

TEKNOLOGI GENOM EDITING CRISPR/Cas9 UNTUK PERBAIKAN TANAMAN PADI

Tri J. Santoso

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber
Daya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

PENDAHULUAN

Pada beberapa dekade terakhir, pendekatan pemuliaan konvensional, mutasi, dan molekuler telah berkontribusi besar untuk meningkatkan produktivitas padi. Namun demikian, hasil padi secara gradual menurun pada dekade terakhir ini. Hal ini karena adanya perubahan iklim global yang ekstrem, munculnya serangga hama dan patogen, dan masalah lingkungan lainnya. Oleh karena itu, sangatlah mendesak di dalam program pemuliaan padi untuk mempunyai teknologi modern yang dapat mengembangkan varietas padi baru dengan potensi hasil yang lebih tinggi, lebih toleran terhadap cekaman abiotik, dan lebih tahan terhadap serangga dan penyakit utama.

Perkembangan bioteknologi telah berperan menjadi mitra bagi pemuliaan klasik untuk dapat merakit tanaman dengan keunggulan yang lebih baik. Pemuliaan berbasis marka molekuler atau lebih sering disebut dengan *marker assisted selection* merupakan salah satu contoh keberhasilan bioteknologi untuk mendukung

perbaikan tanaman pertanian. Di bidang rekayasa genetika, produk tanaman dengan sifat-sifat baru juga sudah banyak dirakit, sebagai contohnya adalah jagung Bt11 dari Monsanto yang tahan hama penggerek batang menggunakan gen ketahanan dari bakteri *Bacillus thuringiensis* (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/cropstlist/default.asp>).

Pemuliaan konvensional mendasarkan pada variasi genetik alami yang ada dan diperlukan program silang balik yang ekstensif untuk menambahkan karakter yang diinginkan ke tanaman elit. Akan tetapi, ketersediaan alel-alel yang menguntungkan atau adanya variasi genetik di alam terbatas untuk dapat dimanfaatkan menggunakan pendekatan ini (Manshardt 2004). Sementara itu, pemuliaan melalui mutagenesis acak (mutasi fisik, kimia atau biologi) dapat menghasilkan mutasi banyak sifat dan perubahan yang tidak diinginkan. Pemuliaan mutasi ini juga harus diikuti dengan skrining populasi yang sangat besar dan banyak memakan waktu untuk mengidentifikasi mutan dengan karakter-karakter yang diinginkan (McCallum *et al.* 2000). Pemuliaan mutasi biasanya mempunyai frekuensi yang sangat rendah (0,1 % dari mutasi total). Sementara itu, pemuliaan menggunakan bantuan marka seringkali sangat mahal dan keterpautan marka dengan sifat yang diinginkan terkadang sangat sulit, dan menyita waktu. Rekayasa genetik tanaman akan menghasilkan produk yang memerlukan proses regulasi yang kompleks dan persyaratan yang memakan waktu dan analisis keamanan yang mahal (Lusser *et al.* 2012).

Penemuan teknologi pengeditan genom telah membuka peluang untuk perbaikan atau modifikasi tanaman yang lebih efisien dan presisi. Pengeditan genom lebih terarah menggunakan *nuclease* artifisial yang memiliki potensi untuk mempercepat penelitian dasar dan pemuliaan tanaman melalui modifikasi genom secara tepat dan terprediksi (Bortesi & Fisher 2015). Pengeditan genom pada situs spesifik juga memungkinkan melakukan

penelitian di bidang *reverse genetic*, rekayasa genom dan integrasi transgen terarah (*targeted transgene integration*) dengan cara yang lebih efisien dan presisi. Teknologi ini melibatkan introduksi potongan DNA utas ganda terarah (*DNA double-strand breaks*, DSBs) menggunakan *nuclease* yang sudah direkayasa untuk menstimulasi mekanisme reparasi DNA secara seluler (Bortesi & Fisher 2015; Abdallah *et al.* 2015).

Teknologi CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) adalah teknologi terobosan terbaru untuk pengeditan genom. CRISPR pertama kali diidentifikasi pada genom *Escherichia coli* pada tahun 1987 (Ishino *et al.* 1987). Teknik pengeditan genom yang banyak digunakan sebelumnya adalah *zinc finger nuclease* (ZFNs; Kim *et al.* 1996) dan *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs, Christian *et al.* 2010). Keduanya merupakan protein fusi artifisial yang terdiri atas sebuah domain pengikatan DNA yang dimodifikasi difusikan dengan domain enzim restriksi *nuclease* nonspesifik *FokI*, dan fusi tersebut telah berhasil digunakan pada banyak organisme termasuk tanaman (Jankele & Svoboda 2014; Palpant and Dudzinski 2013). Di antara teknik pengeditan genom, teknik CRISPR/Cas9 merupakan sistem modifikasi genom terarah yang paling banyak dikembangkan dikarenakan sistem ini lebih efisien, tidak mahal, mudah, dan tidak kompleks (Abdallah *et al.* 2015; Mishra & Zhao 2018).

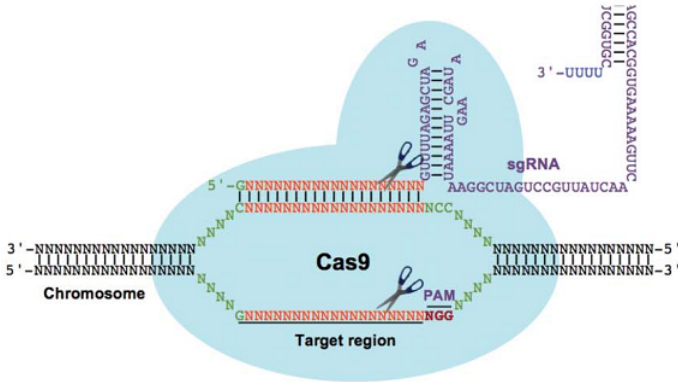
Tujuan penulisan makalah ini adalah untuk mempelajari peluang dan kemungkinan aplikasi teknologi pengeditan gen/genom untuk perbaikan tanaman dalam rangka menghasilkan varietas tanaman padi baru yang lebih unggul.

