러스가 유도되는 미성숙 배아의 배반(scutellum)을 얻기 위한 최적 생육 조건이 밀 형질전환 효율 증진을 위한 최우선 조건이다. 이러한 최상의 미성숙 배아를 안정적으로 생산하는 것이 매우 중요하게 여겨진다.

밀 유전체의 복잡성은 인간 유전체의 약 5배에 달하는 큰 크기뿐만 아니라 거의 동일한 반복 서열이 높은 비율로 존재하고 A, B, D의 동조염색체(homoeologous chromosome)가 높은 유사성을 가진 영역을 서로 공유하는 것에서 비롯된다(Zimin et al. 2017). 따라서 전통적인 육종 접근법을 사용하여 밀과 같은 배수체 작물의 염색체에 농업적 형질을 도입하는 것은 매우 시간 소모적인 방법이다(Vats et al. 2019). 최근 외부 유전자의 도입에 따른 GM (Genetic Modified)작물과 관련된 우려를 완화하기 위한 육종 기술인 신육종기술(New Plant Breeding Techniques)이 등장하면서 종의 경계를 넘어 외부 이식 유전자(transgene)를 식물체 내로 옮기지 않고도 작물의 형질을 개선하기 위한 내인성 유전자(endogenous gene) 변형이 가능해졌다(Zaidi et al. 2019).

작물 신육종기술 연구 동향

20세기 초부터 다양한 생물학 및 비생물학적 도구를 이용하여 외부의 DNA를 도입하여 작물의 형질을 개선하는 생명공학 기술인 형질전환을 통해 식물의 상업적으로 중요한 농업 특성을 증진시키는 식물이 개발되었다. 이러한 생명공학기술의 적용은 특정 식물 육종 기술, 특히 유전자 변형기술로 개발된 식물을 포함하는 유기체를 규제하는 법안이 1980년대 후반 또는 1990년대 초반에 유전자 변형 식물(transgenic plant)의 재배 및 상업화를 견제하기 위해 유럽 연합과 기타 국가에 도입되었다(Lusser & Davies 2013). 이러한 규제를 회피하기 위한 응용 기술이 개발되었는데, 식물 유전자 부위에 돌연변이를 유발하여 그 기능을 상실(knock-out) 또는 변형(modify)하여 육종 과정에 활용되는 도구로써 외부 DNA를 사용하는 형태가 나오게 되었다(Beetham et al. 1999, Kuzma & Kokotovich 2011, Shukla et al. 2009, Zhu et al. 2000). 최근에는 EU 위원회(2007년)와 여러 국가에서 규정이 명확하지 않은 총 8개의 기술을 ‘신육종기술(New plant-breeding techniques, NPBT)’로 명명하여 검토가 진행됨에 따라, 2010년과 2011년에 신육종기술에 대한 최종 보고서와 기사를 발표했다(Lusser et al. 2012). 신육종기술은 종자와 식물세포의 DNA를 수정하여 원하는 특성을 가진 새로운 품종을 개발할 수 있는 기술로 정의되어 이후 몇 년간

빠르게 발전해왔다. GMO 법규와 관련하여 평가된 신육종기술은 1) Site-directed nuclease (SDN), 2) Oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM), 3) Cisgenesis 및 intragenesis (동종기원), 4) RNA-dependent DNA Methylation (RdDM), 5) Grafting on GM rootstock (접목), 6) Reverse breeding (RB, 역육종), 7) Agro-infiltration, 8) Synthetic genomics로 구분되며 이러한 신육종기술은 전통적인 교배를 통해 이식된 유전자를 제거하게 된다(Hartung & Schiemann 2013, Fig. 1).

기존 육종에 사용되는 방사선, 화학물질을 이용한 식물 유전자 돌연변이는 자연적으로 발생하는 돌연변이를 제외하고 GM 법규에 의해 제한된 기술로 염기서열 돌연변이부터 작은 DNA 단편의 삽입(insertion)이나 삭제(deletion)를 유도한다. SDN 또는 ODM 기술의 적용은 돌연변이 육종에 의해 발생할 수 있는 것과 유사하지만, 훨씬 더 구체적인 방식으로 돌연변이를 생성한다(Pater et al. 2009, Puchta & Hohn 2010, Tzfira et al. 2012). 또한 RdDM 기술은 이미 식물세포에 존재하는 RdDM의 자연적인 생체 시스템에 의해 처리되는 RNA 분자의 일시적인 발현을 사용하여, 이중 가닥 또는 헤어핀 RNA 분자가 일시적으로 처리되어 히스톤의 메틸화와 DNA 서열의 메틸화를 유도한다(Aufsatz

et al. 2002, Wassenecker 2000). 신육종기술을 SDN과 RdDM과 같이 자연적인 돌연변이를 모방하거나 자연적으로 발생하는 DNA 서열의 후성 유전적 변화를 유발하여 작물의 유전체에 변이를 일으켜 작물을 생산한다. 이렇게 생산된 식물 중 외래 DNA가 식물의 DNA에 통합되어 재조합 DNA가 발생하는 경우에만 유일하게 GM작물로 간주된다. 그러나 재조합 DNA를 포함하지 않는 형질전환체는 과학적인 관점에서 GM작물로 간주되지 않는다. 그렇기 때문에 SDN, ODM, RdDM을 일시적으로만 발현되게 하거나 뿌리 및 줄기 등 식물의 일부에만 국소적으로 외부 DNA가 내부 DNA와 재조합되는 것은 유전자 변형 관리 규정 범주에 해당하지 않는다(Schaart & Visser 2009, Tait & Barker 2011).

SDN으로 알려진 유전자 교정 기술(genome editing)은 단백질-DNA의 상호작용 또는 RNA-DNA의 결합에 의한 특정 서열에 double-strand breaks (DSB)를 일으켜 돌연변이를 유발하는 기술이다(Xu et al. 2019, Fig. 2). 최초의 유전자 교정 기술인 MNs 이후, 박테리아의 일종인 *Flavobacterium okeanoicoles*에서 발견된 FokI 핵산분해효소와 특정한 표적 염기서열을 인식하도록 조작이 가능한 단백질이 결합된 1세대 유전자 교정 기술이

New plant-breeding techniques

Fig. 1. List of the new plant breeding techniques. Indicated the eight technologies defined by the EU Commission in 2011 as technologies that can develop new varieties with desired characteristics by modifying the DNA of seeds and plant cells.

Fig. 2. The different generations of nucleases used for site directed genome editing and the DNA repair pathways used to modify target DNA. Figure based on Sedek et al. (2019).

라 불리우는 zinc-finger nuclease (ZFN)와 1세대 보다 더 정밀한 서열을 표적으로 하는 단백질과 결합하는 2세대 transcription activator-like effector nuclease (TALEN)이 개발되었다(Ain et al. 2015). 최근 신육종기술인 SDN 중 편이성으로 인해 보편적으로 사용되는 기술인 3세대 유전자 교정 기술 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas 시스템이 작물 염색체 편집을 수행하기 위해 사용되었고 기술의 급속한 발달과 함께 농업 분야에서의 적용 가능성이 높아졌다(Jaganathan et al. 2018). CRISPR/Cas는 표적 서열을 포함하는 single guide RNA와 박테리아에서 발견된 RNA-dependent 핵산분해효소인 Cas 단백질이 결합된 ribonucleoprotein (RNP)복합체를 이용하며, 대표적으로 *Streptococcus pyogenes*에서 발견된 type II 유형의 Cas9 단백질을 이용한다(Feng et al. 2013). 3세대 유전자 교정 기술은 Cas 단백질의 여러 orthologs의 발견과 단백질 공학 (protein engineering)을 이용해 Cpf1 (Begemann et al. 2017) 및 nCas9을 이용한 base-editing (Gaudelli et al. 2017), 4세대 유전자 교정 시스템으로 불리는 Prime-editing (Lin et al. 2020)

등 다양한 형태의 CRISPR 기술이 개발되었다(Chennakesavulu et al. 2021). 또한 미리 융합된 ribonucleoprotein 복합체 또는 CRISPR/Cas9 in vitro transcripts (IVTs)를 직접 식물체 내로 도입시켜 GMO 규제를 피하기 위한 transgene-free 유전자 교정 시스템을 적용시켰다(Zaman et al. 2019).

