

CRISPR기술에 의한 불리한 환경에 견디는 벼의 육종

허명식, 김순의

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《당면하여 생육기일이 짧고 가물과 비바람, 랭한과 고온, 병해충에 잘 견디는 품종, 침수지, 간석지논에 적합한 품종들을 육종하는데 힘을 넣어 두벌농사면적을 늘이고 모든 농경지들에서 높고 안전한 수확을 거둘수 있는 담보를 마련하여야 합니다.》

벼는 세계인구의 절반이상이 소비하는 주요알곡작물로서 가장 큰 열량제공원천이다. 인구의 급속한 장성은 알곡수확고를 보다 더 높일것을 끊임없이 요구하고있다. 가물과 큰물, 염성, 고온, 저온, 방사선과 같은 여러가지 비생물학적스트레스에 의하여 농업생산의 질과 량은 떨어지고있다. 앞으로의 기후변화를 보면 극심한 가물과 극단한 온도가 계속되면서 전반적인 알곡생산을 심각히 위협할것이다. 온도와 강수량은 주요환경인자로서 벼의 성장과 발육, 생산성에 영향을 미친다.[1] 아시아에서만도 적어도 2 300만정보의 벼재배면적이 가물의 피해를 받고있다.[2] 전체적인 평균겉면온도가 지난 세기에 0.85℃ 올라가 세계의 각이한 지역의 벼재배에 부정적영향을 주고있다. 앞으로 품종이 유전적으로 개량되지 않는 한 평균온도가 1℃ 올라갈 때마다 전반적인 벼생산은 3.2% 감소한다고 보고있다. 지구겉면의 평균온도가 계속 올라가므로 아열대지역에서 강수량은 감소될것이며 가물과 큰물, 태풍과 같은 극단한 사태가 더 자주 일어날것이다. 기후의 부정적영향은 벼수확고와 생산성에만 국한되는것이 아니라 특히 아시아와 아프리카에서 가격상승과 굶주림, 실업, 빈궁으로 하여 사회에 보다 큰 영향을 미치게 된다. 그러므로 기후변화가 벼생산에 미치는 영향을 줄이자면 불가피하게 불리한 환경에 잘 견디는 유전자형을 설계하여야 한다.

CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)기술에 의한 게놈 편집은 만능적인 수단으로서 동물과 식물의 게놈을 정확히 수식할수 있는 새로운 길을 열어주었다. 2013년에 개발된 CRISPR기술은 유전자의 기능을 연구하며 그것을 변화시켜 비생물학적 및 생물학적스트레스에 대한 견딜성을 높여주어 알곡작물의 생산능력을 높여주거나 알곡의 질을 개선하는데서 커다란 변혁을 일으키고있다. 처음 세균에서 발견된 CRISPR계는 세균파취에 대한 획득면역계로서 사이배렬이라고 하는 외래DNA의 짧은 단편이 세균게놈에 삽입되고 그것이 전사되고 가공되어 CRISPR RNA(crRNA)로 된다. crRNA는 트랜스활성화crRNA(tracrRNA)에 아닐화되어 안내RNA(gRNA)를 형성한 다음 Cas9(CRISPR associated protein 9)엔도뉴클레아제를 표적부위로 안내한다. 표적이 인식되자면 사이배렬의 바로 뒤에 원사이배렬이웃모티프(PAM)가 있어야 한다. RNA에 의해 안내되는 엔도뉴클레아제(RGEN) Cas9는 PAM의 3bp 상류에 배렬특이적인 두오리사슬절단(DSB)을 도입한다. 이것은 숙주의 자연적인 세포내 수복장치를 활성화시켜 일반적으로 비상동말단연결(NHEJ)경로를 통하여 말단을 다시 연결한다.(그림) NHEJ과정에는 흔히 오류가 생기며 보통 절단부위에서 약간의 삽입/결실이 생기거나 1개 혹은 몇개의 뉴클레오타드가 치환된다. 이러한 변화가 생기면 단백질을 암호화하는 영역인 경우 읽기틀이 달라져 종결코돈이 생기거나 기능을 할수 없는 폴리펩티드가 생겨난다. crRNA와 tracrRNA

는 하나로 연결될수 있으며 1개의 안내RNA(sgRNA)로 발현된다.[3] 따라서 Cas9는 식물에서 쉽게 임의의 게놈배열에 대하여 gRNA의 20bp사이배열을 표적특이적으로 변화시킨다.[4] 증식하는 세포는 또한 상동재조합수복(HDR)에 의하여 DSB를 수복할수 있다. 그러나 HDR가 진행되자면 DNA가 절단된 부위의 양쪽말단과 똑같은 상동배열(상동팔)을 가진 다른 내줄체주형DNA가 있어야 한다. HDR를 리용하면 변이된 유전자나 나쁜 대립변이를 필요한 단편으로 수복하거나 치환시켜 형질을 개선하거나 새로운 형질을 가지게 할수 있다. 따라서 인공적인 안내RNA와 함께 Cas9엔도뉴클레아제를 리용하면 PAM(5'-N₁₋₂₀NGG/NAG-3')의 앞에 있는 20뉴클레오티드의 임의의 DNA사슬을 표적특이적으로 편집할수 있다.

논문에서는 CRISPR/Cas기술을 리용하여 불리한 환경에 견디는 벼를 육종하는데 필요한 잠정적인 후보유전자와 경로, 리용가능한 원천과 게놈편집된 벼계통을 만드는데서 이룩된 최신성과들에 대하여 논의하였으며 벼게놈편집에서 제기되는 문제와 전망에 대하여서도 취급하였다.