PENGENALAN TEKNOLOGI GENOM EDITING

Asal muasal CRISPRs diketahui sebagai elemen-elemen genetik yang memberikan imunitas kepada bakteri untuk melindungi

diri dari serangan virus. Mekanisme proteksi bakteri tersebut meliputi 3 tahap utama yaitu adaptasi, transkripsi dan interferensi (Abdallah *et al.* 2015). Tahap adaptasi adalah ketika DNA asing masuk ke sel bakteri, sebuah fragmen pendek disisipkan pada lokus CRISPR. Tahap transkripsi, lokus CRISPR yang meliputi *spacer*, ditranskripsikan selama proses melawan DNA invasif dan diproses menjadi RNA-RNA CRISPR kecil (CRISPR RNA atau crRNA) dengan panjang sekitar 40 basa, serta digabungkan dengan *trans-activating* CRISPR RNA (tracrRNA) untuk mengaktifasi dan menuntun *nuclease Cas9* (Barrangou *et al.* 2007). Gen Cas (CRISPR associated) terletak dekat dengan kaset CRISPR yang mengekspresikan protein dan mempunyai aktivitas helicase dan nuclease (Haft *et al.* 2005) (Gambar 3.10).

Tahap yang terakhir, yaitu interferensi meliputi terbentuknya kompleks antara tracrRNA-crRNA-Cas9 pada ujung 3' dari struktur dupleks tracrRNA-crRNA dan berikatan dengan protein Cas. Kompleks ini akan memotong sekuen DNA utas ganda



Sumber: Abdallah *et al.* (2015)

Gambar 3.10. Pemotongan DNA yang dituntun RNA dengan Cas9. Elemen CRISPR terdiri dari sebuah kompleks RNA non-coding (sgRNA) dan protein Cas9 (CRISPR associated) yang mempunyai aktivitas nuclease. Protein Cas9 akan memotong DNA yang mempunyai sebuah motif konservat

homolog yang dikenal sebagai *protospacer* pada DNA asing. Sebuah prasyarat untuk proses pemotongan adalah adanya sebuah motif konservatif yang berdekatan dengan *protospacer* (*protospacer-adjacent motif*, PAM) di ujung *downstream* DNA target, yang biasanya mempunyai sekuen 5'-NGG-3' atau 5'-NAG-3' (sekuen ini sangat jarang). Elemen CRISPR terdiri dari sebuah kompleks RNA *noncoding* dan protein Cas (CRISPR associated) yang mempunyai aktivitas nuclease. Pengenalan oleh sistem CRISPR/Cas dilakukan melalui interaksi komplementer antara RNA *noncoding* dan DNA target.

Sistem CRISPR yang sekarang paling banyak digunakan untuk pengeditan genom/gen adalah CRISPR/Cas9 (*CRISPR-associated*) tipe II dari *Streptococcus pyogenes* (Jinek *et al.* 2012). Sistem ini mendasarkan pada *nuclease* artifisial yang dikombinasikan dengan RNA penuntun (*RNA-guided*) dan teknologi ini sangat menjanjikan karena kesederhanaan, efisiensi dan dapat digunakan dalam banyak fungsi (*versatility*).

Pengeditan genom dengan sistem CRISPR/Cas9 dapat dilakukan dengan cara yang berbeda tergantung pada jalur reparasi (*repair pathway*) dan ketersediaan dari cetakan untuk reparasi (Bortesi & Fisher 2015). Sistem CRISPR/Cas9 dapat membentuk potongan utas ganda (*double-stranded breaks*, DSBs) pada daerah target DNA yang selanjutnya akan direparasi oleh mekanisme reparasi alami dari sel itu sendiri. Terdapat dua jalur reparasi DSB yang telah diketahui yaitu *non-homologous end joining* (NHEJ) dan *homologous recombination* (HR). Jalur NHEJ pada dasarnya sangat mudah mengalami kesalahan sehingga menyebabkan insersi atau delesi (indel) acak yang dapat menghasilkan mutasi *frameshift* apabila terjadi pada daerah pengkode dari sebuah gen dan menghasilkan sebuah gen yang *knockout* (Bortesi & Fisher 2015; Mishra & Zhao 2018). Selain itu ketika DSB menghasilkan ujung *overhang*, NHEJ dapat membantu mengintroduksi target DNA utas ganda dengan ujung yang kompatibel. Apabila target

mempunyai daerah homologi dengan sekuen di sekitar DSB, DNA yang rusak dapat direparasi dengan HR dan mekanisme ini dapat dimanfaatkan untuk memperoleh modifikasi atau penyisipan gen yang presisi. Meskipun potongan yang dihasilkan pada kedua utas DNA menginduksi rekombinasi pada lokus genomik spesifik, sejauh ini NHEJ merupakan mekanisme reparasi DSB yang paling umum terdapat pada banyak organisme, termasuk tanaman tingkat tinggi, dan frekuensi integrasi target oleh HR masih jauh lebih rendah dibandingkan dengan integrasi acak (Puchta 2005).

