

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ РИСА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

Хлесткина Е. К.^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42–44

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Россия, Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 10

e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

RICE GENOME EDITING USING CRISPR/Cas SYSTEM

Khlestkina E. K.^{1,2}

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42–44, Bolshaya Morskaya St., St. Petersburg, 190000, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS
10 Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090, Russia

e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Геномное редактирование при использовании системы CRISPR/Cas стало прорывной технологией в области генетики и селекции растений. Из всех возделываемых культур наиболее масштабное применение этой новой технологии наблюдается на рисе. В первую очередь данный факт объясняется не только значимостью культуры, но и относительно высокой эффективностью применения к ней методов генетической трансформации. Хотя конечным результатом геномного редактирования является получение нетрансгенного растения с заданной мутацией (мутациями), неотъемлемым этапом процесса создания такой новой мутантной формы служит применение комплекса методов генетической инженерии. На сегодняшний день система CRISPR/Cas апробирована на десятках генов-мишеней риса, из которых мутации более чем в 30 генах привели к желаемому улучшению селекционно значимых свойств. Остальные эксперименты связаны, главным образом, с проверкой функций генов, и относятся к области обратной генетики. Улучшение или приобретение новых свойств обусловлено внесением направленных мутаций в гены, влияющие на продуктивность, аромат зерна и его химический состав, сроки цветения, устойчивость к факторам биотического и абиотического стресса и гербицидам, а также контроль за опылением, используемый в гибридной селекции. Эти достижения рассматриваются в настоящем обзоре. Важно отметить, что в работы по улучшению сортов риса вовлечены уже около полусотни различных генотипов. Это создает предпосылки для широкого практического применения технологий геномного редактирования в программах по селекции риса.

Ключевые слова: CRISPR/Cas, геномное редактирование, гены-мишени, индуцированная мужская стерильность, качество зерна, направленный мутагенез, урожайность, устойчивость к болезням, устойчивость к гербицидам

Genome editing using the CRISPR/Cas system is a breakthrough technology in plant genetics and breeding. The most large-scale application of this new technology on crop species is observed for rice. This fact is explained not only by the significance of this crop, but also by the relatively high transformation amenability. Although the end result of genome editing is a non-transgenic plant with desired mutation (mutations), an unavoidable step in the process of creating such a new mutant is the use of genetic engineering methods. To date, the CRISPR/Cas system has been tested on dozens of rice target genes, of which mutations in more than 30 genes have led to the desired improvement of economically important traits. The remaining experiments are related mainly to the verification of the genes' functions, and belong to the field of reverse genetics. Improvement or acquisition of new properties is associated with mutations in the genes that affect productivity, grain fragrance and chemical composition, flowering time, the resistance to biotic and abiotic stress factors, and herbicides, as well as pollination control needed in hybrid breeding. These achievements are reviewed in the current article. It is important to note that about fifty different genotypes are already involved in improving rice varieties with the help of genome editing. This creates the prerequisites for a wide practical application of genome editing technologies in rice breeding programs.

Keywords: CRISPR/Cas, genome editing, disease resistance, grain quality, herbicide resistance, induced male sterility, target genes, targeted mutagenesis

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Конфликт интересов отсутствует.

Хлесткина Е. К.

Геномное редактирование риса при использовании системы CRISPR/Cas.

Биотехнология и селекция растений. 2019; 2(1): 49–54.

DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54

Khlestkina E. K.

Rice genome editing using CRISPR/Cas system.

Plant Biotechnology and Breeding. 2019; 2(1): 49–54.

DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54

Хлесткина Е. К. orcid.org/0000-0002-8470-8254

УДК: 575.2+577.21+608.1:633

Поступила в редакцию: 30.11.2018

Принята к публикации: 15.01.2019

Рис относится к трем основным продовольственным культурам, являясь вместе с тем одним из основных модельных объектов в современной биологии растений из-за относительно небольшого размера генома и эффективности применения на нем методов биотехнологии, в частности генетической трансформации и культивирования *in vitro*. Геном риса был секвенирован в 2002 году первым среди геномов культурных растений (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002). Расшифровка большого числа генов, установление их функции при помощи методов прямой и обратной генетики привели к тому, что сегодня информация о генах и геноме риса используется как эталонная для проведения анало-

гичных исследований на других видах растений, в первую очередь представителях однодольных. Вместе с тем, богатые знания о генах самого риса своевременно обеспечили исследователей широким перечнем генов-мишеней для направленного мутагенеза. Потому с появлением прорывного метода, а именно технологии геномного редактирования на основе системы CRISPR/Cas, и с тех пор как эту технологию впервые применили на растениях в 2013 году (Feng et al., 2013; Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013; Xie, Yang, 2013) наибольший прогресс в ее практическом использовании достигнут именно на рисе (рисунок).