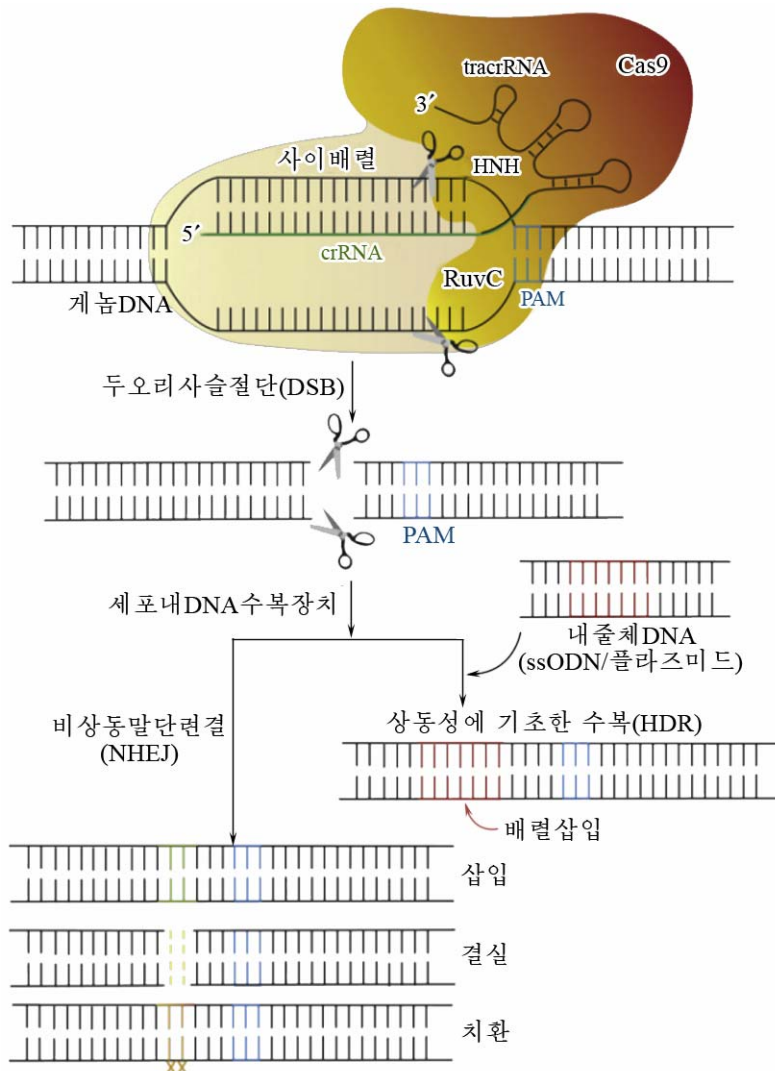


그림. CRISPR/Cas9에 의한 게놈편집

1. CRISPR기술에 의한 벼게놈편집에 리용할수 있는 원천

CRISPR기술은 개발된지 7년밖에 되지 않았지만 매우 쉽고 신속하며 효율적이고 정확한것으로 하여 세균과 동물, 식물을 포함한 생물학의 모든 분야에 광범히 도입되었다. 본래는 Cas9와 sgRNA의 발현카세트를 가진 2개의 운반체를 따로따로 리용하였지만 지금은 그 두가지를 모두 1개의 2원운반체에 가진 계가 개발되었다.[5] CRISPR기술에서는 PAM의 앞에 있는 20뉴클레오티드의 특이적인 사이배렬을 찾지만 하면 된다. 각이한 생물에 대하여 gRNA를 설계하는 수십가지의 생명정보도구가 개발되었다. 그러나 벼에서 sgRNA의 설계를 지원하는 도구는 얼마 되지 않는다. CRISPR-PLANT싸이트(<http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>)는 벼유전자의 MSU Id나 표적영역의 염색체위치를 리용하여 고도로 특이적인 사이배렬을 예측한다. 사이배렬의 엑손/인트론특성과 DSB부위(PAM의 3nt 상류)의 제한효소부위도 볼수 있다. CRISPR-P 2.0(<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2>)은 표적의효과가 최소인 식물sgRNA를 설계하는 무료로 사용할수 있는 또 다른 만능도구이다.[6] 이 싸이트는 가장 널리 리용되는 *Streptococcus pyogenes* Cas9(SpCas9)뿐만아니라 Cpf1[7]이나 각이한 다른 Cas9엔도뉴클레아제의 gRNA설계를 지원한다. 또한 GC함량과 제한효소부위, 마이크로상동성, 2차구조를 포함하여 안내배렬의 특징을 폭넓게 분석한다. 사이배렬은 올리고뉴클레오티드로서 합성하여 일반적으로 리용되는 클론화법이나 Golden Gate클론화법으로 2원운반체에 삽입하고 형질전환시킨다. 사이배렬이 잘 선택되어 표적절단부위에 제한효소부위가 있으면 변이표적을 PCR증폭하고 제한효소절단산물을 확인한다. 유전자전이계통에서 또한 불일치배렬로 하여 헤테로두오리사슬DNA에 생긴 1개 혹은 여러개의 뉴클레오티드의 루프를 절단하는 T7엔도뉴클레아제I(T7EI)와 Surveyor뉴클레아제와 같은 엔도뉴클레아제를 리용하여 표적부위의 변이를 검출할수 있다. 다른형접합체체통의 경우 표적부위의 배렬을 Sanger법으로 결정하면 삽입/결실이 있는 경우 중복봉우리가 생긴다. CRISPR-ID나 Poly Peak Parser, TIDE, ICE를 리용하여 배렬흔적을 분석한 다음 식물체에서 변이수준을 정량적으로 평가할수 있다. 올리고뉴클레오티드에 달긴 핵산(LNATM)을 도입하면 한 뉴클레오티드가 차이나는 비슷한 배렬의 녹음점(T_m)차이도 구분할수 있다. 달긴 핵산에 기초한 qPCR와 dPCR분석법을 리용하여서도 표적게놈편집정형을 신속히 정량하고 재조합체변이를 검출할수 있다.

2. 비생물학적스트레스견딜성이 높은 벼의 게놈편집가능성

비생물학적스트레스는 각이하며 그것에 대한 견딜성물림새도 복잡하다. 일반적으로 비생물학적스트레스에 대한 견딜성은 신호전달과 조절 및 대사경로를 비롯한 여러 인자가 참가하는 유전자호상작용에 의하여 이루어져 세포가 항상성을 회복하게 한다. 벼에 비생물학적스트레스에 대한 견딜성형질을 부여하기 위하여 여러 유전자들을 집적시킬수 있는데 그것은 품이 많이 들고 시일도 오래 걸린다. 그러나 CRISPR/Cas계로 여러 유전자들을 동시에 편집하는것은 매우 쉽고 효율적이며 이미 벼를 비롯한 여러 식물종에서 진행되었다. HDR 경로를 리용하여 CRISPR기술로 잘못된 유전자를 수복하거나 치환하면 유전자흐름때 연쇄현상에 의하여 다른 유전자들도 함께 확산되는것과 달리 목적유전자만을 편집할수 있다. CRISPR/Cas계를 리용하여 비생물학적스트레스에 대한 견딜성을 조절하는 여러가지 유전자들과 경로들을 수식함으로써 불리한 기후에 잘 견디는 벼를 육종할수 있다.