Secara umum, sistem pengeditan genom CRISPR/Cas9 mempunyai kelebihan dibandingkan dengan teknik pengeditan genom sebelumnya, yaitu *Zinc Finger Nucleases* (ZFNs), *Transcriptional activator-like effector nucleases* (TALENs), di antaranya adalah:

1. Sistem CRISPR/Cas9 terdiri dari sebuah protein monomerik tunggal (Cas9) dan sebuah RNA kimerik non fungsional (sgRNA). Spesifisitas target terletak pada sekuen 20 nukleotida gRNA dan pemotongan dilakukan oleh protein Cas9. Desain ZFNs lebih sulit karena sifatnya yang kompleks berupa interaksi antara *zinc finger* dan DNA dan keterbatasan lainnya disebabkan oleh spesifisitas yang sangat tergantung pada konteks situs spesifik atau gen yang akan diedit. TALENs lebih mudah untuk didesain karena ada aturan pengenalan satu per satu antara pengulangan protein dan sekuen nukleotida, dan konstruksinya telah dibuat lebih sederhana dengan teknik perakitan DNA yang efisien. Namun demikian, TALENs mendasarkan pada sekuen pengulangan yang tinggi sehingga dapat memicu rekombinasi homolog secara *in vivo*. Sementara itu, pemotongan pada sistem gRNA-CRISPR mendasarkan pada perpasangan basa Watson-Crick yang sederhana dengan sekuen target DNA, sehingga rekayasa protein untuk masing-masing target tidak diperlukan,

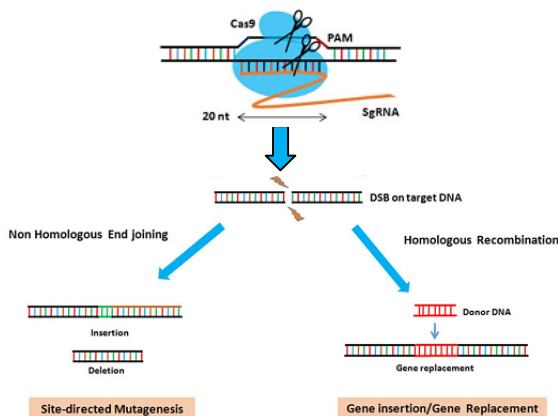
dan hanya 20 nukleotida pada gRNA yang perlu dimodifikasi untuk mengenali target yang berbeda. ZFNs dan TALENs berfungsi sebagai dimers dan hanya komponen-komponen protein yang diperlukan. Spesifisitas sekuen target terletak pada domain pengikatan DNA dari masing-masing polipeptida dan pemotongan dilakukan oleh domain nuclease *FokI*.

2. Pada sistem CRISPR/Cas9, enzim *Cas9* mempunyai dua domain pemotongan RuvC dan NHN (Gambar 3.11), yang memotong 3 nukleotida DNA target di ujung PAM yang menghasilkan ujung tumpul, namun kadang-kadang juga menghasilkan ujung *overhang* dengan panjang 1–2 nukleotida. Ujung *overhang* tersebut bermanfaat untuk insersi molekul DNA secara presisi dengan ujung yang kompatibel dengan bantuan enzim ligase melalui NHEJ. Sistem ZFNs dan TALENs keduanya membawa domain katalitik endonuklease restriksi *FokI* yang menghasilkan DSB dengan ujung kohesif dengan panjang bervariasi tergantung pada *linker* dan *spacer*.
3. Sistem CRISPR/Cas9 dari *S. pyogenes* hanya memerlukan adanya motif PAM NGG (atau NAG) pada *downstream* sekuen target. Akan tetapi, perpasangan sekuen *spacer* yang tidak tepat dapat menghasilkan pemotongan pada posisi *off-target*, yang berarti bahwa sekuen gRNA harus dipilih secara hati-hati untuk menghindari artifak-artifak yang demikian sehingga mengurangi jumlah target yang dapat digunakan secara praktis. ZFNs secara teori dapat diarahkan ke semua sekuen pada genom tetapi pada prakteknya pemilihan target dibatasi oleh ketersediaan modul berdasarkan platform rakitan yang tergantung pada tujuannya. Sebuah pasangan ZFN fungsional dapat dipreparasi untuk setiap rata-rata ~100 bp sekuen DNA menggunakan pustaka yang tersedia secara umum. Sementara target TALENs dibatasi oleh harus adanya residu timidin pada posisi pertama. Tidak semua TALENs

bekerja secara efisien sehingga terkadang gagal untuk menghasilkan mutasi yang diharapkan dan ini berarti bahwa setiap pasangan TALEN harus tervalidasi secara eksperimental.

APLIKASI SISTEM GENOM EDITING CRISPR/CAS9 PADA TANAMAN PADI

Studi awal yang mendemonstrasikan aplikasi pengeditan genom pada tanaman telah dilaporkan pada spesies tanaman model *Arabidopsis thaliana* dan *Nicotiana benthamiana* (Feng *et al.* 2013; Li *et al.* 2013; Nekrasov *et al.* 2013). Setelah itu, laporan tentang aplikasi pengeditan genom pada tanaman budi daya mulai bermunculan, seperti pada padi (Jiang *et al.* 2013; Shan *et al.* 2013; Xu *et al.* 2014; Santoso *et al.* 2015; Wang *et al.* 2016), gandum (Shan *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014), jagung (Char *et al.* 2016), kentang (Butler *et al.* 2015), tomat (Pan *et al.* 2016) dan jeruk manis (Jia & Wang. 2014). Pada beberapa tahun terakhir, CRISPR/



(Modifikasi dari Mishra and Zhao, 2018).

Gambar 3.11. Sistem CRISPR/Cas9 menghasilkan DSBs dan jalur reparasi DSB nonhomologous end joining (NHEJ) dan homologous recombination (HR)

Cas9 telah digunakan untuk mengembangkan varietas padi dengan sifat unggul, yang meliputi ketahanan penyakit dan toleran terhadap cekaman abiotik, perbaikan nutrisi dan peningkatan produktivitas (Tabel 3.5).

Tabel 3.5. Daftar gen target pengeditan genom CRISPR/Cas9 untuk perbaikan genetik tanaman padi.