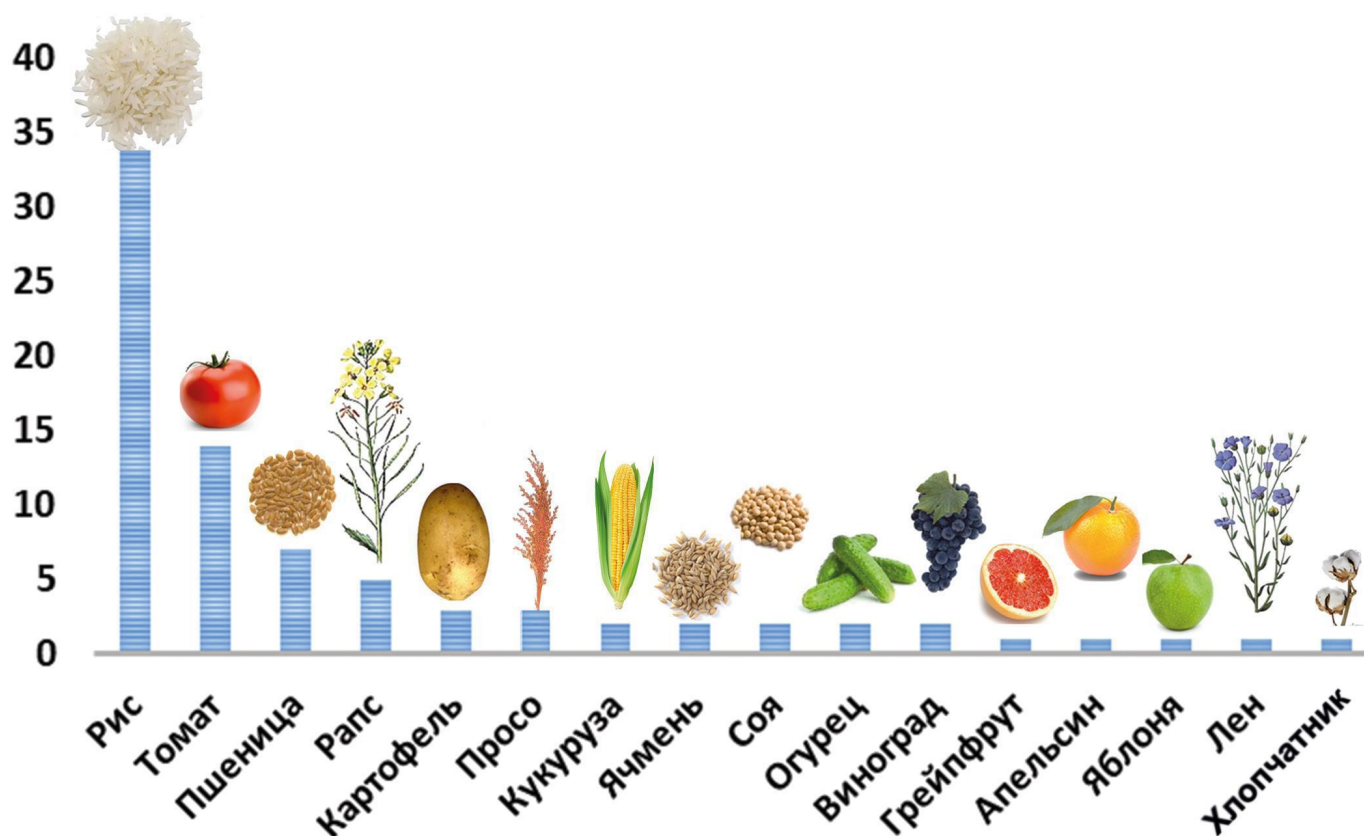


Рисунок. Количество генов, модифицированных при помощи системы геномного редактирования CRISPR/Cas с целью улучшения свойств сельскохозяйственных видов растений, за 5 лет с момента первого применения данной технологии на растениях (модифицировано по Korotkova et al., 2019).