식물의 육종에서 염색체 편집에 대한 관점은 이미 광범위하게 검토되어 많은 수의 연구가 수행되었으며 최근 밀에도 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자 교정 연구가 활발히 진행되고 있다 (Table 1). 또한 단순히 유전자에 직접적으로 돌연변이를 일으킨다는 관점에서 벗어나 유전자를 제거하는 것부터 열성인자를 빠르게 생성하고, 염기서열 치환을 통해 새로운 대립 유전자를 생성하며, 양적 형질에 의해 조절되는 저항성 또는 대사 물질 함량 등을 증가시키기 위한 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있다(Jia et al. 2017, Li et al. 2016, Shan et al. 2015, Soyk et al. 2017, Xu et al. 2016, Zong et al. 2018). 많은 농업특성이 단일 염기 다형성(Single nucleotide polymorphism, SNP)에 의해 제어되어 정확한 염기 치환이나 예측 가능한 삽입 또는 결실을

통해 암호화된 단백질의 아미노산 서열 변화를 일으켜 새로운 농업적 특성을 가진 식물이 생성될 수 있기 때문에 농업에서 CRISPR 시스템의 활용도가 급증하고 있다(Veillet et al. 2020).

현대 사회의 멘델 유전학 및 유전체학을 통한 육종에 이르기까지 육종 전략은 계속해서 발전해왔으며 밀과 쌀에서 슈퍼 작물 품종의 개발로 ‘녹색 혁명’이 일어나 작물 생산성을 극적으로 향상시키고 광범위한 기근을 예방하는데 도움을 주었다(Hickey et al. 2019). 이러한 육종방법론은 기존의 교잡 육종방법, F₁ 품종, 유전자 변형 유기체(GMO) 기술의 융합을 통해 높은 수확량, 우수한 품질 및 생물학적 스트레스 저항성을 성공적으로

결합했다(Lu et al. 2019, Ma et al. 2019, Song et al. 2019). 하지만 이러한 기술의 융합은 사회적 또는 기술적 제한으로 인해 대부분의 식용 작물에서는 실용성이 낮다. 더욱이 기존의 육종은 여전히 노동집약적이고 장시간이 소비되는 기술이므로 차세대 작물 품종육종을 위한 새로운 생식질(germplasm) 개발과 지식 및 육종기술의 보급이 필요하다(Gu et al. 2016, Liu et al. 2015, Fig. 3).

정밀육종을 통한 밀 육종소재 개발 연구의 의의

보통밀과 듀럼밀은 인간이 농업을 하기 시작한 10,000년 전인

Table 1. List of recent wheat genetic editing studies using the CRISPR/cas9 system.

Target gene	Trait/Gene function	Editing type	Transformation method	References
<i>TaCKX2</i>	grain-size regulatory candidate genes	InDel	<i>A. tumefaciens</i> , Protoplast	Zhang et al. 2019
<i>TaMs2</i>	male-sterile	Knock-out	<i>A. tumefaciens</i>	Tang et al. 2021
<i>TaMTL</i>	pollen-specific phospholipase	InDel	<i>A. tumefaciens</i>	Liu et al. 2019
<i>TaPDS</i>	carotenoid pathway enzyme	InDel	<i>A. tumefaciens</i>	Howells et al. 2018
<i>TaSBEIIa</i>	starch composition, structure and properties	Knock-out	Particle bombardment	Li et al. 2020a
α -/ γ -gliadins gene families	Decrease gluten immunogenicity	Knock-out	<i>A. tumefaciens</i>	Jouanin et al. 2019

Fig. 3. Comparison of modern breeding strategies and time required to develop novel plant varieties. (A) Conventional breeding: it is largely divided into cross and mutagenesis. Cross elite recipient line and donor line (with the desired trait, e.g., disease resistance, high-yielding) to improve trait. Mutagenesis randomly transforms using chemical or physical mutations and selects plants with the desired traits. (B) Genetic modification breeding: by introducing exogenous genes into elite varieties, they improve traits. (C) Genome editing: precisely modify the target sequence in the plant genome to improve traits. Figure based on Chen et al. (2019).

신석기 시대 기간동안 길들여진 최초의 식물 중 하나이며, 인류 문명의 발전을 촉진하고 유지하는 주식으로서 매우 중요한 역할을 하였다(Feldman & Levy 2015). 밀의 종은 2배체, 4배체, 6배체의 세 가지의 다른 배수가 존재하는데, A 염색체와 B 염색체는 ~650만 년 전에 공통된 조상으로부터 갈라져 진화했다(Marcussen et al. 2014). 이후 약 50만 년의 기간동안 이질4배수화(allotetraploidization)을 통해 *Triticum turgidum* L. ssp. *dicoccoides* (AABB)가 형성되어 재배종화(domestication)를 통해 듀럼밀(AABB)이 만들어지게 되었다(Dvorak & Akhunov 2005). 마침내 듀럼밀(AABB)과 염소풀인 *Aegilops tauschii* (DD) 사이의 단일 또는 다중 이질6배수화로 인해 10,000년 전에 발생한 *Triticum aestivum* (AABBDD)가 출현하게 되었다(Feldman et al. 1995). 이처럼 밀은 속씨식물의 진화 역사에서 흔하게 발생하는 배수성(polyploidy) 또는 전체 유전체 중복(whole genome duplication)과 특히 진화적으로 차이가 있는 두 가지 유전체의 결합인 이질배수성(allopolyploidy)의 특징을 가지고 있다(Jiao et al. 2011, Li et al. 2016). 유전적 다양성이 증가한 특성 덕분에 더 넓은 지리적 분포를 보여주고, 더 다양한 생태 서식지에서 더 폭넓게 적응할 수 있는 가소성(plasticity)을 가진다(Dubcovsky & Dvorak 2007, Wendel 2000). 하지만 배수성을 가지는 밀의 염색체는 85% 이상의 반복서열을 포함하는 거대한 형태(17 Gb)의 이질 6배체이기 때문에 전체 유전체 정보의 정렬이 어려움이 크다. 이러한 이유로 대부분의 유전체 정보가 밝혀진 다른 식물 종과 비교하여 유전체 정보가 매우 부족하였다(Arumuganathan & Earle 1991). 이후 분자 육종의 토대를 제공하기 위해 IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium)에서 보통밀 품종인 'Chinese Spring'의 참조 유전체 서열을 제공하기 위한 로드맵을 수립했지만, contig 서열의 반복성과 불완전한 범위로 인해 약 10 Gb만이 염기서열 정렬이 완성되었다. 이후 후속 전장 유전체 조립(whole-genome assembly)을 통해 지속적으로 인접성(contiguity)을 향상시켰지만, 유전자 사이의 공간이나 올바른 물리적 지도를 제시하지 못하고 draft sequence의 형태로 밀 전장 유전체 정보를 공개하였다(Chapman et al. 2015, IWGSC 2018, Zimin et al. 2017). 이후 이질 6배체인 밀의 유전체를 이해하기 위한 연구가 수행되어 각 subgenome (A, B, D)간의 연관성에 대하여 밝혀왔다. 최근 몇 가지 보고에서, D-subgenome homoeologous 유전자가 다른 두 개의 subgenome 보다 덜 억제되고 반대로 단일 또는 복제 유전자의 존재가 A, B-subgenome에 영향을 미쳤다고 보고했으며(Juery et al. 2020), 밀의 A, B, D-subgenome 사이에 유전자 수에 대하여 유의한