Aspek aplikasi	Gen target	Fungsi molekuler	Referensi
Perbaikan hasil dan kualitas	GW2, GW5 dan TGW6	Peningkatan berat biji	Xu <i>et al.</i> 2016
	Hd2, Hd4 dan Hd5	Berbunga awal	Li <i>et al.</i> 2017
	CSA	Galur mandul jantan dikontrol fotoperiod	Li M <i>et al.</i> 2016
	Gn1a, DEPI, GS3, IPA1, Sd-1	Perbaikan jumlah biji, arsitektur malai, ukuran biji, dan arsitektur tanaman	Li M <i>et al.</i> 2016; Santoso <i>et al.</i> 2016
	CCD7	Peningkatan jumlah anakan	Miao <i>et al.</i> 2018
Toleransi cekaman biotik	PYLs	Peningkatan pertumbuhan dan produktivitas	Miao <i>et al.</i> 2018
	Badh2	Peningkatan aroma	Shao <i>et al.</i> 2017
	OsERF2910	Peningkatan ketahanan terhadap blas	Wang <i>et al.</i> 2016
Toleransi cekaman abiotik	OsSWEET13	Peningkatan ketahanan terhadap HDB	Zhou <i>et al.</i> 2015
	BEL	Tahan herbisida	Xu <i>et al.</i> 2014
Perbaikan nilai gizi	OsALS	Tahan herbisida	Sun <i>et al.</i> 2016
	OsSAPK2	Toleran kekeringan	Lou <i>et al.</i> 2017
	OsNramp5	Kandungan Cd rendah	Tang <i>et al.</i> 2017
	SBEIIb dan SBEI	Kandungan amilase tinggi	Sun <i>et al.</i> 2017

PERBAIKAN KARAKTER KOMPONEN HASIL

Karakter komponen hasil dan kualitas benih padi merupakan sifat-sifat kuantitatif yang dikendalikan oleh banyak lokus genomik. Komponen utama penentu produktivitas padi di antaranya ditentukan oleh 3 karakter utama yaitu jumlah malai pertanaman, jumlah bulir per malai, dan bobot biji (Xing & Zhang, 2010). Perbaikan ketiga karakter tersebut dilakukan dengan meng-*knock out* gen-gen pengendali karakter tersebut yaitu gen GS3, DEP1, GS5, GW2, Gn1a, dan TGW6 yang diketahui bahwa gen-gen tersebut merupakan regulator negatif dari ukuran biji, jumlah dan bobot biji (Zhang *et al.* 2017). Empat gen Gn1a, DEP1, GS3, dan IPA1 masing-masing telah diedit menggunakan sistem CRISPR/Cas9 menghasilkan fenotipe yang diharapkan seperti malai yang tegak dan rapat dan ukuran biji yang lebih besar (Li *et al.* 2016). Pada studi yang lain, mutasi tiga gen untuk bobot biji secara simultan, GW2, GW5, dan TGW6 menggunakan CRISPR/Cas9 menghasilkan peningkatan sebesar 29,3% terhadap karakter bobot 1000 biji pada mutan *triple null* (Xu *et al.* 2016). Hasil ini menggambarkan bahwa *pyramiding* mutan *null* gen-gen untuk hasil pada satu kultivar melalui pengeditan multigen akan sangat penting pada pengaturan komponen hasil padi.

Demikian juga, umur berbunga padi juga merupakan sifat agronomi penting yang berkontribusi terhadap hasil. Pengeditan genome dengan sistem CRISPR/Cas9 digunakan untuk pengembangan sebuah pendekatan pemuliaan yang sangat efisien dengan mutagenesis terarah pada tiga gen utama (Hd2, Hd4, dan Hd5) yang diketahui berpengaruh negatif terhadap umur berbunga (Li *et al.* 2017). Hasil menunjukkan bahwa umur berbunga dari 9 galur padi dari turunan mutan mempunyai umur lebih genjah.

Pertumbuhan dan hasil juga dikendalikan oleh beberapa fitohormon dan jejaring pensinyalan yang saling tumpah tindih. Asam absisat (ABA), sebuah fitohormon penting, dikendalikan oleh komponen *soluble pyrabactin resistance 1* (PYR1)/PYR1-like (PYL)/regulatory dari protein family reseptor ABA (RCAR). Teknologi CRISPR/Cas9 juga digunakan secara efisien untuk mengedit gen PYL grup I (PYL1–PYL6) dan grup II (PYL7–PYL11 dan PYL13) pada padi yang menyebabkan peningkatan pertumbuhan dan produktivitas pada padi (Miao *et al.* 2018).

Gen *sd-1* (semi dwarf-1) yang mengkode *GA20 ox-2* (Spielmeyer *et al.* 2002) merupakan enzim kunci dalam biosintesis hormon pertumbuhan tanaman gibberellin. Mutasi delesi pada gen *GA20 ox-2* menciptakan kodon stop prematur, yang menyebabkan penurunan jumlah GA20, dan menyebabkan postur tanaman padi menjadi pendek. Postur tanaman yang pendek ini memiliki efek pleiotropik pada jumlah anakan yang banyak, arsitektur daun yang tegak sehingga mampu menangkap energi cahaya lebih banyak, indeks panen yang lebih tinggi, dan tanaman lebih responsif terhadap pemupukan nitrogen, sehingga produktivitas tanaman meningkat secara nyata (Xia *et al.* 1991; Courtois *et al.* 1995). Teknologi CRISPR/Cas9 telah berhasil mengedit gen *GA20ox-2* pada padi model kultivar Kitaake (Santoso *et al.* 2016). Galur padi mutan mempunyai tambahan dua basa A dan menghasilkan fenotipe tinggi tanaman yang jauh lebih pendek dari padi kontrol (Gambar 3.12).

PEMBENTUKAN PADI HIBRIDA

Teknologi CRISPR/Cas9 juga telah digunakan untuk menginduksi mutasi spesifik pada gen sensitif panas TMS5 untuk mengembangkan galur padi indica TGMS baru hanya dalam waktu satu tahun (Zhou *et al.* 2016). Selain itu, pengeditan CRISPR/Cas9 digunakan untuk menarget gen *carbon starved*

anther (CSA), sebuah lokus yang bertanggung jawab terhadap karakter mandul jantan pada kondisi kondisi hari pendek dan mandul jantan pada kondisi hari panjang pada padi japonica untuk mengembangkan galur-galur PGMS terbalik (Li *et al.* 2016). Oleh karena itu, teknologi CRISPR/Cas9 dapat mempercepat pemuliaan galur TGMS dimana tahap pertama menuju aplikasi skala besar pada pemuliaan padi hibrida 2 jalan.