Figure. The number of genes modified using the CRISPR/Cas genome editing system to improve the properties of crop species for 5 years since the first application of this technology to plants (modified according to Korotkova et al., 2019).

С помощью специальной направляющей РНК (нРНК) нуклеаза Cas, составляющая основу данной системы редактирования, находит ген-мишень в геноме растения и вносит целевые изменения в его структуру. Таким образом можно произвести нокаут гена, замену одного или нескольких нуклеотидов, вставку или делецию (Kolchanov et al., 2017). За 5 лет количество генов, модифицированных с помощью

системы CRISPR/Cas с целью улучшения свойств сельскохозяйственных растений, составило 81. Эти работы проведены на 16 культурах, из них у риса модифицировано больше всего генов — 34 и вовлечено больше всего генотипов — 45 в отличие от других культур, у которых большинство генотипов с трудом поддаются генетической трансформации (Korotkova et al., 2018). Следует отметить, что во многих из

представленных в настоящее время работ по модификации генов сельскохозяйственных растений продемонстрирована возможность получения нетрансгенных модифицированных растений, свободных от служебных конструкций. Это достигается в большинстве случаев за счет независимого наследования модифицированных локусов и локусов со встроенной служебной конструкцией. Такие растения можно отобрать уже в первом поколении (Zhou et al., 2016).

Одно из важных преимуществ системы CRISPR/Cas состоит в возможности одновременного внесения нескольких мутаций в выбранные участки генома («мультиплексное» редактирование). Таким способом можно скомбинировать в одном генотипе лучшие варианты генов, которые в природном и селекционном материале «разбросаны» по разным генотипам, причем осуществить это комбинирование не путем долгих скрещиваний, а с помощью быстрого редактирования генома (Kolchanov et al., 2017).

Среди рассматриваемых ниже примеров будет продемонстрировано мультиплексное редактирование генов, контролируемых как разные признаки, так и один и тот же признак. В последнем случае данная технология использовалась для усиления эффекта проявления количественного признака.

Качество и химический состав зерна

CRISPR/Cas-направленный нокаут генов перспективен для улучшения и различных свойств зерна. Например, нокаут гена *Waxy*, кодирующего гранул-связанную крахмалсинтазу (GBSS) позволил получить рис с низким содержанием амилозы (Zhang et al., 2018). В зависимости от содержания амилозы коммерческие сорта риса подразделяются на 5 групп: рис «waxy», иначе называемый глютинозным рисом (0–5%), рис с очень низким (5–12%), низким (12–20%), средним (20–25%) и высоким (25–33%) содержанием амилозы. При варке зёрна глютинозных сортов риса «склеиваются» друг с другом, что требуется для приготовления определенных блюд в азиатской кухне. Такой рис чаще используется для сладких блюд, так как при снижении количества линейных молекул крахмала (амилозы), увеличивается доля разветвленных молекул амилопектина, который легче расщепляется в пищеварительном тракте до простых сахаров и быстрее усваивается организмом. Напротив, увеличение содержания амилозы может иметь свои преимущества для диетического питания при диабете и ожирении. Переключение синтеза крахмала в сторону амилопектина связано с ферментом SBE (starch branching enzyme). Нокаут одного из генов *SBE* (*SBEIIb*) при помощи системы CRISPR/Cas привел к увеличению содержания амилозы у сорта Kitaake на 10% (повышению с 15% до 25%), тогда как нокаут другого гена (*SBEI*) не вызвал изменений (Sun et al., 2017).

Нокаут гена *FAD2-1*, кодирующего десатуразу жирных кислот, привел к увеличению содержания в зерне устойчивой к окислению олеиновой кислоты и отсутствию менее

стабильной линолевой кислоты (Abe et al., 2018).