차이가 발견되지 않았지만 반복서열 및 유전자의 다양성은 D-subgenome에서 낮게 나타났다(Marcussen et al. 2014). 보통밀의 RNA-seq을 통한 전사체 분석에 대한 결과 A, B, D-subgenome 간의 발현의 70%는 조직과 관계없이 균형 잡힌 발현을 보여주지만, ~30%는 균형이 잡히지 않은 발현을 나타내며 조직 특이적으로 발현된다. 이러한 발현의 비대칭성은 DNA나 히스톤의 메틸화(methylation)에 영향을 미치는 후성유전적 변화를 통해 결정되었을 수 있으며 육종에서 중요한 의미를 나타낸다(Ramírez-González et al. 2018). 결과적으로 많은 밀 유전자가 orthologs 및 paralogs와 같은 기능적으로 상동성인 유전자 수(homoeologous copy)가 2-3개 존재하며(Borrill et al. 2015), SNP의 표현형에 따라 서로 다른 동조염색체의 유전자에 의해 그 기능이 가려질 수 있다. 이것은 유전적으로 서로 연관되어 표현형을 제어하는 유전자뿐만 아니라 양적 형질(quantitative trait)을 제어하는 유전자 또한 관련되어 배수성이 있는 밀에서 양적 형질에 대한 유전적 형질 연구를 특히 어렵게 만든다(Borrill et al. 2019). 이 과정은 3가지 예를 들어 효과를 정리를 할 수 있는데, 첫 번째로 준화처리와 광주기에 연관된 유전자인 *VRN* 및 *PPD*는 하나의 동조염색체에서의 단일 돌연변이가 다른 두 개의 동조염색체에 존재하는 copy를 효과적으로 지배하는 우성 형질을 가진다(Yan et al. 2003, Wilhelm et al. 2009). 두 번째로 하나의 동조염색체의 단일 변화로는 미세한 표현형의 변화로 이어지지만 다른 동조염색체의 copy가 추가로 변이함에 따라 비례적이거나 극단적으로 표현형이 변화하는 유전자로 단백질 함량(*GPC*), 종자 크기(*GW2*), 적색 종피색(*R*) 및 아밀로펙틴 함량(*Wax*)이 포함되며 이를 dosage effect라고 한다(Avni et al. 2014, Himi et al. 2011, Kim et al. 2003, Wang et al. 2018). 세 번째로 그 기능이 중복되어(functional redundancy) 세 개의 copy가 모두 동시에 변이가 일어날 때만 표현형에 변화가 발생하는 것으로 아밀로오스 함량(*SBE-II*) 및 열성 병저항성(*MLO*)와 같은 중요한 농업적 특성을 제어하는 유전자가 있다(Acevedo-Garcia et al. 2016, Slade et al. 2012).

CRISPR/Cas9과 같은 정밀 육종 기술이 농업에서 상용화가 되고 난 후 다양한 작물에서 농업 형질을 개선하기 위한 연구가 수반되었으며, 여러 농업형질에 연관된 유전자 교정 식물체가 개발되었다(Table 2). 미국 농무부(United States department of agriculture, USDA)에서는 2010년부터 USDA/APHIS (animal and plant health inspection service)를 통해 신육종기술을 이용하여 개발된 작물들이 규제 대상 여부인지 판단하는 시스템을 도입하여 공개적으로 검토 받을 수 있도록 했으며, 2019년 기준

Table 2. List of genome-edited breeding materials for various crops developed through precision breeding technology.

Tech	Crop	Trait	Gene	References
CRISPR/Cas	<i>H. vulgare</i>	Malt quality	New D hordein alleles	Li et al. 2020c
	<i>B. napus</i>	Fatty acid	<i>BnaFAD2</i>	Huang et al. 2020
	<i>C. annuum</i>	Powdery mildew resistance	<i>CaMLO2</i>	Kim et al. 2020a
	<i>T. durum</i>	Allergen proteins	a-amylase/ Trypsin Inhibitor	Camerlengo et al. 2020
	<i>Z. mays</i>	Male Sterile	<i>MS8</i>	Chen et al. 2018
	<i>Z. mays</i>	Semidwarf	<i>Gibberellin-Oxidase 20-3</i>	Zhang et al. 2020a
	<i>o. sativa</i>	Carotenoid-enriched	carotenoid biosynthesis cassette	Dong et al. 2020
	<i>o. sativa</i>	Early maturity	<i>OsGhd7</i>	Wang et al. 2020a
	<i>o. sativa</i>	Herbicide-tolerance	<i>OSALS allele</i>	Wang et al. 2021
	<i>o. sativa</i>	Salt tolerance	<i>OsBGE3, OsDST, OsFLN2, OsGTg-2, OsPIL14, OsPQT3, OsRR9, OsRR10, OsDOF15</i>	Ganie et al. 2021
	<i>o. sativa</i>	Semi-dominant dwarf	<i>OsSLR1</i>	Jung et al. 2020
	<i>o. sativa</i>	Semi dwarf	<i>SD1</i>	Hu et al. 2019
	<i>o. sativa</i>	Thermo-sensitive genic male-sterile	<i>TMS5</i>	Chen et al. 2020
	<i>o. sativa</i>	Yield, cold tolerance	<i>OsPIN5b, OsGS3, OsMYB30</i>	Zeng et al. 2020
	<i>o. sativa</i>	High Yielding and Fragrant	<i>Cytochrome P450 family, OsBADH2</i>	Usman et al. 2020
	<i>G. max</i>	lipoxygenase-free	<i>GmLox1, GmLox2, GmLox3</i>	Wang et al. 2020b
	<i>G. max</i>	Isoflavone content, soya bean mosaic virus resistance	<i>GmF3H1, GmF3H2, GmFNSII-1</i>	Zhang et al. 2020b
	<i>S. lycopersicum</i>	Male Sterile	<i>Ms10</i>	Liu et al. 2021
	<i>S. lycopersicum</i>	Parthenocarpic	<i>SlIAA9</i>	Ueta et al. 2017
	<i>C. lanatus</i>	Seed size, Seed germination	<i>CIBG1</i>	Wang et al. 2021
Cisgenesis and intragenesis	<i>T. aestivum</i>	Fertility recovery	<i>Ms2</i>	Tang et al. 2021
	<i>T. aestivum</i>	Seed dormancy	<i>TaQsd1</i>	Liu et al. 2021
	<i>S. tuberosum</i>	Late blight resistance	<i>StDND1, StCHL1, StDMR6-1</i>	Kieu et al. 2021
	<i>H. vulgare</i>	Phytase activity	<i>HvPAPhy_a</i>	Holme et al. 2012
	<i>T. durum</i>	High-molecular-weight (HMW) glutenin subunits	<i>IDy10</i>	Gadaleta et al. 2008
	<i>S. tuberosum</i>	High amylopetin	<i>GBSS</i>	de Vetten et al. 2003
	<i>S. tuberosum</i>	Black spot vruise resistance	<i>Ppo</i>	Rommens et al. 2004
	<i>S. tuberosum</i>	Late blight resistance		Jo et al. 2014

신육종기술을 이용해 개발된 작물 82종이 규제 대상이 아닌 것으로 판정되었다(Choi 2020). 또한 최근 일본 국립 농업 식품 연구 기구(National agriculture and food research organization, NARO)에서 CRISPR/Cas9 기술과 밀 형질전환 기술을 이용하여 수발아 저항성 밀 육종소재를 개발하였다(Abe et al. 2019). 육종소재 개발에 사용된 유전자는 1996년 야생 보리의 양적형질 유전자좌(quantitative trait locus, QTL) 연구를 통해 2개의 유전자(*Qsd1*, *Qsd2*)가 발굴되었다(Han et al. 1996). 이후 보리 *Qsd1* 유전자에 대한 domain 분석, RNAi를 이용한 knock-down 및

종자 휴면에 감수성인 품종에 형질전환을 이용한 과발현 연구를 통해 휴면에 연관된 유전자 기능을 검증하였다(Sato et al. 2016). 마지막으로 보리 *Qsd1* 유전자의 밀 ortholog 유전자인 *TaQsd1*을 각 subgenome 별로 동정하여 모든 A, B, D-subgenome의 *Qsd1* 유전자가 CRISPR/Cas9에 의해 교정된 triple-recessive line을 개발하였으며, wild type과의 교배를 통해 외부 DNA가 존재하지 않는 transgene-free triple-recessive line을 최종적으로 개발하였다(Abe et al. 2019). NARO에 의해 수행된 수발아 저항성 밀 육종소재의 개발은 유전자 발굴부터 검증까지의 체계적인 연구

수행과 최종적으로 정밀 육종 기술의 활용을 통해 밀에서 특정 농업형질에 대한 육종소재 개발이 가능함을 시사한다.