1) 기후변화에 알맞는 벼에 요구되는 표현형

벼는 저지대와 고지대, 침수지, 천수답, 관수지, 열대 및 온대와 같은 가장 다양한 환경에서 재배된다. 이러한 생태환경으로 하여 벼재배에서는 많은 문제점이 제기되고있다. 그러므로 유전자형을 설계하자면 특이적이면서도 해당 생태지역에 적합하여야 한다. 일반적으로 모단계와 생식단계에서 추위와 고온, 가물에 대한 견딜성이 중요한 문제로 제기된다. 뿌리와 발을잎특성과 같은 2차형질도 가물 및 고온견딜성이 높은 벼품종을 얻어내는 데서 도움이 된다. 대세기를 높여 넘어짐에 더 잘 견디게 하는 것도 침수와 폭풍의 위협을 안고있는 지역에서 필수적인 특징으로 된다. 극단한 날씨로 하여 벼가 초기단계에서 자라지 못하거나 위도가 높은 지역들에서는 생육기일이 짧은 형질이 필수적이다. 종합적으로 볼 때 필요한 표현형은 품종과 생태지, 소비자와 농민의 요구, 기후 등에 따라 크게 달라진다.

2) 불리한 날씨에 잘 견디는 벼를 얻어내는데 필요한 후보유전자와 경로들

벼에서 가물견딜성과 관련한 여러 유전자들과 QTL들이 동정되고 그 특성이 밝혀졌다. 가물견딜성의 양성조절인자에는 ABA접수체(*OsPYL*)와 2개의 각괴필립축적인자(*DWA1*과 *ROC4*), 몇가지 전사인자(TF: *OsNAC2*, *OsNAC14*, *OsLG3*, *OsDRAP1*)들이 있으며 음성조절인자로는 가물고감수성(*DHS*)과 *OsbZIP46* TF, *MODD* 등이 있다. *OsLG3* TF프로모터에 변이가 있으면 기능획득대립변이가 생기는데 이것은 프로모터도 역시 게놈편집의 표적으로 된다는 것을 보여준다.

벼는 반물살이식물이지만 식물체가 통채로 오래동안 물에 잠기면 벼의 생육과 생산성에 큰 영향을 미친다. *Sub1A*는 벼에 침수견딜성을 부여하는데 가장 널리 이용된 유전자이다. *Sub1A*의 견딜성대립변이로 1개의 SNP가 있는데 P186S치환이 있으면 감수성대립변이로 된다. *SNORKEL1*과 *SNORKEL2*, *SD1(SEMIDWARF1)*, *OsEIL1a*는 *Sub1A*와는 독립적인 물림새로 큰물견딜성에 기여하는 중요한 유전자들이다. 잎가스층1(LGF1)은 소수성잎에 가스층이 생기게 하여 침수조건에서도 빛합성을 촉진한다. *Sub1A*는 염기편집(아래에서 취급)을 진행하여 견딜성을 보다 더 높일수 있는 훌륭한 대상유전자로 되며 다른 유전자들은 HDR/NHEJ에 기초한 유전자편집을 통하여 더 좋은 대립변이나 수식을 도입할수 있는 리상적인 후보유전자들이다.

침수와 가물외에 극단한 기온은 열대 및 아열대지역들에서 벼를 재배하는데서 파괴적인 영향을 주는 기후조건이다. 전사인자 *OsDREB1A*와 G-단백질신호전달의 조절인자 *COLD1*, F-통단백질 *Ctb1*, 로이신이 풍부한 반복접수체류사키나제 *CTB4a*, 추정단백질 *qLTG3-1(Os03g0103300)*들은 추위견딜성을 양성으로 조절하는 인자들로서 동정되었다. 추위견딜성 및 감수성품종들에서 추정유전자 *Os09g0410300*의 프로모터배열에서 차이가 있다. 비록 높은온도스트레스견딜성과 관련된 여러 QTL들이 동정되었지만 QTL속에서 원인유전자를 찾아내고 유전자의 구조적 및 기능적특징을 밝히기 위한 연구는 아직 충분히 진행되지 못하였다. 애기장대의 접수체류사키나제 *ERECTA(ER)*의 상동유전자(*Os06g0203800*)와 열견딜성1(TT1)의 유전자 *Os03g0387100*은 벼의 모단계와 생식단계에서 높은온도스트레스견딜성에 기여하는 중요한 유전자들이다. 이와 류사하게 *OsMADS87*은 높은온도스트레스때 종자크기의 음성조절인자이다. 고온이 벼생산성에 미치는 부정적영향을 고려할 때 높은온도스트레스견딜성과 관련된 많은 유전자들이 게놈편집기술에 의하여 그 특징들이 기능적으로 해명되어야 한다. 단백질암호유전자들외에 마이크로RNA(miRNA)도 비생물학스트레스견딜성을 개선하는데서 게놈편집의 표적으로 될수 있다. 표 1에 기후변화에 의한 주요비생물학스트레스와 관련된 기본유전자들을 제시하였다.

표 1. 기후변화에 의한 주요비생물학적스트레스와 관련된 기본유전자들

No.	유전자/접속명	유전자명	성장/실험단계
가물건달성			
1	<i>LOC_Os01g03290</i>	<i>EAR1</i>	30d나이모
2	<i>LOC_Os06g36670</i>	<i>OsPYL9</i>	20d나이모
3	<i>LOC_Os03g11550</i>	<i>MODD</i>	13d나이모
4	<i>LOC_Os04g38720</i>	<i>OsNAC2</i>	14d나이모
5	<i>LOC_Os01g48446</i>	<i>OsNAC14</i>	49d나이식물
6	<i>LOC_Os03g08470</i>	<i>OsLG3</i>	21d나이식물
7	<i>LOC_Os11g34200</i>	<i>OsDRAP1</i>	14d나이식물
8	<i>LOC_Os09g35030</i>	<i>OsDREB1A</i>	영양성장단계
9	<i>LOC_Os09g35010</i>	<i>OsDREB1B</i>	영양성장단계
10	<i>LOC_Os01g73770</i>	<i>OsDREB1F</i>	14d나이식물
11	<i>LOC_Os02g45450</i>	<i>OsDREB1G</i>	성장기식물
12	<i>LOC_Os01g07120</i>	<i>OsDREB2A</i>	21d나이식물
13	<i>LOC_Os05g27930</i>	<i>OsDREB2B</i>	21d나이식물
14	<i>LOC_Os02g52780</i>	<i>OsbZIP23, OsABF2</i>	14d나이식물
15	<i>LOC_Os09g28310</i>	<i>OsbZIP72</i>	14d나이모
16	<i>LOC_Os01g66120</i>	<i>OsNAC6</i>	14d나이식물
17	<i>LOC_Os03g60080</i>	<i>SNAC1</i>	4일 단계
18	<i>LOC_Os03g57240</i>	<i>DST</i>	20d나이모
19	<i>LOC_Os01g62410</i>	<i>OsMYB3R-2</i>	14d나이식물
20	<i>LOC_Os11g03300</i>	<i>OsNAC10</i>	14d나이모
21	<i>LOC_Os09g36420</i>	<i>OsHSP50.2</i>	생식단계
22	<i>LOC_Os08g02490</i>	<i>OsAHL1</i>	초기이삭패기 단계
23	<i>LOC_Os01g58420</i>	<i>AP37</i>	영양증식 단계
24	<i>LOC_Os02g43790</i>	<i>AP59</i>	영양증식 단계
25	<i>LOC_Os12g39400</i>	<i>ZFP252</i>	4일 단계
26	<i>LOC_Os06g10350</i>	<i>OsMYB6</i>	모
27	<i>LOC_Os05g44180</i>	<i>OsFTL10</i>	모
28	<i>LOC_Os06g09390</i>	<i>OsERF71</i>	35d나이모
29	<i>LOC_Os05g41070</i>	<i>OsbZIP42</i>	싹트기 단계
30	<i>LOC_Os01g73900</i>	<i>OsRH58</i>	28d나이벼모
침수건달성			
31	<i>LOC_Os01g45860</i>	<i>SLR1</i>	모단계(14d)
32	<i>LOC_Os03g17700</i>	<i>OsMAPK2</i>	모단계(14d)
33	<i>SNORKEL1, SNORKEL2</i>	<i>ERFs</i>	10일 단계 식물과 6d단계 식물
34	<i>LOC_Os01g66100</i>	<i>SD1</i>	10일 단계
35	<i>LOC_Os11g30560</i>	<i>OsHSD1</i>	7일 단계
36	<i>LOC_Os01g17160</i>	<i>Sub1A</i>	모단계(10d)
추위건달성			
37	<i>LOC_Os01g50940</i>	<i>OsMYL1</i>	씨뿌린 후 17d
38	<i>LOC_Os01g50110</i>	<i>Osmyb4</i>	10d나이모
39	<i>LOC_Os10g41200</i>	<i>OsMYBS3</i>	10d나이모
40	<i>LOC_Os03g01320</i>	<i>qLTG3-1/ OsHyPRP5</i>	저온에서의 싹트기
41	<i>LOC_Os04g51180</i>	<i>COLD1</i>	14d나이모
42	<i>LOC_Os10g34840</i>	<i>qPSR10</i>	모단계에서 저온건달성