Ярко выраженный аромат индийского риса Басмати и тайского риса Жасмин обусловлен присутствием в зерне 2-ацетил-1-пирролина. Его накопление связано с мутацией гена *BADH2* (*BAD2*), расположенного в хромосоме 8 и кодирующего бетаинальдегиддегидрогеназу. Формы со случайными мутациями гена *BADH2*, приведшими к утрате его функциональности, были отобраны в процессе селекции риса. С появлением технологий направленного мутагенеза стало возможным целенаправленно проводить нокаут гена *BADH2* для придания аромата зерну любого выбранного сорта. Так, с использованием системы CRISPR/Cas был произведен нокаут данного гена в сортах Xidao (Lu et al., 2017) и Nipponbare (Shen et al., 2017a). Эффективность мутагенеза составила 70 и 81% соответственно. Отметим, что в работе на сорте Nipponbare было применено мультиплексное редактирование, нацеленное не только на придание аромата, но и на улучшение продуктивности и укорочение вегетационного периода — для этого были одновременно отредактированы 7 генов (Shen et al., 2017a). При нацеливании на ген *BADH2* важно учитывать его сходство с расположенным в хромосоме 4 геном *BADH1*, связанным со стрессоустойчивостью растений риса, и конструировать направляющую РНК с учетом специфичных различий между генами *BADH1* и *BADH2*, так чтобы использование системы редактирования приводило к нокауту гена *BADH2*, не затрагивая *BADH1*.

С помощью геномного редактирования, как было показано, можно контролировать содержание вредных веществ в зерне риса. Так, CRISPR/Cas-направленный нокаут генов *LCT1* и *Nramp5*, кодирующих транспортные белки, осуществляющие доставку в зерно поглощаемых из почвы ионов кадмия, позволил существенно снизить содержание ионов этого тяжелого металла в зерне риса (Lu et al., 2017; Tang et al., 2017).

Продуктивность и скороспелость

Удобными генами-мишенями, нокаут которых приводит к улучшению хозяйственно ценных признаков, являются негативные регуляторы роста, отрицательно влияющие на растяжение и деление клеток. Потеря функциональности этих генов приводит к увеличению продуктивности.

Например, у риса были одновременно нокаутированы три гена (*GW2*, *GW5*, *TGW6* — по отдельности и в разных комбинациях), негативно влияющих на длину зерна. Было показано увеличение зерна пропорционально числу нокаутированных генов (Xu et al., 2016).

С использованием системы CRISPR/Cas проводился нокаут четырех генов, разных по своим функциям, но потенциально так или иначе связанных с продуктивностью (Li et al., 2016a). Среди генов-мишеней были: негативный регулятор озерненности *Gn1a*; ген *DEP1*, нокаут которого связан с низкорослостью и формированием плотной прямостоячей метелки (последнее изменение также может

быть осуществлено путем нокаута гена *EP3*, Shen et al., 2017a); негативный регулятор размера зерна *GS3*; регулятор архитектуры растения *IPA1* (нокаут по нему должен приводить к снижению интенсивности кущения, уменьшению числа непродуктивных побегов, повышенной озерненности, утолщению и прочности стеблей). В дальнейшем у семи сортов риса были получены нокаутные генотипы по *GS3*, а также двойные нокауты *Gn1a + GS3*. Повышенная продуктивность (на 3–7%) была отмечена, однако, не у всех мутантов. У некоторых помимо ожидаемых изменений наблюдалось уменьшение числа продуктивных побегов, поэтому взамен ожидаемого повышения продуктивности происходило ее снижение (Shen et al., 2018).

Более быстрого роста и повышения урожайности риса Nipponbare удалось достичь путем мультиплексного редактирования (нокаута) генов *PYL1*, *PYL4* и *PYL6*, кодирующих PYR1-подобные регуляторные компоненты рецептора абсцизовой кислоты (Miao et al., 2018).

Низкорослость может быть достигнута при помощи направленного мутагенеза не только путем нокаута упомянутого выше гена *DEP1*, но и за счет замены одной аминокислоты в продукте гена *SLR1* — репрессоре ответа на гиббереллин (Lu, Zhu, 2017). Если для нокаута достаточно, чтобы РНК-направляемая нуклеаза Cas внесла двуцепочечный разрыв в заданном участке гена, а репарация разрыва (за счет функционирования естественных клеточных механизмов) привела к отсутствию гомологичной матрицы к инсерции/делеции 1–2 пар оснований, то для направленной замены отдельной пары оснований или целого участка гена требуется, чтобы при редактировании в клетке присутствовала матрица несущая новый вариант между участками ДНК, гомологичными последовательностям генома, фланкирующим разрыв. В этом случае также вступает в действие естественный клеточный механизм — происходит репарация двуниевых разрывов ДНК, сопровождаемая гомологичной рекомбинацией. Благодаря этому в заданный участок генома встраивается нужный вариант нуклеотидной последовательности или происходит замена одного аллельного варианта другим (в последнем случае производят два разрыва для удаления ненужного аллельного варианта и встраивания на его место другого). Заменяться может не вся последовательность гена, а лишь та его часть, по которой отличаются аллельные варианты, вплоть до замены одного нуклеотида. Например, произведенная однонуклеотидная замена в гене *NRT1.1B* позволила повысить эффективность усвоения азота (Li et al., 2018).