스피드육종법을 이용한 식물 생육 조작 및 육종 가속화

미성숙배 배양(immature embryogenesis)기술은 밀 형질전환 체 개발 연구를 위해 가장 많이 사용되지만 밀은 대부분의 지역에서 일년 내내 밭에서 재배할 수 없으며, 형질전환에 사용되는 미성숙배는 대부분 통제된 환경에서 재배되고, 개화 후 일정 발달 단계에만 미성숙배를 수집할 수 있어 많은 시간과 공간이 필요하며 노동집약적이다(Wang et al. 2009). 따라서 미성숙배를 이용하는 밀 형질전환 연구에서는 지속적인 미성숙배의 수집을 위해 생육조건이 통제된 온실에서 재배를 통해 수집하여 안정적인 미성숙배 생산의 중요성을 시사한다(Haliloglu & Baenziger 2005, Ishida et al. 2015). 최근 장일식물인 밀(*Triticum aestivum*), 듀럼밀(*T. durum*), 보리(*Hordeum vulgare*), 카놀라(*Brassica napus*)의 광주기(photoperiod)를 낮 22시간, 밤 2시간으로 한 극단적인 장일 처리를 통해 생육 발달단계(plant development stages)를 단축시켜 세대를 약 2배 빨리 진전시킬 수 있는 스피드 육종법이 발표되었으며(Watson et al. 2018), 국립식량과학원에서 국내 밀 품종 일부를 이용하여 출수 소요 일수를 단축에 관한 연구를 하였다(Cha et al. 2019). 또한 스피드육종법을 통하여 수집된 미성숙배를 이용한 조작배양을 통해 형질전환 성공의 중요한 요건인 재분화율에서 통계적으로 유의한 차이가 없다는 것이 증명되었으며 밀 형질전환의 적용 가능성을 한층 높였다(Lee et al. 2020). 이처럼 스피드육종법은 기존의 세대축진과는 다른 개념으로 미성숙배의 수집과 같은 방법으로 밀 육종법에 적용될 수 있으며, 최근 현대의 육종 방식이 세대 진전을 통한 부모계통에서 뛰어난 유전적 장점이 전달된 표현형의 선택에만 의존하지 않고 고정세대에서 차세대염기서열분석(Next generation sequencing) 및 유전체학(genomics)을 통한 육종 접근 방식의 발전을 보완하기 위한 세대축진과 같은 ‘속도’의 혁신이 필요하다(Bhatta et al. 2021).

결론

분자육종은 농업에서 중요한 형질을 가지는 유전자의 특성화 및 활용에 대한 큰 잠재력을 가지고 있으며, 실제로 농업적 특성의 유전적 정보에 대한 기초가 발전한 벼(*Oryza sativa*) 육종의 경우 다양한 특성을 가진 엘리트 계통이 많이 생성되었고, 밀에서도 중요한 농업적 특성을 가지는 유전자의 기능을 밝히기 위해

상당한 연구가 동반되었다(Li & Zhang 2017, Li et al. 2020b). 최근 밀 육종 방법에 대한 시뮬레이션을 이용한 유전체 선발(genome selection)을 이용해 표현형 선발에 비해서 유전형질 발굴의 정확도를 증가시켰다(Tessema et al. 2020). 또한 여러 플랫폼에 걸쳐 분석된 SNPs (single nucleotide polymorphisms)와 resequencing 데이터는 연관 분석의 효율을 향상시키고 주요 유전자의 기능적 변이를 일으키는 copy를 식별하게 도와주어, 이러한 정보를 이용하여 20세기 밀 육종 초기 단계에서 손실된 다양한 품종에 예상되는 일배체형(haplotype)을 정의할 수 있다(Uauy 2017). 이를 통해 다른 동조염색체에 존재하는 copy에 의해 기능이 가려지고 식별하기 어려워져 밀 유전체 내 기능적 변이의 잠재력으로 존재하는 열성 형질의 특성을 유전적 육종 전략을 이용한 대립 유전자 변이 조합을 통해 표현형의 변이를 넓히고, 원인이 되는 유전자좌를 발굴해야 한다(Borrill et al. 2015). 최종적으로 최근 유전자 편집 등에 의하여 유전자를 직접적으로 조절하는 정밀 육종(precision breeding)을 통해 이질 6배체 밀의 육종 정확성을 높이고, 세대축진을 통한 빠른 유전적 개선을 통해 작물의 농업적 특성을 최적화하기 위한 목표가 체계적으로 이루어져야 할 것이다.

적요

6배체 밀로 불리우는 보통밀(*Triticum aestivum*)은 전세계에서 소비되는 중요한식량 작물로, 국내에서는 자급률이 평균 1.5%대로 매우 낮아 정부에서 2030년까지 10%를 달성하기 위한 밀 산업 육성계획을 수립하였다. 따라서 우수한 품질의 품종 개발을 위한 밀 육종소재 개발이 시급하다. 밀 형질전환은 1992년 미세입자충격법을 이용하여 처음 이루어졌으나 그 효율이 0.3%대로 매우 낮아 형질전환 효율을 높이기 위한 여러 연구가 수반되었다. 2011년 EU위원회에서 원하는 특성을 가지는 새로운 품종 개발을 위해 식물의 DNA를 교정하는 신육종기술을 발표하였다. 신육종기술 중 하나인 CRISPR/Cas 기술은 2015년 상용화가 시작되어 급속한 발전과 함께 농업 분야에서도 많이 이용되었다. 2018년 발표된 밀 전장 유전체 정보를 이용하여 A, B, D 동조염색체의 다양한 농업형질과 관련된 유전자의 기능 분석이 이루어져 거대한 유전체(17 Gb) 및 이질6배체의 특성을 가진 밀에서 유전자 교정 기술 적용을 위한 발판이 마련되었다. 최근 일본에서 2019년에 개발된 수발아 저항성 유전자 *Qsd1* 교정 열성 식물체를 개발하여 정밀 육종 기술을 적용하여 밀 품종 개발이 신속하게 이루어 질 수 있음을 시사하였다. 최종적으로

로 정밀 육종 기술을 이용하여 이질배체 특성의 밀 품종 육성의 정확도를 높이고, 세대축진 기술을 이용한 빠른 유전적 세대 고정 및 품종화로 작물의 농업 특성 최적화라는 목표를 체계적으로 달성하여야 할 것이다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제명: 수발아 저항성 밀 육종소재 개발, 과제번호: PJ01482302)에 의해 이루어진 것임.
김재윤: 이 논문은 2018년 공주대학교 학술연구지원사업의 연구 지원에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