No.	유전자/접속명	유전자명	성장/실험단계
43	<i>LOC_Os09g24440</i>	<i>qCTS-9</i>	모단계에서 추위견딜성
44	<i>Ctb1</i>	<i>Ctb1</i>	뿌리내림단계에서 추위견딜성
45	<i>LOC_Os04g04330</i>	<i>CTB4a</i>	뿌리내림단계에서 추위견딜성
46	<i>LOC_Os02g40860</i>	<i>OsLTRPK1</i>	영양증식단계에서 추위견딜성
47	<i>LOC_Os07g39970</i>	<i>ZFP245</i>	4일단계에서 추위견딜성
48	<i>LOC_Os03g47610</i>	<i>OsTHIC</i>	일단계와 뿌리내림단계에서 추위견딜성
49	<i>LOC_Os06g41010</i>	<i>OsiSAP8</i>	8d나이모
50	<i>LOC_Os04g49510</i>	<i>OsCDPK7</i>	10d나이모
51	<i>LOC_Os02g33820</i>	<i>OsAsr1</i>	10d나이모
52	<i>LOC_Os06g03670</i>	<i>CBF1/DREB1b</i>	2주 및 2달식물
53	<i>LOC_Os04g33720</i>	<i>OSINV4</i>	뿌리내림단계
54	<i>LOC_Os11g08210</i>	<i>OsNAC5</i>	14d나이모
55	<i>LOC_Os01g07090</i>	<i>OsPP1</i>	14d나이모
56	<i>LOC_Os01g19130</i>	<i>OsPP2</i>	14d나이모
57	<i>LOC_Os03g2009</i>	<i>OsMYB2</i>	14d나이모
58	<i>LOC_Os01g01420</i>	<i>OsCOIN</i>	4일단계
59	<i>LOC_Os06g43660</i>	<i>OVP1</i>	15d나이모
60	<i>LOC_Os07g08840</i>	<i>OsTRX23</i>	7d나이모
61	<i>LOC_Os03g17690</i>	<i>OsAPXa</i>	7d나이모
62	<i>LOC_Os01g32660</i>	<i>OsMKK6</i>	7d나이모
63	<i>LOC_Os02g05480</i>	<i>OsMPK3</i>	7d나이모
64	<i>LOC_Os03g22810</i>	<i>SodCc1</i>	8d나이모
65	<i>LOC_Os03g46770</i>	<i>OsGRP3</i>	발생단계
고온견딜성			
66	<i>LOC_Os06g10230</i>	<i>OsER1</i>	모단계에서 열스트레스견딜성
67	<i>LOC_Os03g26970</i>	<i>OsTT1</i>	생식단계에서 열스트레스견딜성
68	<i>LOC_Os03g63530</i>	<i>OsDPB3-2</i>	영양 및 생식단계에서 열스트레스견딜성
69	<i>LOC_Os09g15430</i>	<i>OsHTAS</i>	모단계에서 열스트레스견딜성 응답
70	<i>LOC_Os03g38610</i>	<i>OsMADS87</i>	열스트레스때 종자크기의 부의 조절인자
71	<i>LOC_Os03g19020</i>	<i>OsHIRP1</i>	모단계(14d)
72	<i>LOC_Os08g44340</i>	<i>OsMDHAR4</i>	모단계(21d)
73	<i>LOC_Os01g18840</i>	<i>OsIFL</i>	모단계와 생식단계
74	<i>LOC_Os05g48010</i>	<i>OsPL/OsMYB55</i>	잎과 잎집
75	<i>LOC_Os05g44050</i>	<i>Rab7</i>	25d나이식물
76	<i>LOC_Os01g10840</i>	<i>OsGSK1</i>	8d나이식물
77	<i>LOC_Os01g43650</i>	<i>Oswrky11</i>	14d나이모
78	<i>LOC_Os09g20830</i>	<i>OsHSBP1</i>	21d나이모
79	<i>LOC_Os06g16270</i>	<i>OsHSBP2</i>	21d나이모
80	<i>LOC_Os09g24990</i>	<i>OsCAF1G</i>	21d나이모
81	<i>LOC_Os02g55300</i>	<i>OsCAF1H</i>	21d나이모
82	<i>LOC_Os01g04370</i>	<i>HSP16.9</i>	14d나이모
83	<i>LOC_Os05g25850</i>	<i>OsMSD</i>	벼의 알여물기
84	<i>LOC_Os05g45410</i>	<i>HSFA4d/Spl7</i>	성숙잎
85	<i>LOC_Os01g09550</i>	<i>SNAC3</i>	4일단계모
86	<i>LOC_Os02g52190</i>	<i>OsbHLH048</i>	벼의 생식조직
87	<i>LOC_Os09g35790</i>	<i>Hsfb2c</i>	벼의 생식조직