Нокаут факторов (*Hd2*, *Hd4*, *Hd5*), негативно влияющих на переход от вегетативной фазы к генеративной за счет супрессии гена *Ehd1* (*Early heading date 1*), позволил получить на основе нескольких сортов риса мутанты, отличающиеся очень ранними сроками цветения (Li et al., 2017). Более ранних сроков цветения в условиях длинного дня можно также достичь путем нокаута гена *Hd1*, контролирующего позднее цветение при длинном дне (Shen et al., 2017a).

Устойчивость к факторам биотического и абиотического стресса и к гербицидам

Как показал ряд работ, одна из перспективных областей применения CRISPR/Cas-направленного нокаута генов — повышение устойчивости растений к патогенам и вредителям за счет целенаправленного повреждения генов, обуславливающих чувствительность к заболеваниям. Например, нокаут гена *ERF922* риса позволил получить формы, устойчивые к пирикулярриозу (Wang et al., 2016).

Модификация генов, участвующих в ответе на повреждение клеток растений токсичными соединениями и на эффективности поглощения их из почвы, позволяет повысить устойчивость растений и редуцировать в них накопление вредных веществ. Так, нокаут гена *ARM1*, кодирующего транскрипционный фактор MYB R2R3-типа, который участвует в развитии ответа на стресс, вызываемый соединениями мышьяка, повысил устойчивость растений риса к этим токсическим веществам (Wang et al., 2017). Нокаут гена *HAK1*, кодирующего белок-транспортер ионов калия, позволил существенно уменьшить поглощение растением ионов цезия (Nieves-Cordones et al., 2017).

Модифицированные растения риса, устойчивые к гербициду хлорсульфону, удалось получить с помощью замены «чувствительного» аллеля гена *ALS* на «устойчивый» с использованием нуклеазы Cas двумя различными путями: (1) за счет внесения двуцепочечного разрыва с последующей гомологичной рекомбинацией (Sun et al., 2016) и (2) путем использования неактивного РНК-направляемого белка Cas, соединенного с цитидиндезаминазой (Shimatani et al., 2017, 2018). Первый способ был также использован для модификации гена *EPSPS* с целью повышения устойчивости риса к гербициду глифосату (Li et al., 2016b).

Гибридная селекция

Успешный пример CRISPR/Cas-направленного нокаута — получение форм с контролируемой мужской стерильностью для дальнейшего использования в гибридной селекции. В первом случае этого удалось достичь за счет нокаута гена *TMS5*, кодирующего негативный регулятор термочувствительной генной мужской стерильности (Zhou et al., 2016). Полученные нетрансгенные модифицированные формы фертильны при оптимальной для развития растений температуре, но полностью стерильны при ее повышении до 28 °C. Это позволяет препятствовать самоопылению растений данных линий при получении гибридов за счет осуществления данного этапа селекции в теплицах с повышенной в нужный момент температурой (при этом растения с мужской стерильностью опыляются пыльцой растений другой родительской линии и завязываются семена будущих гибридов F₁). Когда полученные таким образом гибриды используются далее в производственных посевах, выращен-

ные из них в оптимальных условиях растения фертильны и завязывают полноценные семена. Идея воздействовать на регулятор термочувствительной генной мужской стерильности риса возникала и ранее, однако попытки сделать это с помощью сайленсинга гена *TMS5* не давали стабильного результата, и только использование системы CRISPR/Cas позволило решить данную проблему (Zhou et al., 2016).