1. Abe F, Haque E, Hisano H, Tanaka T, Kamiya Y, Mikami M, Kawaura K, Endo M, Onishi K, Hayashi T, Sato K. 2019. Genome-edited triple-recessive mutation alters seed dormancy in wheat. *Cell Rep* 28: 1362-1369.
2. Acevedo-Garcia J, Spencer D, Thieron H, Reinstädler A, Hammond-Kosack K, Phillips AL, Panstruga R. 2016. *mlo*-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach. *Plant Biotechnol J* 15: 367-378.
3. Ain QU, Chung JY, Kim YH. 2015. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *J Control Release* 205: 120-127.
4. Alikina O, Chernobrovkina M, Dolgov S, Miroshnichenko D. 2016. Tissue culture efficiency of wheat species with different genomic formulas. *Crop Breed Appl Biot* 16: 307-314.
5. Ali N, Rahman UI, Badakshi F, Tariq MJ, Mujeeb-Kazi A. 2020. Ensuring sustainable food security: Exploiting alien genetic diversity in wheat breeding for adaptation to emerging stresses. pp. 31-42. In: Munir, O, Alvina G. (Eds) *Climate change and food security with emphasis on wheat*. Academic press, Massachusetts, United States.
6. Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Stoger E, Vasil IK. 1996. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Rep* 16: 12-17.
7. Arumuganathan K, Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218.
8. Aufsatz W, Mette MF, Winden J, Matzke AJ, Matzke M. 2002. RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16499-16506.
9. Avni R, Zhao R, Pearce S, Jun Y, Uauy C, Tabbita F, Fahima T, Slade A, Dubcovsky J, Distelfeld A. 2014. Functional characterization of *GPC-I* genes in hexaploid wheat. *Planta* 239: 313-324.
10. Barampuram S, Zhang ZJ. 2011. Recent advances in plant transformation. pp. 1-35. In: Birchler J. (Ed) *Plant chromosome engineering. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana press, Totowa, NJ.
11. Begemann MB, Gray BN, January EE, Gordon GC, He Y, Liu H, Wu X, Brutnell TP, Mockler TC, Oufattole M. 2017. Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases. *Sci Rep* 7: 116006.
12. Beijersbergen A, Hooykaas PJJ. 1993. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. pp 37-49. In: Nester, EW, Verma DPS. (Eds) *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions. Current plant science and biotechnology in agriculture*. Springer, Dordrecht.
13. Bhalla PL, Ottenhof HH, Singh MB. 2006. Wheat transformation -an update of recent progress. *Euphytica* 149: 353-366.
14. Bhatta M, Sandro P, Smith MR, Delaney O, Voss-Fels KP, Gutierrez L, Hickey LY. 2021. Need for speed: manipulating plant growth to accelerate breeding cycles. *Curr Opin Plant Biol* 60: 101986.
15. Borrill P, Adamski N, Uauy C. 2015. Genomics as the key to unlocking the polyploid potential of wheat. *New Phytol* 208: 1008-1022.
16. Borrill P, Harrington SA, Uauy C. 2019. Applying the latest advances in genomics and phenomics for trait discovery in polyploid wheat. *Plant J* 97: 56-72.
17. Camerlengo F, Frittelli A, Sparks CA, Doherty A, Martignago D, Larre C, Lupi R, Sestili F, Masci S. 2020. CRISPR-Cas9 multiplex editing of the α -Amylase/trypsin inhibitor genes to reduce allergen proteins in durum wheat. *Front Sustain Food Syst* 4: 104.
18. Chapman JA, Mascher M, Buluc A, Barry K, Georganas E, Session A, Strnadova V, Jenkins J, Sehgal S, Olikier L, Schmutz J, Yelick K, Scholz U, Waugh R, Poland JA, Muehlbauer GJ, Stein N, Rokhsar DS. 2015. A whole-genome shotgun approach for assembling and anchoring the hexaploid bread wheat genome. *Genome Biol* 16: 26.
19. Chee PP, Fober KA, Slightom JL. 1989. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds

- with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol 91: 1212-1218.
20. Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. Annu Rev Plant Biol 70: 667-697.
21. Chen R, Xu Q, Liu Y, Zhang J, Ren D, Wang G, Liu Y. 2018. Generation of transgene-free maize male sterile lines using the CRISPR/Cas9 system. Front Plant Sci 9: 1180.
22. Chen RR, Zhou YB, Wang DJ, Zhao XH, Tang XD, Xu SC, Tang QY, Fu XX, Wang K, Liu XM, Yang YZ. 2020. CRISPR/Cas9-mediated editing of the thermo-sensitive genic male-sterile gene TMS5 in rice. ACTA Agron Sin 46: 1157-1165.
23. Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol 115: 971-980.
24. Chennakesavulu K, Singh H, Trivedi PK, Jain M, Yadav SR. 2021. State-of-the-Art in CRISPR Technology and Engineering Drought, Salinity, and Thermo-tolerant crop plants. Plant Cell Rep. doi.org/10.1007/s00299-021-02681-w
25. Choi YD. 2020. Crop improvement through new breeding technology. The Journal of National Academy of Science 59: 171-262.
26. Christie PJ. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: A paradigm for a new family of multi-functional transporters in eubacteria. J Bacteriol 179: 3085-3094.
27. Darbani B, Eimanifar A, Jr. Stewart CN, Camargo WN. 2007. Methods to produce marker-free transgenic plants. Biotechnol J 2: 83-90.
28. Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J. 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. Nucleic Acids Res 13: 4777-4788.
29. De la Peña A, Lörz H, Schell J. 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. Nature 325: 274-276.
30. De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R. 2003. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. Nat Biotechnol 21: 439-442.
31. Dong OX, Yu S, Jain R, Zhang N, Duong PQ, Butler C, Li Y, Lipzen A, Martin JA, Barry KW, Schmutz J, Tian L, Ronald PC. 2020. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. Nat Commun 11: 1178.
32. Dong S, Qu R. 2005. High efficiency transformation of tall fescue with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci 168: 1453-1458.
33. Dubcovsky J, Dvorak J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. Science 316: 1862-1866.
34. Feldman M, Lupton FGH, Miller TE. 1995. Wheats. In: Smartt J, Simmonds NW. (Eds) Evolution of Crop Plants, 2nd ed. pp. 184-192. Longman Scientific, London, UK.
35. Feldman M, Levy AA. 2015. Origin and evolution of wheat and related Triticeae Species. In: Molnár-Láng M, Ceoloni C, Doležel J. (Eds) Alien introgression in wheat. Springer, Cham.
36. Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK. 2013. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. Cell Res 23: 1229-1232.
37. Fromm M, Taylor LP, Walbot V. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. Proc Natl Acad Sci USA 82: 5824-5828.
38. Fu X, Duc LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Subhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A. 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. Transgenic Res 9: 11-19.
39. Gadaleta A, Giancaspro A, Blechl AE, Blanco A. 2008. A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses *1Dy10*. J Cereal Sci 48: 439-445.
40. Ganie SA, Wani SH, Henry R, Hensel G. 2021. Improving rice salt tolerance by precision breeding in a new era. Curr Opin Plant Biol 60: 101996.
41. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. 2017. Programmable base editing of T to G C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature 551: 464-471.
42. Gelvin SB. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annu Rev Plant Phys 51: 223-256.
43. Ghosh S, Watson A, Gonzalez-Navarro OE, Ramirez-Gonzalez RH, Yanes L, Mendoza-Suarez M, Simmonds J, Wells R, Rayner T, Green P, Hafeez A, Hayta S, Melton RE, Steed A, Sarkar A, Carter J, Perkins L, Lord J, Tester M, Osbourn A, Moscou MJ, Nicholson P, Harwood W, Martin C, Domoney C, Uauy C, Hazard B, Wulff BBH, Hickey LT. 2018. Speed