표계속

No.	유전자/접속명	유전자명	성장/실험단계
88	<i>LOC_Os01g42190</i>	<i>OsDjC10</i>	벼의 생식조직
89	<i>LOC_Os02g52150</i>	<i>OsHsp24</i>	벼의 생식조직
90	<i>LOC_Os03g14180</i>	<i>OsHSP26</i>	벼의 생식조직
91	<i>LOC_Os05g44340</i>	<i>OsHSP101, ClpB-cyt</i>	벼의 생식조직
92	<i>LOC_Os01g17214</i>	<i>OsZIFL2</i>	꽃피기단계
93	<i>LOC_Os09g36060</i>	<i>OsGH9B14</i>	꽃피기단계
94	<i>LOC_Os02g44108</i>	<i>OsEXPB11</i>	꽃피기단계
95	<i>LOC_Os01g59530</i>	<i>OsCaM61</i>	꽃피기단계
96	<i>LOC_Os03g21160</i>	<i>OsC3H23</i>	꽃피기단계
97	<i>LOC_Os01g55270</i>	SGS도메인을 가진 단백질	꽃피기단계
98	<i>LOC_Os01g27360</i>	<i>OsGSTF1</i>	꽃피기단계
99	<i>LOC_Os03g16460</i>	발현된 단백질	꽃피기단계
100	<i>LOC_Os02g40900</i>	RNA인식모티프를 가진 단백질	꽃피기단계

3) 야생형벼: 견딜성이 강한 형질과 관련된 유용한 유전자들의 보물고

야생형벼는 견딜성형질의 귀중하고 풍부한 저장고이다. 야생형벼에서 많은 생물학적스트레스견딜성 유전자들이 동정되었다. *O. officinalis*와 *O. nivara*, *O. glaberrima*는 비생물학적스트레스견딜성의 좋은 유전적원천이다.

*O. rufipogon*계놈에서 동정된 전사인자들은 K^+ 항상성을 양성으로 조절하여 벼의 염견딜성을 높여주었다. *O. rhizomatis*와 *O. eichingeri*는 *Sub1A*와는 독립적으로 침수견딜성을 나타내었으며 이것은 각이한 물림새가 있다는것을 보여주었다. 이와 유사하게 *O. rufipogon*에서 발견된 *CBF3/DREB1G*와 *COLD1*은 낮은 온도에 대한 견딜성을 보여주었다. *O. officinalis*에서 새벽꽃피기(early-morning flowering: EMF)자리가 동정되었는데 이것은 열에 의한 소수화불염성을 완화시키는데서 중요한 유전자이다. 야생형벼가 환경스트레스와 극단한 날씨에 가장 잘 적응되었다는것을 고려할 때 그것들은 불리한 환경에 잘 견디는 벼를 육종하는데서 새롭고 귀중한 재료로 된다. CRISPR기술에 의한 게놈편집은 야생형벼들에 있는 견딜성이 강한 특징들의 유전적기초를 이해하는데 도움을 줄뿐 아니라 그 기술을 리용하여 야생형벼로부터 후보유전자들을 도입하여 재배품종들을 개선할 수 있게 한다.

3. 벼에서 CRISPR/Cas게놈편집

벼계놈에는 아직 기후변화에 견딜성이 강한 벼를 육종하는데 리용할수 있는 미지의 유전자가 많이 남아있다. 배열특이적인 누클레아제(SSN)를 리용하여 여러 유전자들이 성공적으로 표적화되고 수식되었다. CRISPR/Cas9계는 아연손가락누클레아제(ZFN)와 전사활성화인자류사효과인자누클레아제(TALEN)에 비하여 그 정확성과 효율성, 원가측면에서 가장 유망한 기술이다.[8] CRISPR에 의한 게놈편집은 특이적이고 첫 세대에 호모변이체를 얻을 수 있으며 벼에서 변이체의 안정성빈도가 높다. 벼에서 CRISPR/Cas9기술로 게놈편집된 여러가지 유전자들의 실례를 표 2에 제시하였다.

표 2. 벼에서 CRISPR/Cas9기술로 게놈편집된 유전자들

No.	표적 유전자	유전자/접속명	표현형/특성
	벼제일바깥쪽세포특이적 유전자5(<i>ROC5</i>)	<i>Os02g0674800</i>	
1	엽록체기질가공펩티다제 유전자 (<i>SPP</i>), 어린모백색 유전자(<i>YSA</i>)	<i>Os06g0625400</i> <i>Os03g0597200</i>	초기단계에 흰잎
2	<i>OsSWEET11</i> , <i>OsSWEET14</i>	<i>Os11g0508600</i> <i>Os08g0535200</i>	흰잎마름병저항성
3	<i>OsMYB1</i>	<i>Os01g0226800</i>	표현형변화 없음.
4	<i>CAOI</i> , <i>LAZY1</i>	<i>Os10g0567400</i> <i>Os11g0490600</i> <i>Os03g0184000</i>	연꽃색잎(엽록소b의 불완전합성)과 강한 아지치기
5	<i>OsPDS</i> , <i>OsMPK2</i> , <i>OsBADH2</i> , <i>OsDEP1</i>	<i>Os08g0157000</i> <i>Os08g0424500</i> <i>Os09g0441900</i>	백색 및 키낮은표현형, <i>OsDEP1</i> -벼알 수확고와 꽃차례마디사이의 길이
6	<i>OsMPK2</i> , <i>OsMPK5</i>	<i>Os08g0157000</i> <i>Os03g0285800</i>	병저항성증대
7	<i>OsBEL</i>	<i>Os03g0760200</i>	벤타존저항성
8	<i>OsPDS</i> , <i>OsPMS3</i> , <i>OsEPSPS</i>	<i>Os03g0184000</i> <i>Os12g0545900</i> <i>Os06g0133900</i> <i>Os01g0881300</i>	백색표현형, <i>OsEPSPS</i> 가 파괴되면 치사적임.
9	<i>SWEET1a</i> , <i>SWEET1b</i> , <i>SWEET11</i> , <i>SWEET13</i>	<i>Os05g0426000</i> <i>Os08g0535200</i> <i>Os12g0476200</i>	흰잎마름병저항성
10	<i>CDKA1</i> , <i>CDKA2</i> , <i>CDKB1</i>	<i>Os03g0118400</i> <i>Os02g0123100</i> <i>Os01g0897000</i>	표현형변화 없음.
11	<i>ALS</i>	<i>Os02g0510200</i>	IMZ 견딜성
12	<i>CDKB2</i>	<i>Os08g0512600</i>	표현형변화 없음.
13	<i>OsAOX1a</i> , <i>OsAOX1b</i> , <i>OsAOX1c</i>	<i>Os04g0600200</i> <i>Os04g0600300</i> <i>Os02g0700400</i> <i>Os01g0197700</i>	표현형변화 없음.
14	<i>Gn1a</i> , <i>DEP1</i> , <i>GS3</i> , <i>IPA1</i>	<i>Os09g0441900</i> <i>Os03g0407400</i> <i>Os08g0509600</i>	수확고증수
15	<i>OsERF922</i> (에틸렌 응답 인자전사인자)	<i>Os01g0752500</i>	벼열병저항성 및 염건딜성
16	<i>OsNramp5</i>	<i>Os07g0257200</i>	수확고에는 변화가 없이 카드미움축적이 감소
17	<i>SEC3A</i>	<i>Os03g0625700</i>	벼열병저항성
18	<i>eIF4G</i>	<i>Os07g0555200</i>	벼RTSV저항성
19	<i>OsAPL2</i>	<i>Os01g0633100</i>	농마생합성에 영향을 줌.
20	<i>Waxy</i>	<i>Os06g0133000</i>	다른 농업형질에는 영향이 없는 찰벼
21	<i>OsBBS1</i>	<i>Os03g0364400</i>	초기일로화와 염스트레스
22	<i>OsAnn3</i>	<i>Os05g0382600</i>	추위견딜성
23	<i>NRT1.1B</i>	<i>Os10g0554200</i>	질산염수송체
	<i>OsCYP71A1(OsT5H)</i>		밤색광충과벼대벌레에 대한 저항성
	<i>OsSPDT</i>	<i>Os06g0143700</i>	벼알에로의 린축적감소