В другой работе были получены нетрансгенные линии риса, нокаутные по гену *CSA* — негативному регулятору фотопериодчувствительной генной мужской стерильности. Стерильность пыльцы достигается при выращивании в условиях короткого дня, тогда как в условиях длинного дня растения фертильны (Li et al., 2016c). Таким образом, при организации процесса семеноводства в естественных или искусственно созданных условиях короткого дня можно получать семена, реализуемые в дальнейшем для производства гибридов в географических зонах, отличающихся длинным фотопериодом.

Эти способы являются изящным решением проблемы контроля опыления в гибридной селекции и вместе с тем служат экологически безопасной альтернативой так называемой химической кастрации, используемой в настоящее время на тех культурах, для которых в силу биологических особенностей так и не удалось создать систему контроля на основе ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности).

Другая проблема на пути использования гетерозиса — гибридная несовместимость, проявляющейся в виде мужской стерильности у полученных гибридов между растениями риса разных подвидов (*indica* и *japonica*). Нокаут генов *Sc-j* (Shen et al., 2017b), *SaF* и *SaM* (Xie et al., 2017), контролирующих этот признак у риса, позволил преодолеть стерильность гибридов.

Заключение

Таким образом, за пять лет применения системы CRISPR/Cas на рисе удалось получить широкий спектр модифицированных генотипов, в которых направленные мутации, внесенные в гены-мишени, привели к улучшению широкого спектра хозяйственно ценных признаков, связанных с продуктивностью, качеством и химическим составом зерна, скороспелостью, устойчивостью к факторам биотического и абиотического стресса и гербицидам. Кроме того, применение данной технологии оказалось перспективным для использования в гибридной селекции для контроля опыления и преодоления гибридной несовместимости. Среди культур, на которых апробирована система CRISPR/Cas, именно на рисе достигнуты наиболее прорывные результаты, модифицировано больше всего генов с использованием уже около полусотни различных генотипов, что создает предпосылки для практического применения технологий геномного редактирования в программах по селекции риса.

References/Литература

- Abe K, Araki E, Suzuki Y, Toki S, Saika H (2018) Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. *Plant Physiology and Biochemistry*; 131: 58–62. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.04.033
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cammings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalima T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*; 296(5565): 92–100. DOI: 10.1126/science.1068275
- Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang DL, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu X, Zhu JK (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*; 111: 4632–4637. DOI: 10.1073/pnas.1400822111
- Kolchanov NA, Kochetov AV, Salina EA, Pershina LA, Khlestkina EK, Shumny VK (2017) Status and prospects of marker-assisted and genomic plant breeding. *Herald of the Russian Academy of Sciences*; 87(2): 125–131. DOI: 10.1134/S1019331617020113
- Korotkova AM, Gerasimova SV, Khlestkina EK Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*; 2019; 23(1): 29–37. DOI 10.18699/VJ19.458
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*; 31: 688–691. DOI:10.1038/nbt.2654
- Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, Lin Q, Luo W, Wu G, Li H (2016a) Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*; 7: 377. DOI: 10.3389/fpls.2016.00377
- Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, Li J, Gao C (2016b) Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat. Plant.*; 2: 16139. DOI 10.1038/nplants.2016.139
- Li Q, Zhang D, Chen M, Liang W, Wei J, Qi Y, Yuan Z (2016) Development of japonica photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing carbon starved anther using CRISPR/Cas9. *Journal of Genetics and Genomics*; 43: 415–419. DOI: 10.1016/j.jgg.2016.04.011
- Li X, Zhou W, Ren Y, Tian X, Lv T, Wang Z, Fang J, Chu C, Yang J, Bu Q (2017) High-efficiency breeding of early-maturing rice cultivars via CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Journal of Genetics and Genomics*; 44(3): 175–178. DOI: 10.1016/J.JGG.2017.02.001
- Li J, Zhang X, Sun Y, Zhang J, Du W, Guo X, Li X, Zhao Y, Xia L (2018) Efficient allelic replacement in rice by gene editing: a case study of the *NRT1.1B* gene. *Journal of Integrative Plant Biology*; 60(7): 536–540. DOI: 10.1111/jipb.12650
- Lu H, Liu S, Xu S, Chen W, Zhou X, Tan Y, Huang J, Shu Q (2017) CRISPR-S: an active interference element for a rapid and inexpensive selection of genome-edited, transgene-free rice plants. *Plant Biotechnology Journal*; 15(11): 1371–1373. DOI:10.1016/j.molp.2016.11.013
- Lu Y, Zhu J-K (2017) Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant*; 10: 523–525.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*; 115(23): 6058–6063. DOI: 10.1073/pnas.1804774115
- Nieves-Cordones M, Mohamed S, Tanoi K, Kobayashi NI, Takagi K, Vernet A, Guiderdoni E, Perin C, Sentenac H, Véry AA (2017) Production of low-Cs⁺ rice plants by inactivation of the K⁺ transporter *OsHAK1* with the CRISPR-Cas system. *The Plant Journal*; 92: 43–56. DOI: 10.1111/tpj.13632
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*; 31: 691–693. DOI: 10.1038/nbt.265
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ,