PERBAIKAN KETAHANAN TERHADAP CEKAMAN BIOTIK

Kehilangan hasil pada padi dan rendahnya kualitas hasil dapat disebabkan oleh agen biotik yang meliputi bakteri, cendawan, virus dan serangga hama (Heinrich & Muniappan 2017). Beberapa gen yang berhubungan dengan penyakit telah dimutasi menggunakan pengeditan genom untuk meningkatkan toleransi tanaman terhadap serangan penyakit pada padi. Penyakit hawar daun bakteri (HDB) yang disebabkan oleh *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Xoo), merupakan ancaman utama pada pertanaman padi. Pendekatan pemuliaan konvensional dan molekuler telah menghasilkan varietas padi untuk mengendalikan penyakit tersebut (Pradhan *et al.* 2015). Namun demikian, munculnya patotipe virulen baru telah menyebabkan munculnya pendekatan baru untuk mengatasi penyakit hawar daun tersebut. Teknologi CRISPR/Cas9 telah digunakan untuk mengkonstruksi sebuah mutasi null pada gen OsSWEET13 untuk mencegah netralisasinya oleh gen efektor TAL pthXo2 yang menyebabkan peningkatan ketahanan terhadap HDB pada padi indica IR24 (Zhou *et al.* 2015).

Penyakit blas padi yang disebabkan oleh cendawan ascomycetes *Magnaporthe oryzae* merupakan penyakit paling merusak pada padi dan merupakan ancaman untuk ketahanan pangan dunia (Zhang *et al.* 2014). Blas dapat menyebabkan kehilangan hasil 60-100% pada area produksi padi skala luas dan

pada kondisi lingkungan yang sesuai (Kihoro *et al.* 2013). Usaha yang sangat nyata telah dibuat untuk mengembangkan kultivar yang tahan blas dengan menggunakan pendekatan molekuler dan genomik. Pemuliaan ketahanan tanaman inang secara konvensional telah mempunyai peranan yang sangat penting pada pengembangan ketahanan blas baru (Ashkani *et al.* 2015). Namun demikian, teknologi tersebut sangat menyita waktu dan banyak tahapan yang harus dilakukan. Lebih lanjut, munculnya variabilitas patogen blas baru sering menyebabkan patahnya kultivar yang tahan. Perkembangan terbaru dari teknologi pengeditan genom dapat menjadi alternatif yang sesuai untuk meningkatkan ketahanan padi terhadap *M. oryzae*. CRISPR/Ca9 yang diarahkan untuk meng-*knock out* gen faktor transkripsi OsERF922 telah menunjukkan adanya peningkatan ketahanan terhadap blas padi (Wang *et al.*, 2016). Galur tanaman homosigot T2 memperlihatkan jumlah lesion blast sangat nyata menurun dibandingkan dengan tanaman tipe liarnya. Hal ini menggambarkan bahwa CRISPR/Cas9 merupakan pendekatan yang bermanfaat untuk meningkatkan ketahanan blas pada padi.

Penyakit tungro padi (RTD) merupakan penyakit penting lain pada padi yang sangat mempengaruhi produksi padi hampir di semua negara Asia. Hal ini disebabkan oleh interaksi dua virus berbeda, yaitu, *rice tungro spherical virus* (RTSV) dan *rice tungro baciliform virus* (RTBV) (Mishra & Zhao 2018). Pemuliaan ekstensif untuk pengembangan ketahanan dan evaluasi galur isogenik yang tahan menunjukkan bahwa gen faktor inisiasi translasi 4 gamma (eIF4G) bertanggung jawab untuk ketahanan RTSV dan residu YVV dari eIF4G diketahui berasosiasi dengan reaksi terhadap RTSV (Lee *et al.* 2010). Pengeditan gen eIF4G dengan CRISPR/Cas9 dilaporkan pada padi yang rentan terhadap RTSV, IR64, sebagai usaha untuk mengembangkan sumber ketahanan baru terhadap RTD (Macovei *et al.* 2018). Alel eIF4G baru ditransmisikan ke generasi T1 dan T2 dengan tidak ada mutasi

terdeteksi diluar situs target. Tanaman tahan RTSV dengan alel eIF4G baru dapat digunakan sebagai materi yang bermanfaat untuk mengembangkan varietas yang lebih tahan terhadap RTSV.

PERBAIKAN TOLERANSI TERHADAP CEKAMAN ABIOTIK

Gen bentazon sensitif lethal (BEL) pada padi membawa ketahanan terhadap herbisida bentazon dan sulfonylurea dan mutan *loss-of-function* dari gen *bel* menjadi sensitif terhadap herbisida (Pan *et al.* 2006). Mutan bel sering digunakan pada seleksi kontaminasi biji pada sistem produksi padi hibrida. Meskipun BEL sangat nyata dalam menentukan keamanan produksi padi hibrida, aplikasinya selalu dibatasi karena sumber daya genetik alami yang terbatas. Oleh karena itu, mutasi gen BEL dengan CRISPR/Cas9 telah diuji pada padi menggunakan transfer gen melalui *A. tumefaciens* (Xu *et al.* 2014). Transforman CRISPR/Cas9 yang stabil menunjukkan efisiensi mutagenik 2-16% sementara analisis fenotipik memperlihatkan bahwa tanaman transgenik termutasi bialelik sensitif terhadap bentazon.

Pada saat ini, mutasi dengan pengeditan genom telah berhasil mengintroduksi gen ALS untuk menghasilkan varietas padi toleran herbisida (Sun *et al.* 2016). Rekombinasi homologi (HR) dengan CRISPR/Cas9 telah dilakukan untuk mengintroduksi mutasi multi-titik yang berbeda pada gen ALS padi (Sun *et al.* 2016). Skrining fenotipik menunjukkan bahwa tanaman tipe liar mati setelah 36 hari disemprot dengan *bispyribac sodium* (BS) sementara galur edit menunjukkan toleransi terhadap BS dan tumbuh normal. Jadi, sistem *genome editing* dapat secara efisien digunakan untuk menghasilkan tanaman padi toleran herbisida homosigot dalam satu generasi.