표제 속			
No.	표적 유전자	접속번호	표현형/특성
23	<i>Pyl1/4/6</i>	<i>Os10g0573400</i>	벼의 수확고증수
		<i>Os1g0827800</i>	
		<i>Os3g0297600</i>	
24	<i>OsTGW6</i>	<i>Os06g0623700</i>	천알질량증가
	<i>OsEPFL9</i>	<i>Os01g0914400</i>	잎에서 엽록체기질밀도

1) 벼에서 게놈편집용CRISPR/Cas9도구의 발전

CRISPR/Cas9계는 두가지 부류로 나눈다. 1부류는 여러아단위효과인자복합체로 되어있으며 2부류는 SpCas9와 같은 1개의 여러도메인단백질로 되어있는데 이것이 게놈편집에 가장 보편적으로 리용되고있다. SpCas9의 HNH류사누클레아제도메인이 안내RNA배렬에 상보적인 DNA사슬(표적사슬)을 절단하며 RuvC류사누클레아제도메인은 비표적사슬을 절단한다. 2013년에 처음으로 벼에서 CRISPR/Cas9를 리용하여 벼의 제1 바깥쪽세포특이적유전자5(*ROC5*)와 엽록체기질가공펩티다제(*SPP*), 어린모백색화(*YSA*)유전자들이 표적특이적으로 편집되었다. 계속하여 벼원형질체에서 2개 유전자들의 프로모터영역이 성공적으로 변이되고 부위특이적인 편집을 DNA배렬결정으로 확인하였으며 *OsPDS*(피토크노이드합성효소) 유전자가 파괴되어 키가 작고 백색화된 벼가 만들어졌다. 또한 목적하는 단편의 양쪽말단을 표적으로 하는 2개의 sgRNA를 가진 구조물을 리용하여 큰 염색체단편이 결실된 전이 유전자가 없는 벼가 만들어졌다. 2015년에는 내부의 tRNA가공계를 리용하여 다중게놈편집을 실현할수 있는 CRISPR/Cas9계가 개발되었다.[8] 그리고 표적외효과를 리용하여 CDPK족의 여러 유전자들을 편집하였다. 벼에서 효율적인 HDR에 의한 유전자표적화계를 확립하기 위하여 먼저 CRISPR/Cas계를 리용하여 DNA리가제4유전자를 파괴하고 다음 *Agrobacterium*에 의한 형질전환법으로 sgRNA와 HDR주형이 도입되었다. 결과 *ALS*유전자가 높은 빈도로 편집된 2중대립변이식물체가 만들어졌다. 변이유도률은 Cas9와 sgRNA의 발현수준과 비례관계에 있었다. T-DNA가 멘델분리되면서 T1대에 전이유전자가 없는 변이체가 생기며 적당한 호모변이체를 선발하면 표적외효과를 크게 줄일수 있고 그후의 세대에 변이체의 안정성을 높일수 있었다.

CRISPR표적의 확대 PAM은 Cas9 RGEN이 사이배렬에 결합하여 기능을 수행하게 한다. 그러나 이것으로 하여 때때로 특히 작은 유전자나 AT가 풍부한 유전자의 경우에 사이배렬을 선정하기 힘들다. 그리하여 완화된 NG PAM을 인식하는 SpCas9변종(SpCas9-NG)이 만들어졌다.[9] 한편 2부류에 속하는 CRISPR/Cpf1(일명 Cas12a)이 개발되어 게놈편집의 폭이 더 확장되고 그것이 사람과 벼에서 효율적으로 게놈을 편집한다는것이 증명되었다. CRISPR/Cpf1계에서는 tracrRNA가 필요없다. 그러므로 Cpf1은 오직 42nt crRNA만을 요구하지만 Cas9는 약 100nt sgRNA를 리용한다. Cpf1-crRNA복합체는 PAM으로서 T가 풍부한 짧은 TTTV(V=A, C, G)를 요구한다. Cas9와는 달리 Cpf1은 5'쪽에 4~5개의 뉴클레오티드가 돌출된 DSB를 도입한다. *S. aureus*에서 분리된 SaCas9는 SpCas9보다 크기가 약 25% 작고 NNGRRT PAM을 인식하며 길이가 각이한 gRNA로 표적DNA를 높은 효율로 절단한다. 지금까지 PAM요구성이 서로 다른 20가지이상의 Cas9 RGN들이 개발되었지만 식물에서 검출된것은 얼마 되지 않는다. 일부 RGN은 재가공되어 PAM특이성이 더 넓어졌다. 실제로 2018년에는 NG와 GAA, GAT를 비롯한 폭넓은 PAM배렬을 인식하는 SpCas9변종인 xCas9가 파취도염색진화법으로 개발되었다.[10] 그러나 정기적인 NGG PAM에 대한 특이성은 사람 모형에서와는 대조적으로 벼에서 크게 감소되었다.[11] 2019년에는 표적부위에서 돌출된 구

조를 가진 DSB를 도입하는 또 다른 CRISPR도구로서 CasX(Cas12e)가 개발되었다. 또한 2020년에는 Cas12b가 여러개의 유전자들을 동시에 편집할수 있으며 표적외효과가 거의 없는것으로 하여 Cas9나 Cas12a(Cpf1)보다 더 유용하다는것이 발표되었다.[12]