- Qiu JL, Gao C (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*; 31: 686–688. DOI: 10.1038/nbt.2650
- Shen L, Wan C, Fu Y, Wang J, Liu Q, Zhan X, Yan C, Qian Q, Wang K. (2018) QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. *Journal of Integrative Plant Biology*; 60: 89–93. DOI: 10.1111/jipb.12501
- Shen L, Hua Y, Fu Y, Li J, Liu Q, Jiao X, Xin G., Wang J, Wang X, Yan C, Wang K (2017a) Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Science China Life Sciences*; 60(5): 506–515. DOI: 10.1007/s11427-017-9008-8
- Shen R, Wang L, Liu X, Wu J, Jin W, Zhao X, Xie X, Zhu Q, Tang H, Li Q, Chen L, Liu YG (2017b) Genomic structural variation-mediated allelic suppression causes hybrid male sterility in rice. *Nature Communications*; 8(1): 1310. DOI: 10.1038/s41467-017-01400-y
- Shimatani Z, Fujikura U, Ishii H, Terada R, Nishida K, Kondo A (2018) Herbicide tolerance-assisted multiplex targeted nucleotide substitution in rice. *Data in Brief*; 20: 1325–1331. DOI: 10.1016/j.dib.2018.08.124
- 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. *Nature Biotechnology*; 35(5): 441–443. DOI: 10.1038/nbt.3833
- Sum Y, Zhan X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, Guo X, Du W, Zha Y, Xia L (2016) Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Molecular Plant*; 9: 628–631. DOI: 10.1016/j.molp.2016.01.001
- Sum Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J, Guo X, Du W, Du J, Francis F, Zhao Y, Xia L (2017) Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science*; 8: 298. DOI: 10.3389/fpls.2017.00298
- Tang L, Mao B, Li Y, Lv Q, Zhang L, Chen C, He H, Wang W, Zeng X, Shao Y, Pan Y, Hu Y, Peng Y, Fu X, Li H, Xia S, Zhao B (2017) Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Scientific Reports*; 7(1): 14438. DOI: 10.1038/s41598-017-14832-9
- Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Liu YG, Zhao K (2016) Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *PLoS ONE*; 11(4): e0154027. DOI: 10.1371/journal.pone.0154027
- Wang FZ, Chen MX, Yu LJ, Xie LJ, Yuan LB, Qi H, Xiao M, Guo W, Chen Z, Yi K, Zhang J, Qiu R, Shu W, Xiao S, Chen QF (2017) *OsARM1*, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in regulation of the response to arsenic stress in rice. *Frontiers in Plant Science*; 8: 1868. DOI: 10.3389/fpls.2017.01868
- Xie K, Yang Y (2013) RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular Plant*; 6: 1975–1983. DOI: 10.1093/mp/sst119
- Xie Y, Niu B, Long Y, Li G, Tang J, Zhang Y, Ren D, Liu Y, Chen L (2017) Suppression or knockout of *SaF* / *SaM* overcomes the *Sa*-mediated hybrid male sterility in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*; 59(9): 669–679. DOI: 10.1111/jipb.12564
- 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. *Journal of Genetics and Genomics*; 43: 529–532. DOI: 10.1016/j.jgg.2016.07.003
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*; 296(5565): 79–92. DOI: 10.1126/science.1068037
- Zhang J, Zhang H, Botella JR, Zhu JK (2018) Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *Waxy* gene in elite rice varieties. *Journal of Integrative Plant Biology*; 60(5): 369–375. DOI: 10.1111/jipb.12620
- 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. *Scientific Reports*; 6: 37395. DOI: 10.1038/srep37395