- breeding in growth chambers and glasshouses for crop breeding and model plant research. *Nat Protoc* 13: 2944-2963.
44. Gould J, Devey M, Hasegawa O, Ulian EC, Peterson G, Smith RH. 1991. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol* 95: 426-434.
45. Gu R, Chen F, Long L, Cai H, Liu Z, Yang J, Wang L, Li H, Li J, Liu W, Mi G, Zhang F, Yuan L. 2016. Enhancing phosphorus uptake efficiency through QTL-based selection for root system architecture in maize. *J Genet Genomics* 43: 663-672.
46. Gutiérrez-Moya E, Adenso-Díaz B, Lozano S. 2021. Analysis and vulnerability of the international wheat trade network. *Food Sec* 13: 113-128.
47. Haliloglu K, Baenziger PS. 2005. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from immature embryo cultures. *J Plant Biochem Biot* 14: 155-160.
48. Hamilton CM. 1997. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene* 200: 107-116.
49. Han F, Ullrich SE, Clancy JA, Jitkov V, Kilian A, Romagosa I. 1996. Verification of barley seed dormancy loci via linked molecular markers. *Theor Appl Genet* 92: 87-91.
50. Hansen G, Shillito RD, Chilton MD. 1997. T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. *P Natl Acad Sci USA* 94: 11726-11730.
51. Hartung F, Schiemann J. 2013. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *The plant J* 78: 742-752.
52. Hickey LT, Hafeez AN, Robinson H, Jackson SA, Leal-Bortoli SCM, Tester M, Gao C, Godwin ID, Hayes BJ, Wulff BBH. 2019. Breeding crops to feed 10 billion. *Nat Biotechnol* 37: 744-754.
53. Himi E, Maekawa M, Miura H, Noda K. 2011. Development of PCR markers for Tamyb10 related to R-1, red grain color gene in wheat. *Theor Appl Genet* 122: 1561-1576.
54. Holme IB, Dionisio G, Brinch-Pedersen H, Wendt T, Madsen CK, Vincze E, Holm PB. 2012. Cisgenic barley with improved phytase activity. *Plant Biotechnol J* 10: 237-247.
55. Hooykaas PJJ, Shilperoort RA. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* 19: 15-38.
56. Howells RM, Craze M, Bowden S, Wallington EJ. 2018. Efficient generation of stable, heritable gene edits in wheat using CRISPR/Cas9. *BMC Plant Biol* 18: 215.
57. Hu X, Cui Y, Dong G, Feng A, Wang D, Zhao C, Zhang Y, Hu J, Zeng D, Guo L, Qian Q. 2019. Using CRISPR-Cas9 to generate semi-dwarf rice lines in elite landraces. *Sci Rep* 9: 19096.
58. Huang H, Cui T, Zhang L, Yang Q, Yang Y, Xie K, Fan C, Zhou Y. 2020. Modifications of fatty acid profile through targeted mutation at BnaFAD2 gene with CRISPR/Cas9-mediated gene editing in Brassica napus. *Theor Appl Genet* 133: 2401-2411.
59. Jaganathan D, Ramasamy K, Sellamuthu G, Jayabalan S, Venkataraman G. 2018. CRISPR for crop improvement: An update review. *Front Plant Sci* 9: 985.
60. 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.
61. Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr LL, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PS, Soltis DE, Clifton SW, Schlarbaum SE, Schuster SC, Ma H, Mack JL, Pamphili CW. 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nat Cell Biol* 473: 97-100.
62. Jo KR, Kim CJ, Kim SJ, Kim TY, Bergervoet M, Jongsma MA, Visser RGF, Jacobsen E, Vossen JH. 2014. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnol* 14: 50.
63. Jouanin A, Schaart JG, Boyd LA, Cockram J, Leigh FJ, Bates R, Wallington EJ, Visser RGF, Smulders MJM. 2019. Outlook for coeliac disease patients: towards bread wheat with hypoimmunogenic gluten by gene editing of α - and γ -gliadin gene families. *BMC Plant Biol* 19: 333.
64. Juery C, Concia L, Oliveira RD, Papon N, Ramirez-Gonzalez R, Benhamed M, Uauy C, Choulet F, Paux E. 2020. New insights into homoeologous copy number variations in the hexaploid wheat genome. *Plant Genome* 2020: e20069.
65. Jung YJ, Kim JH, Lee HJ, Kim DH, Yu J, Bae S, Cho YG, Kang KK. 2020. Generation and transcriptome profiling of *Slr1-d7* and *Slr1-d8* mutant lines with a new semi-dominant dwarf allele of *SLR1* using the CRISPR/Cas9 system in rice. *Int J Mol Sci* 21: 5492.
66. Jurica MS, Monnat RJJr, Stoddard BL. 1998. DNA Recognition and cleavage by the LAGLIDADG Homing endonuclease I-Cre I. *Mol Cell* 2: 469-476.
67. Ke XY, Chen DF, Huang Y, Shi HP. 1997. Commercial wheat transformed by electroporation of immature embryos. *Biotechnol Bioec Eq* 11: 28-31.
68. Keshavareddy G, Kumar ARV, Ramu VS. 2018. Methods

- of plant transformation-a review. *Int J Curr Microbiol App Sci* 7: 2656-2668.
69. Kieu NP, Lenman M, Wang ES, Petersen BL, Andreasson E. 2021. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Sci Rep-Uk* 11: 4487.
70. Kim HR, Choi JS, Won KH. 2020a. A stable DNA-free screening system for CRISPR/RNPs-mediated gene editing in hot and sweet cultivars of *Capsicum annuum*. *BMC Plant Biol* 20: 449.
71. Kim KM, Kang CS, Kim YK, Kim KH, Park JH, Yoon YM, Park HH, Jeong HY, Choi CH, Park JH, Kim YJ, Cheong YK, Han OK, Park TI. 2020b. Past and current status, and prospect of winter cereal crops research for food and forage in Korea. *Korean J Breed Sci Special Issue*: 73-92.
72. Kim W, Johnson JW, Graybosch RA, Gaines CS. 2003. Physicochemical properties and end-use quality of wheat starch as a function of waxy protein alleles. *J Cereal Sci* 37: 195-204.
73. KISTEP (Korea Institute of S&T Evaluation and Planning). 2018. New plant breeding techniques (NPBTs). pp. 3-5.
74. Korea customs service. 2021. Trade statistics, inquiry of trade statistics. <https://unipass.customs.go.kr>
75. KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2020. Crop Production Survey. <https://kosis.kr>
76. Lee GH, Kim TK, Choi CH, Kim JY. 2020. Evaluation of tissue culture efficiency in a speed breeding system for stable and sustainable supported wheat (*Triticum aestivum*) immature embryogenesis. *Korean J Crop Sci* 65: 365-376.
77. Li T, Liu B, Chen CY, Yang B. 2016. TALEN-mediated homologous recombination produces site-directed DNA base change and herbicide-resistant rice. *J Genet Genomics* 43: 297-305.
78. Li J, Jiao G, Sun Y, Chen J, Zhong Y, Yan L, Jiang D, Ma Y, Xia L. 2020a. Modification of starch composition, structure and properties through editing of *TaSBEIIa* in both winter and spring wheat varieties by CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J* 1-15.
79. Li J, Yang J, Li Y, Ma L. 2020b. Current strategies and advances in wheat biology. *The Crop J* 8: 879-891.
80. Li Y, Liu D, Jiang ZL, Xi X, Cao D, Shen Y, Zhang H, Liu B. 2020c. New D hordein alleles were created in barley using CRISPR/Cas9 genome editing. *Cereal Res Commun* 48: 131-138.
81. Li Z, Defoort J, Tasdighian S, Maere S, Van De Peer Y, De Smet R. 2016. Gene duplicability of core genes is highly consistent across all angiosperms. *Plant Cell* 28: 326-344.
82. Li ZK, Zhang F. 2017. Rice breeding in the post-genomics era: from concept to practice. *Curr Opin Plant Biol* 16: 261-269.
83. Lin Q, Zong Y, Xue C, Wang S, Jin S, Zhu Z, Wang Y, Anzalone AV, Raguram A, Doman JL, Liu DR, Gao C. 2020. Prime genome editing in rice and wheat. *Nat Biotechnol* 38: 582-585.
84. Liu H, Wang K, Jia Z, Gong Q, Lin Z, Du L, Pei X, Ye X. 2019. Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system. *J Exp Bot* 71: 1337-1349.
85. Liu J, Wang S, Wang H, Luo B, Cai Y, Li X, Zhang Y, Wang X. 2021. Rapid generation of tomato male-sterile lines with a marker use for hybrid seed production by CRISPR/Cas9 system. *Mol Breeding* 41: 25.
86. Liu Y, Luo W, Linghu Q, Abe F, Hisano H, Sato K, Kamiya Y, Kawaura K, Onishi K, Endo M, Toki S, Hamada H, Nagira Y, Taoka N, Imai R. 2021. In planta genome editing in commercial wheat varieties. *Front Plant Sci* 12: 648841.
87. Liu Y, Wu H, Chen H, Liu Y, He J, Kang H, Sun Z, Pan G, Wang Q, Hu J, Zhou F, Zhou K, Zheng X, Ren Y, Chen L, Wang Y, Zhao Z, Lin Q, Wu F, Zhang X, Guo X, Cheng X, Jiang L, Wu C, Wang H, Wan J. 2015. A gene cluster encoding lectin receptor kinases confers broad-spectrum and durable insect resistance in rice. *Nat Biotechnol* 33: 301-305.
88. Lörz H, Baker B, Schell J. 1985. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Molec Gen Genet* 199: 178-182.
89. Lusser M, Davies HV. 2013. Comparative regulatory approaches for groups of new plant breeding techniques. *New Biotechnol* 30: 437-446.
90. Lu X, Fu X, Wang D, Wang J, Chen X, Hao M, Wang J, Gervers KA, Guo L, Wang S, Yin Z, Fan W, Shi C, Wang X, Peng J, Chen C, Cui R, Shu N, Zhang B, Han M, Zhao X, Mu M, Yu JZ, Ye W. 2019. Resequencing of cv CRI-12 family reveals c block inheritance and recombination of agronomically important genes in artificial selection. *Plant Biotechnol J* 17: 945-955.
91. MAFRA (Ministry of agriculture, food and rural affairs).