염기편집: 게놈과 트랜스크립토에 대한 정밀화학 오늘날 우리는 DNA와 RNA에서 1개의 염기를 외과적으로 변화시켜 유전자를 고정할수도 있다. CRISPR/Cas9에 기초한 염기편집기술로는 DSB나 내줄체주형이 없이도 표적부위에서 한 염기쌍을 다른 염기쌍으로 직접 그리고 비가역적으로 전환시킬수 있다. 염기편집도구는 촉매적으로 불활성인 Cas9에 시토신 탈아미나제효소와 일부 경우에는 DNA글리코실라제저해인자를 융합시킨것이다. 탈아미나제효소는 표적시토신의 고리밖에 있는 아민을 제거하여 우라실로 만든다.(C→U) 처음 2016년에 촉매적으로 불활성인 Cas9(dCas9)에 APOBEC1시티딘탈아미나제(CD)가 융합된 염기편집도구1(BE1)이 만들어졌다. dCas9가 결합되면 국부적으로 변성되어 한오리사슬 DNA(ssDNA)를 가진 거품이 생긴다. ssDNA특이적인 CD가 약 5개 뉴클레오티드의 배열내에 있는 시티딘을 우리딘으로 직접 전환시킨다. 그후 이 염기편집도구를 더 개선하여 우라실글리코실라제저해인자(UGI)를 부가하여 우라실이 제거되지 않게 하고 비편집사슬을 표적으로 하는 Cas9니카제(nCas9)를 방해하여 세포내 DNA수복응답이 일어나게 하였다. 이로 하여 삽입/결실이 최소로 생기면서(표준적으로 $\leq 1\%$) 목적하는 염기편집이 더 잘 진행되게 하였다. 염기편집은 비슷한 방식으로 벼에서도 성공적으로 진행되었다. 또 다른 형태의 시토신탈아미나제인 사람AID(hAID)의 변체를 리용한 염기편집도구를 리용하였을 때 벼에서 게놈편집효율이 더 높아지고 기능획득 및 기능소실변이체가 만들어졌다. RNA염기편집도구에서도 방법은 비슷하지만 RNA를 표적으로 하는 성분을 리용한다.[13]

시토신은 자연적으로 탈아미노화되는데 결과 C·G염기쌍이 T·A염기쌍으로 전환되지만 T·A가 C·G로 전환되는 일은 보통 없다. 흥미있는것은 아데닌이 탈아미노화되면 이노신으로 되고 그것이 폴리메라제에 의하여 구아닌으로 처리되는것이다. 아데닌염기편집도구(ABE)는 새로운 종류의 염기편집도구로서 게놈DNA에서 A·T를 G·C로 전환시킨다. 촉매적으로 활성이 없는 Cas9변이체(dCas9)에 tRNA아데노신탈아미나제를 융합시킨 게놈편집도구는 DNA에 작용하여 표적특이적으로 A·T염기쌍을 G·C로 전환시켰다. 도구에 ABE를 부가하면 게놈DNA에서 4가지의 모든 전환(C→T, A→G, T→C, G→A)이 가능하다. 염기편집은 매우 위력한 분자유종도구의 하나로서 그것을 리용하면 벼와 같은 알곡작물에서 인공적인 유전자원의 다양성을 보장할수 있다.

2) 비생물학스트레스견딜성을 높이기 위한 CRISPR게놈편집

CRISPR/Cas9기술로 만든 HSA1(높은온도스트레스감수성백색화1)결실변이체는 야생형 대립변이체보다 고온감수성이 더 높았다. 초기일로화와 염스트레스감수성에서 벼유전자 *OsBBS1*이 노는 역할이 같은 방식으로 증명되었다. *OsAnn3*이 파괴되면 벼가 추위감수성으로 되었다. 게놈편집기술에 의하여 *OsMIR528*이 염스트레스의 양성조절인자라는것이 밝혀졌다. *OsRAV2*의 염유도에서 GT-1요소가 노는 조절기능이 표적특이적인 변이에 의하여 증명되었다. *OsNramp5*를 게놈편집하였을 때 벼의 수확고에 영향을 미치지 않으면서 카드뮴이 적게 축적되었다. CRISPR/Cas9기술로 기능결실변이체를 만들어 벼의 두 *SnRK2*들인 삼투압스트레스/ABA활성화단백질키나제 *SAPK1*과 *SAPK2*가 염견딜성에 주는 역할을 밝혔다. 유전자들의 기능을 연구하기 위하여 CRISPR/Cas9계를 리용하여 대규모변이체서고가 작성되었다. 총체적으로 CRISPR계를 리용한 게놈편집은 벼연구와 농업에 커다란 리익을 가져다줄것이다.

4. 제기되는 문제들

1) 표적외효과

CRISPR기술에서 가장 심각한 문제의 하나는 조작한 생물에서 표적으로 하지 않은 유전자가 우연히 변이되어 생태계에 원하지 않는 생물학적효과를 미치게 될 위험성이다. 임의로 일어난 변이에 의하여 병감수성유전자와 같은 일부 원하지 않은 유전자들이 활성화될 수 있다. 게놈편집에 의하여 또한 염색체단편이 전이되고 게놈이 불안정해질 수도 있다. sgRNA설계를 최적화하여 Cas9의 표적외위험성을 줄이기 위하여 여러가지 방법들이 개발되었다. sgRNA의 길이를 짧게 하였을 때 표적에 대한 게놈편집효율에 영향을 주지 않으면서도 일부 표적외부위들에서 표적외효과가 줄어들었다. PAM배열이 보다 긴 *Streptococcus thermophiles* Cas9에서 표적외활성이 적게 나타났다. nmeCas9계는 비록 SpCas9보다 효율이 낮지만 정밀게놈편집을 실현할 수 있는 보다 안전한 도구로 된다. 서로 다른 DNA사슬에 2개의 한오리사슬절단(SSB)이나 니크를 도입하는 쌍을 이룬 Cas9니카제(ncas9)를 리용하면 표적외활성이 없고 고도로 특이적이며 효율적이었다. gRNA의 길이와 Cas9효소의 생체 내 농도도 최적화하면 표적외활성을 최소화할 수 있다. 표적외변이체는 전게놈배열결정으로 선발할 수 있다. GUIDE-Seq기술을 리용하면 Cas9 RGEN에 의하여 생긴 DSB를 전게놈수준에서 공정하게 동정할 수 있다. 바라지 않은 재배열도 LAM-HTGTS법과 Digenome-seq법으로 감시할 수 있다. 식물인 경우 CRISPR발현카세트가 없는 변이체를 야생형과 섞임하여 유전적으로 거의 동일한 계통을 얻을 수 있다. 다른 많은 기술들과 마찬가지로 CRISPR기술은 훨씬 더 빠른 속도로 가까운 앞날에 완벽해질 것이다.