Bibit padi umumnya sensitif terhadap suhu dingin khususnya pada tahap perkecambahan. Perbaikan toleransi padi terhadap suhu dingin dapat secara meningkatkan produktivitas padi. TIFY1b, sebuah faktor transkripsi, merupakan salah satu gen yang terlibat dalam toleransi terhadap dingin pada padi. Teknologi CRISPR/ Cas9 telah dilakukan untuk mengedit gen TIFY1b dan gen homologi TIFY1a (Huang *et al.* 2017). Mutasi titik spesifik teramati pada tanaman padi T0. Penelitian mengindikasikan galur mutan TIF1 dapat digunakan untuk mempelajari peranan gen TIFY1 pada adaptasi padi terhadap suhu rendah.

PERBAIKAN MUTU BERAS

Kandungan amilase (AC) yang tinggi dan pati resistan (RS) meningkatkan kesehatan manusia dan mengurangi risiko penyakit serius termasuk hipertensi, diabetes dan kanker usus (Chen *et al.* 2012). Oleh karena itu, perlu untuk mengembangkan varietas padi dengan AC dan RS tinggi untuk mengatasi tantangan yang muncul pada nilai gizi untuk kesehatan masyarakat. Teknologi CRISPR/Cas9 telah berhasil digunakan untuk merakit padi amilosa tinggi dengan mengarahkan pada dua enzim SBEI dan SBEIIb (Sun *et al.* 2017). Mutan *sbeII* menunjukkan peningkatan yang nyata pada kandungan AC dan RS masing-masing sebesar 25 dan 9,8. Hal ini menggambarkan bahwa SBEII memainkan peranan yang nyata dalam menentukan struktur dan sifat nilai gizi dari pati dan pengeditan SBEIIb dengan CRISPR/Cas9 akan menjadi penting di dalam pengembangan varietas padi yang tinggi amilase dan RS.

Pengeditan genom juga dapat digunakan untuk memodifikasi gen-gen padi yang menghasilkan varietas padi non-toksik dan lebih sehat. Kadmium (Cd) adalah logam berat yang sangat toksik yang menyebabkan efek kesehatan yang serius pada manusia yang mengonsumsi padi sebagai bahan pangan pokok.

Sistem pengeditan CRISPR/Cas9 saat ini telah digunakan untuk mengembangkan galur padi indica dengan akumulasi Cd rendah dengan meng-*knock out* gen transporter logam OsNramp5 (Tang *et al.* 2017). Pengujian lapang galur padi indica mutan menunjukkan bahwa konsentrasi Cd pada biji yang konsisten kurang dari 0,05 mg/kg, dibandingkan dengan konsentrasi yang tinggi antara 0.33-2,90 mg/kg pada biji padi indica tipe liar tanpa mempengaruhi hasil tanaman. Sistem pengeditan genom diharapkan dapat digunakan ke depan untuk meminimalkan risiko kontaminasi logam berat pada biji padi.

Padi aromatik sangat disukai dan mempunyai nilai jual yang lebih tinggi karena kualitas wanginya. Supresi protein *betain aldehyde dehydrogenase* (BADH2) menginduksi sintesis senyawa 2-asetil-1-pirolin (2AP) yang merupakan senyawa utama wangi pada padi. Teknologi CRISPR/Cas9 telah digunakan untuk mengedit gen wangi *Badh2* pada galur padi indica (Shao *et al.* 2017). Galur mutan mempunyai tambahan basa T pada ekson pertama *Badh2* dan menghasilkan peningkatan jumlah 2AP dan meningkatkan aroma pada padi.

STATUS PERKEMBANGAN PENELITIAN GENOM EDITING DI INDONESIA

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) di bawah Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian telah merintis penelitian mutagenesis terarah dengan memanfaatkan teknologi pengeditan genom CRISPR/Cas9. Pada tahap awal, teknologi pengeditan genom CRISPR/Cas9 diarahkan untuk memutasi gen *GA20ox-2* (*GA20ox-2*). Mutasi pada gen *sd-1* (*semi dwarf-1*) yang mengkode *GA20 ox-2* dapat menyebabkan postur pendek (Spielmeier *et al.*, 2002). Penelitian pengeditan genom diawali dengan merakit konstruk CRISPR/Cas9 yang membawa gRNA-*GA20ox-2* dari

padi (Gambar 3.12) dan konstruk tersebut telah digunakan untuk melakukan mutasi terarah gen *GA20 ox-2*. Mutasi gen *GA20 ox-2* dapat menghasilkan *stop codon* prematur yang menyebabkan terjadinya perubahan pada lintasan metabolisme gen *GA20 ox-2* yang berakibat pada penurunan jumlah produk GA20 dan menyebabkan postur tanaman padi menjadi lebih pendek. Penelitian lebih lanjut menemukan bahwa postur tanaman yang pendek ini memiliki efek pleiotropik pada jumlah anakan yang banyak, arsitektur daun yang tegak sehingga mampu menangkap energi cahaya lebih banyak, indeks panen yang lebih tinggi, dan tanaman lebih responsif terhadap pemupukan nitrogen, sehingga diharapkan akan berpengaruh pada peningkatan produktivitas tanaman (Xia *et al.* 1991; Courtois *et al.* 1995).