2020. Press Release. <https://www.mafra.go.kr/mafra/index.do>
92. Ma X, Wang Z, Li W, Zhang Y, Zhou X, Liu Y, Ren Z, Pei X, Zhou K, Zhang W, He K, Zhang F, Liu J, Ma W, Xiao G, Yang D. 2019. Resequencing core accessions of a pedigree identifies derivation of genomic segments and key agronomic trait loci during cotton improvement. *Plant Biotechnol J* 17: 762-775.
93. Mahmood I, Razzaq A. 2017. Responses of explant type of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to different tissue culture media. *J Natl Sci Found Sri* 45: 265-271.
94. Marcussen T, Sandve SR, Heier L, Spannagl M, Pfeifer M, Jakovsen KS, Wulff BBH, Steuernagel B, Mayer KF, Olsen OA. 2014. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science* 345: 1250092.
95. Marton L, Wullems G, Molendijk L, Schilperoort RA. 1979. *In vitro* transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 277: 129-131.
96. McCormick S, Niedermeyer J, Fr J, Barnason A, Horsch R, Fraley R. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 5: 81-84.
97. Murin R, Mészáros K, Nemeček P, Kuna R, Faragó J. 2012. Regeneration of immature and mature embryos from diverse sets of wheat genotypes using media containing different auxins. *Acta Agron Hung* 60: 87-108.
98. Newell CA. 2000. Plant transformation technology. *Mol Biotechnol* 16: 53-65.
99. Parsons T, Sinkar V, Stettler RF, Nester EW, Gordon MP. 1986. Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol* 4: 533-536.
100. Pater S, Neuteboom LW, Pinas JE, Hooykaas PJJ, van der Zaalm BJ. 2009. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol J* 7: 821-835.
101. Paux E, Roger D, Badaeva E, Gay G, Bernard M, Sourdille P, Feuillet C. 2006. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *Plant J* 48: 463-474.
102. Potrykus I. 1990. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiol Plantarum* 79: 125-134.
103. Przetakiewicz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. 2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell Tissue Org Cult* 73: 245-256.
104. Puchta H, Hohn B. 2010. Breaking news: plants mutate right on target. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 11657-11658.
105. Ramírez-González RH, Borrill P, Lang D, Harrington SA, Brinton J, Venturini L, Davey M, Jacobs J, van Ex F, Pasha A, Khedikar Y, Robinson SJ, Cory AT, Florio T, Concia L, Juery C, Schoonbeek H, Steuernagel B, Xiang D, Ridout CJ, Chalhoub B, Mayer KFX, Benhamed M, Latrasse D, Bendahmane A, International Wheat Genome Sequencing Consortium, Wulff BBH, Appels R, Tiwari V, Datla R, Choulet F, Pozniak CJ, Provart NJ, Sharpe AG, Paux E, Spannagl M, Bräutigam A, Uauy C. 2018. The transcriptional landscape of polyploid wheat. *Science* 361: eaar6089.
106. Rashid H, Chaudhry Z, Khan MH. 2011. Effect of explant plant source and acetosyringone concentration on transformation efficiency of wheat cultivars. *Afr J Biotechnol* 10: 8737-8740.
107. Riva GA, Gonzalez-Cabrera J, Vazquez-Padron R, Ayra-Pardo C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electron J Biotechnol* 1: 25-48.
108. Rocha-Martins M, Cavaleiro GR, Matos-Rodrigues GE, Martins RAP. 2015. From gene targeting to genome editing: Transgenic animals applications and beyond. *Acad Bras Cienc* 87: 1323-1348.
109. Rommens CM, Humara JM, Ye J, Yan H, Richael C, Zhang L, Perry R, Swords K. 2004. Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiol* 135: 421-431.
110. Sanford JC. 1988. The biolistic process. *Trends Biotechnol* 6: 299-302.
111. Sato K, Yamane M, Yamaji N, Kanamori H, Tagiri A, Schwerdt JG, Fincher GB, Matsumoto T, Takeda K, Komatsuda T. 2016. Alanine aminotransferase controls seed dormancy in barley. *Nat Commun* 7: 11625.
112. Schaart JG, Visser RGF. 2009. Novel plant breeding techniques: Consequences of new genetic modification-based plant breeding techniques in comparison to conventional plant breeding. *Cogem*. <https://edepot.wur.nl/137009>
113. Sedeek KEM, Mahas A, Mahfouz M. 2019. Plant Genome Engineering for Targeted Improvement of Crop Traits. *Front Plant Sci* 10: 114.
114. Shan QW, Zhang Y, Chen KL, Zhang K, Gao C. 2015. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J* 13: 791-800.
115. Shewry PR, Tatham AS, Lazzeri P. 1999. Biootechnology