2) 형질전환효율

식물게놈편집의 또 다른 중요한 애로는 형질전환의 효율과 속도이다. 비록 벼에서 *Agrobacterium*에 의한 형질전환효율이 상당히 높아졌지만 특히 Cas9와 sgRNA발현카세트를 가진 식물발현운반체의 크기가 큰것으로 하여 여전히 문제로 제기되고 있다. CRISPR/Cas계를 리용한 원형질체게놈편집이 유전자의 기능을 평가하고 각이한 CRISPR기술의 특성을 연구하는데서 보다 빠른 방도로 되고 있다. 그러나 기능이 밝혀지지 않은 유전자들을 고속대량적으로 검사하고 훌륭한 벼품종들을 만들어내자면 앞으로 이 기술을 더 발전시켜야 한다.

2020년에는 종전의 *Agrobacterium*에 의존한 방법에서 완전히 벗어나 분열조직을 새로 유도하는 방식으로 더우기 무균조작이 아니라도 몇주일동안에 새로운 게놈편집개체를 선발하는 방법이 개발되고 그것이 포도와 담배, 감자, 도마도에서 증명되었지만 아직 벼에는 그것을 도입할 수 없다.[14]

5. 전망

지난 30년간 분자유전종에서는 두가지 주요문제가 애로로 제기되었다. 우선 형질전환과정에 선발표식자유전자를 리용하면서 문제가 제기되었다. 전이유전자의 형질전환효율은 비교적 낮으므로 연구자들은 선발표식자유전자를 리용하여 형질전환되지 않은 세포와 형질전환세포를 구분하였다. 그런데 선발표식자유전자들은 대부분 항생물질이나 살초제에 대한 저항성유전자들이며 따라서 환경과 사람들의 건강과 관련하여 많은 문제가 제기되었다. 이 문제를 극복하기 위하여 여러가지 방법들이 제기되었지만 유전자전이식물에 대한 인식에서는 여전히 변화가 없다. 두번째 문제는 형질전환방법론과 관련된것으로서 전이유전자가 계

놈의 임의의 부위에 무질서하게 삽입되는것이다. 그러면 잠정적으로 그 부위에 있던 유전자가 파괴되면서 바라지 않은 표현형이 나타날수 있다. 혹은 전이유전자가 여러개 또는 부분적으로 삽입되면서 유전자발현이 침묵될수 있는것이다. 그러나 게놈편집을 리용하면 식물분자육종에서 우의 모든 문제들을 극복할수 있을뿐만아니라 4가지 목적에 응용할수 있다. 우선 CRISPR기술을 리용하여 유전자를 파괴할수 있다는것이다. 최근에 다음세대게놈배열결정자료들이 폭발적으로 늘어나고 컴퓨터능력이 훨씬 높아지면서 새로운 유전자들과 유전자네트워크들이 계속 동정되고 예측되므로 생물학자들에게는 이 유전자기능을 생체내에서 평가하는것이 큰 도전으로 되고있다. CRISPR기술을 리용하여 유전자들을 파괴하면 가장 빠른 방식으로 유전자들의 기능을 평가하여 식물의 비생물학적스트레스견딜성에 큰 영향을 주는 유전자들을 동정할수 있을것이다. CRISPR기술의 두번째 응용분야는 HDR에 의하여 농업형질상 중요한 유전자들이 변이되거나 열화된것을 보다 우수한 대립변이로 수복하거나 치환할수 있다는것이다. 이 기술을 리용하여 점변이나 수식된 배열을 가진 효과적인 유전자를 표적특이적으로 삽입해넣거나 파괴할수 있다. 뿐만아니라 목적하는 부위에 제한효소인식부위를 넣어주거나 유전자에 작은 꼬리표를 달아줄수도 있다. CRISPR기술을 리용하면 또한 프 로모터를 영구적으로 치환하거나 dCas9효소에 강화배열을 부가하여 표적유전자의 발현을 재 프로그램화할수 있다. 세번째 응용분야는 전이유전자를 숙주게놈의 목적하는 부위에 정확히 삽입해넣을수 있다는것이다. 전이유전자를 목적하는 부위에 정확히 삽입해넣으면 다른 유전자를 파괴하지 않고 안정하게 발현시킬수 있다. 네번째 응용분야는 염기편집기술을 리용하여 벼재배품종의 유전적다양성을 인공적으로 만들어낼수 있다는것이다. 뿐만아니라 CRISPR 기술을 리용하여 에피게놈을 조정하고 게놈을 식물 그대로 화상화하여 볼수 있다.

CRISPR기술을 리용하는데서 아직 위험성도 없지 않으므로 그에 대한 연구를 보다 심화시켜야 한다.

참 고 문 헌

- [1] D. Pandey; Int. Rice Res. Notes, **32**, 203, 2009. <https://doi.org/10.3860/irrn.v32i1.1078>.
- [2] C. Zhao et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., **114**, 9326, 2017.
- [3] M. Jinek et al.; Science, **337**, 816, 2012.
- [4] W. Jiang et al.; Nucleic Acids Res., **41**, e188, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>.
- [5] Q. Shan et al.; Nature Biotechnol., **31**, 686, 2013.
- [6] H. Liu et al.; Mol. Plant, **10**, 530, 2017.
- [7] Z. Zhong et al.; Mol. Plant, **11**, 999, 2018.
- [8] M. Wang et al.; J. Integr. Plant Biol., **60**, 626, 2018.
- [9] H. Nishimasu et al.; Science, **361**, 1259, 2018.
- [10] N. Sun et al.; Nature, **556**, 57, 2018.
- [11] T. Sun et al.; Plant Biotechnol. J., **16**, 1, 2018.
- [12] J. J. Liu et al.; Nature, **566**, 218, 2019.
- [13] D. B. T. Cox et al.; Science, **1027**, 1019, 2017.
- [14] M. F. Maher et al.; Nature Biotechnol., **38**, 84, 2020.

The Development of Climate Smart Rice by CRISPR Technology

Ho Myong Sik, Kim Sun Ui

One of the most desirable applications of CRISPR/Cas technology would be to develop climate smart rice crop to sustain and enhance its productivity in the changing environment. We analyze the desirable phenotypes and responsible genetic factors, which can be utilized to developing tolerance against major abiotic stresses imposed by climate change through genome engineering. The possibility of utilizing the information from wild resources to engineering the corresponding alleles of cultivated rice has been presented. We have also shed light on available resources for generating genome edited rice lines. The CRISPR/Cas mediated genome editing strategies for engineering of novel genes have been proposed to create a plant phenotype, which can face the adversities of climate change. Further, challenges of off-targets and undesirable phenotype have been discussed.

Keywords: genome engineering, climate change, tolerance