- of wheat quality. J Sci Food Agric 73: 397-406.
116. Slade AJ, McGuire C, Loeffler D, Mullenberg J, Skinner W, Fazio G, Holm A, Brandt KM, Steine MN, Goodstal JF, Knauf VC. 2012. Development of high amylose wheat through TILLING. BMC Plant Biol 12: 69.
117. Song C, Li W, Pei X, Liu Y, Ren Z, He K, Zhang F, Sun K, Zhou X, Ma X, Yang D. 2019. Dissection of the genetic variation and candidate genes of lint percentage by a genome-wide association study in upland cotton. Theor Appl Genet 132: 1991-2002.
118. Soyk S, Müller NA, Park SJ, Schmalenbach I, Jiang K, Hayama R, Zhang L, Eck JV, Jimenez-Gomez JM, Lippman ZB. 2017. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. Nat Genet 49: 162-168.
119. Srivastava V, Ow D. 2002. Biolistic mediated site-specific integration in rice. Mol Breed 8: 345-350.
120. Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 318: 624-629.
121. Statistics Korea. 2019. Statistics of agriculture, forestry and fishery. <http://Kosis.kr>
122. Tait J, Barker G. 2011. Global food security and the governance of modern biotechnologies. EMBO Rep 12: 763-768.
123. Tang H, Liu H, Zhou Y, Liu H, Du L, Wang K, Ye X. 2021. Fertility recovery of wheat male sterility controlled by *Ms2* using CRISPR/Cas9. Plant Biotechnol J 19: 224-226.
124. Taylor NJ, Fauquet CM. 2002. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. DNA Cell Biol 21: 963-977.
125. Tessema BB, Liu H, Sorensen AC, Andersen JR, Jensen J. 2020. Strategies using genomic selection to increase genetic gain in breeding programs for wheat. Front Genet 11: 578123.
126. Tzfira T, Citovsky V. 2000. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. Mol Plant Pathol 1: 201-212.
127. Tzfira T, Weinthal D, Marton I, Zeevi V, Zuker A, Vainstein A. 2012. Genome modifications in plant cells by custom-made restriction enzymes. Plant Biotechnol J 10: 373-389.
128. Torisky RS, Kovacs L, Avdiushko S, Newman JD, Hunt AG, Collins GB. 1997. Development of a binary vector system for plant transformation based on supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry 5. Plant Cell Rep 17: 102-108.
129. Uauy C. 2017. Wheat genomics comes of age. Curr Opin Plant Biol 36: 142-148.
130. Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano SS, Ishihara R, Ezura H, Osakabe Y, Osakabe K. 2017. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. Sci Rep-Uk 7: 507.
131. Uchimiya H, Fushimi T, Hashimoto H, Harada H, Syono K, Sugawara Y. 1986. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). Mol Gen Genet 204: 204-207.
132. Usman B, Nawaz G, Zhao N, Liu Y, Li R. 2020. Generation of high yielding and fragrant rice (*Oryza sativa* L.) lines by CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of three homoeologs of Cytochrome P450 gene family and *OsBADH2* and transcriptome and proteome profiling of revealed changes triggered by mutations. Plants 9: 788.
133. Valvekens D, Montagu MV, Lijsebettens MV. 1988. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. PNAS 85: 5536-5540.
134. Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plant obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. Nat Biotechnol 10: 667-674.
135. Vats S, Kumawat S, Kumar V, Patil GB, Joshi T, Sonah H, Sharma TR, Deshmukh R. 2019. Genome editing in plants: Exploration of technological advancements and challenges. Cells 8: 1386.
136. Veillet F, Durand M, Kroj T, Cesari S, Callois JL. 2020. Precision breeding made real with CRISPR: Illustration through genetic resistance to pathogens. Plant Commun 1: 100102.
137. Wang F, Xu Y, Li W, Chen Z, Wang J, Fan F, Tao Y, Jiang Y, Zhu QH, Yang J. 2021. Creating a novel herbicide-tolerance *OsALS* allele using CRISPR/Cas9-mediated gene editing. The Crop J 9: 305-312.
138. Wang G, Wang C, Lu G, Wang W, Mao G, Habben JE, Song C, Wang J, Chen J, Gao Y, Liu J, Greene TW. 2020a. Knockouts of a late flowering gene via CRISPR-Cas9 confer early maturity in rice at multiple field locations. Plant Mol Biol 104: 137-150.
139. Wang J, Kuang H, Zhang Z, Yang Y, Yan L, Zhang M,

- Song S, Guan Y. 2020b. Generation of seed lipoxygenase-free soybean using CRISPR-Cas9. *The Crop J* 8: 432-439.
140. Wang W, Simmonds J, Pan Q, Davidson D, He F, Battal A, Akhunova A, Trick HN, Uauy C, Akhunov E. 2018. Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of *TaGW2* homoeologues to grain size and weight in wheat. *Theor Appl Genet* 131: 2463-2475.
141. Wang Y, Wnag J, Guo S, Tian S, Zhang J, Li M, Gong G, Zhang H, Xu Y. 2021. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of CIBG1 decreased seed size and promoted seed germination in watermelon. *Hortic Res* 8: 70.
142. Wang YL, Xu MX, Yin GX, Tao LL, Wang DW, Ye XG. 2009. Transgenic wheat plants derived from *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryo tissues. *Cereal Res Commun* 37: 1-12.
143. Wassenegger M. 2000. RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol* 43: 203-220.
144. Watson A, Ghosh S, Williams MJ, Cuddy WS, Simmonds J, Rey MD, Hatta MAM, Hinchliffe A, Steed A, Reynolds D, Adamski NM, Breakspear A, Korolev A, Rayner T, Dixon LE, Riaz A, Martin W, Ryan M, Edwards D, Batley J, Raman H, Carter J, Rogers C, Domoney C, Moore G, Harwood W, Nicholson P, Dieters MJ, Delacy IH, Zhou J, Uauy C, Boden SA, Park RF, Wulff BH, Hickey LT. 2018. Speed breeding is a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nat Plants* 4: 23-29.
145. Wendel JF. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol* 42: 225-249.
146. Wilhelm EP, Turner AS, Laurie DA. 2009. Photoperiod insensitive Ppd-A1a mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theor Appl Genet* 118: 285-294.
147. Winans SC, Kerstetter RA, Nester EW. 1988. Transcriptional regulation of the *virA* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 170: 4047-4054.
148. Xu J, Hua K, Lang Z. 2019. Genome editing for horticultural crop improvement. *Hortic Res* 6: 113.
149. Xu R, Yang Y, Qin R, Li H, Qiu C, Li L, Wei P, Yang J. 2016. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J Genet Genomics* 43: 529-532.
150. Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6263.
151. Zaidi SS-A, Vanderschuren H, Qaim M, Mahfouz MM, Kohli A, Mansoor S, Tester M. 2019. New plant breeding technologies for food security. *Science* 363: 1390-1391.
152. Zaman QU, Li C, Cheng H, Hu Q. 2019. Genome editing opens a new era of genetic improvement in polyploid crops. *The Crop J* 7: 141-150.
153. Zambryski P. 1992. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 43: 465-490.
154. Zeng Y, Wen J, Zhao W, Wang Q, Huang W. 2020. Rational improvement of rice yield and cold tolerance by editing the three genes *OsPIN5b*, *GS3*, and *OsMYB30* with the CRISPR-Cas9 system. *Front Plant Sci* 10: 1663.
155. Zhang J, Zhang X, Chen R, Yang L, Fan K, Liu Y, Wang G, Ren Z, Liu Y. 2020a. Generation of transgene-free semidwarf maize plants by gene editing of gibberellin-oxidase20-3 using CRISPR/Cas9. *Front Plant Sci* 11: 1048.
156. Zhang P, Du H, Wang J, Pu Y, Yang C, Yan R, Yang H, Cheng H, Yu D. 2020b. Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus. *Plant Biotechnol J* 18: 1384-1395.
157. Zhang Z, Hua L, Gupta A, Tricoli D, Edwards KJ, Yang B, Li W. 2019. Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnol J* 17: 1623-1635.
158. Zimin AV, Puiu D, Hall R, Kingan S, Clavijo BJ, Salzberg SL. 2017. The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum*. *Gigascience* 6: 1-7.
159. Zong Y, Song QN, Li C, Jin S, Zhang D, Wang Y, Qiu JL, Gao C. 2018. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human *APOBEC3A*. *Nat Biotechnol* 36: 950-953.