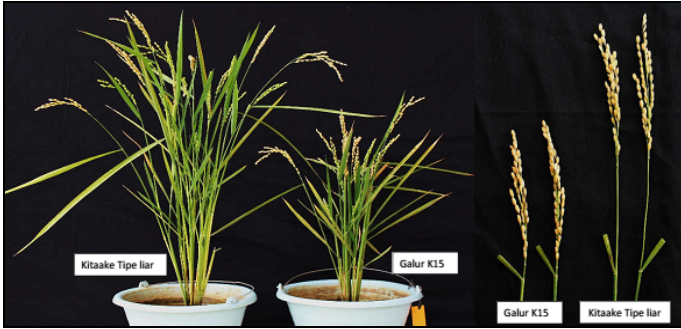
Santoso *et al.* (2016) membuktikan bahwa mutasi dengan sistem CRISPR/Cas9 pada padi varietas Kitaake menghasilkan tipe mutasi insersi basa gen *GA20ox-2*. Adanya insersi menyebabkan terjadinya stop kodon di awal (*premature stop codon*) pada gen *GA20ox-2* sehingga tidak terbentuk protein *GA20ox-2* yang menyebabkan perubahan fenotipik tanaman. Perubahan yang nyata terlihat pada karakter tinggi tanaman dimana tanaman mutan menjadi lebih pendek dibandingkan dengan tanaman padi kontrol (Gambar 3.13).

Penelitian juga menemukan bahwa sistem CRISPR/Cas9 dapat menghasilkan tanaman yang mempunyai alel homosigot pada generasi T₀. Ini mengindikasikan bahwa sistem CRISPR/Cas9 sangat efisien untuk perbaikan sifat pada padi karena dapat



Sumber: Santoso *et al.* 2016

Gambar 3.12. Peta konstruk CRISPR/Cas9 yang membawa dua gRNA dari gen *GA20ox-2*. Selain membawa gen *Cas9*, konstruk juga membawa gen seleksi ketahanan terhadap higromisin



Gambar 3.13. Penampilan galur padi mutan CRISPR/Cas9–Osga20ox-2 dibandingkan dengan kontrol Kitaake. Galur padi mutan memiliki postur tinggi tanaman dan panjang malai yang lebih pendek dibandingkan dengan kontrol Kitaake

mengurangi waktu yang diperlukan seperti halnya pada pemuliaan konvensional atau pemuliaan molekuler lainnya. Selain itu, pemanfaatan teknologi CRISPR/Cas9 mempunyai peluang untuk mengembangkan tanaman mutan yang sudah tidak mengandung konstruksi CRISPR atau nontransgenik (Santoso 2015).

PROSPEK PENGEMBANGAN TEKNOLOGI GENOM EDITING

Teknologi pengeditan genom melalui sistem CRISPR/Cas9 mempunyai peranan yang sangat nyata pada penelitian perbaikan genetik (*genetic improvement*) tanaman padi saat ini. Teknik ini telah terbukti sebagai metode yang efektif untuk perbaikan tanaman karena kemampuannya untuk melakukan mutasi pada target yang diinginkan dalam genom dengan akurasi yang lebih besar, efisien dan sederhana. Satu kelebihan utama dari teknik ini terletak pada kenyataan bahwa transgen yang menyebabkan modifikasi genetik dapat dengan mudah dihilangkan dari genom melalui segregasi genetik menghasilkan

individu yang tidak ada perbedaannya antara tanaman edit gen dan tanaman yang dikembangkan melalui pemuliaan konvensional. Oleh karena itu, tanaman hasil pengeditan genom dapat dikategorikan sebagai tanaman non-transgenik.

Namun demikian, masih terdapat beberapa tantangan dalam aplikasi pengeditan genom. Pengurangan tantangan ini pada padi dan tanaman lain dapat meningkatkan aplikasi yang efisien dari teknologi ini pada pemuliaan tanaman. Tantangan pertama adalah pengurangan adanya syarat PAM untuk pengeditan genom CRISPR. Apabila hal ini dapat dilakukan maka pengeditan genom pada tanaman sereal terutama padi dapat meningkatkan peluang untuk menghasilkan varietas baru yang lebih banyak. Tantangan kedua adalah untuk meningkatkan efisiensi yang nyata dalam pengeditan penyisipan gen. Karena sifat yang diinginkan untuk pemuliaan tanaman tergantung pada mutasi *gain of function*, pengeditan yang tepat dengan penggantian sekuen dan *knock-in fragmen* melalui HR mempunyai implikasi penting untuk perbaikan tanaman. Namun demikian, pengeditan penggantian gen masih sulit untuk dilakukan saat ini dikarenakan efisiensi HR pada tanaman yang masih rendah.

KESIMPULAN

Berdasarkan kelebihan yang dimiliki, sistem pengeditan genom CRISPR/Cas9 sangat berpotensi untuk diaplikasikan di dalam penelitian perbaikan tanaman melalui modifikasi gen target yang sangat terarah untuk menghasilkan varietas unggul padi dengan sifat-sifat yang diinginkan. Sistem pengeditan genom CRISPR/Cas9 juga berpeluang untuk menghasilkan varietas unggul padi yang dikategorikan sebagai tanaman nontransgenik dan sistem ini menjadi teknik modifikasi gen yang dapat dengan mudah diadopsi oleh beberapa institusi penelitian di Indonesia karena sistem ini lebih sederhana dan efisien dalam aplikasinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah NA, Prakash CS, McHughen AG. 2015. Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. *GM Crops & Food*. 6:183-205.
- Andersson M, Turesson H, Nicolia A, Falt AS, Samuelsson M, Hofvander P. 2016. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep*. 36:117-128.
- Ashkani S, Rafii MY, Shabanimofrad M, Miah G, Sahebi M, Azizi P, *et al*. 2015. Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of blast disease resistance in rice crop. *Font Plant Sci*. 16:886.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, *et al*. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 315:1709-12.
- Bortesi L, Fischer R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv*. 33:41-52.
- Butler NM, Atkins PA, Voytas DF, Douches DS. 2015. Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. *PLoS One*. 10: e0144591.
- Char SN, Neelakandan AK, Nahampun H, Frame B, Main M, Spalding MH, Becraft PW, Meyers BC, Walbot V, Wang K, Yang B. 2017. An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J*. 15:257-268.
- Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. 2012. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. 8:228-236.

- Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 31:230-232.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, *et al.* 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* 186:757-61.
- Courtois B, Huang N, Guiderdoni E. 1995. RFLP mapping of genes controlling yield components and plant height in an indica × japonica doubled haploid population. In: Proceedings of the International Rice Research Conference, Los Banos, Philippines, 13-15 February 1995. pp. 963-976.
- Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. 2013. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell.* 12:393-4.
- Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang D, Wei P, Cao F, Zhun S, Feng Z, Mao Y, Zhu J. 2013. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res.* 23:1229-1232.
- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson EF. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol.* 1(6): e60.
- Heinrich EA, Muniappan R. 2017. IPM for tropical crops rice. *CAB Rev.* 12:030.
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O. *et al.* (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 31:827-832.
- Huang XZ, Zeng XF, Li JR, Zhao DG. 2017. Construction and analysis of tify1a and tify1b mutants in rice (*Oryza sativa*)

- based on CRISPR/Cas9 technology. *J Agric Biotechnol.* 25:1003-1012.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 169:5429-33.
- Jankele R, Svoboda P. 2014. TAL effectors: tools for DNA targeting. *Funct Genom.* 13:409-419.
- Jia H, Wang N. 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLOS ONE.* 9(4):e93806.
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41(20): e188.
- Jinek M, Chylinski K, Fontana I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337:816-821.
- Kihoro J, Bosco NJ, Murage H, Ateka E, Makihara D. 2013. Investigating the impact of rice blast disease on the livelihood of the local farmers in greater Mwea region of Kenya. *Springerplus.* 2:308.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1986. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *FokI* cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:1156-60.
- Lee JH, Muhsin M, Atienza GA, Kwak DY, Kim SM, De Leon TB, *et al.* 2010. Single nucleotide polymorphism in a gene for translation initiation factor (eIF4G) of rice (*Oryza sativa*) associated with resistance to rice tungro spherical virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23:29-38.

- Li J, Sun Y, Du J, Zhao Y, Xia L. 2017. Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.* 10:526-529.
- Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, *et al.* 2016. Gene replacement and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat Plants.* 12:16139.
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, *et al.* 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol.* 31:688–91.
- Li Q, Zhang D, Chen M, Liang W, Wei J, Qi Yi, Yuan Z. 2016. Development of japonica photo-sensitive genic male sterile rice lines by editing carbon starved anther using CRISPR/Cas9. *J Genet Genomics.* 43:415-419.
- Lou D, Wang H, Liang G, Yu D. 2017. OsSAPK2 confers abscisic acid sensitivity and tolerance to drought stress in rice. *Front. Plant Sci.* 8:993.
- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E. 2012. Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat Biotechnol.* 30:231-239.
- Macovei A, Seilla NR, Cantos C, Johson GB, Slamet-Loedin I, Cermak T., *et al.* 2018. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9–targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus. *Plant Biotechnol. J.* (Epub ahead of print).
- Maeda H, Ishii T, Mori H, Kuroda, Horimoto M, Takamura I, Kinoshita T, Kamijima O. 1997. High density molecular map of semi-dwarfing gene, *sd-1*, in rice (*Oryza sativa* L.) seedling. *Breed Sci.* 47:317–320.

- Main M, Frame B, Wang K. 2015. Rice, Japonica (*Oryza sativa* L.). In: Wang K, editor. *Agrobacterium protocols: Volume 1, Methods in molecular biology*, vol. 1223. New York (USA): Springer Science+Business Media.
- Miao C, Xiao L, Hua K, Zoua C, Zhao Y, Bressan RA. *et al.* 2018. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor gene promote rice growth and productivity. *Proc Natl Acad USA*. 115:6058-6063.
- Mishra R, Zhao K. 2018. Genome editing technologies and their applications in crop. *Plant Biotech. Rep.*
- Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol.* 18:455-457.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 31:691-693.
- Pan CT, Ye L, Qin L, Liu X, He YJ, Wang J, *et al.* 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plant in the first and later generation. *Sci. Rep.* 6:24765.
- Pan G, Zhang X, Liu K, Zhang J, Wu X, Zhu J, *et al.* 2006. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene CYP81A6 that confers resistance to two different classes of herbicides. *Plant Mol Biol.* 61:933-943.
- Palpant NJ, Dudzinski D. 2013. Zinc finger nucleases: looking toward translation. *Gene Theor.* 20:121-127.
- Pradhan SK, Nayak DK, Mohanty S, Behera L, Barik SR, Pandit E, *et al.* 2015. Pyramiding of three bacterial blight resistance for

- broad-spectrum resistance in deep water rice variety. *Jalmagna. Rice.* 8:2413.
- Puchta H. 2005. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot.* 56:1-14.
- Santoso TJ. 2015. CRISPR, teknologi pengeditan genom terarah untuk pengembangan tanaman non-transgenik. *Buletin Agrobiogen.* 11:9-12.
- Santoso TJ, Enggarini W, Trijatmiko KR, Sitepu MB. 2016. Introduksi konstruk CRISPR-Cas9/Gen *GA20 Ox-2* ke padi dan identifikasi mutan-mutan padi melalui analisis molekuler dan sekuensing. Laporan Akhir Penelitian TA 2016. *BB Biogen.*
- Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Datta SK, Ishiyama K, Saito T, Ashikari M, Khus GS, Kitano H, Matsuoka M. 2002. A mutant of gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature.* 416:701-702.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, and Qiu JL. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 31:686-688.
- Shao G, Xie L, Jiao G, Wei X, Sheng Z, Tang S, *et al.* 2017. CRISPR/CAS9-mediated Editing of the Fragrant Gene *Badh2* in Rice. *Chin J Rice Sci.* 31:216-222.
- Spielmeyer W, Ellis MH, Chandler PM. 2002. Semidwarf (*sd-1*), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:9043-9048.
- Sun Y, Zhang X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, *et al.* 2016. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of Acetolactate synthase. *Mol Plant.* 9:628-631.

- Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li ., Guo X. *et al.* 2017. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front Plant Sci.* 8:298.
- Sundstrom JF, Albihn A, Boqvist S, Ljungvall K, Marstop H, Martiin C, Magnusson U. 2014. Future threats to agricultural food production posed by environmental degradation, climate change, and animal and plant diseases-a risk analysis in three economic and climate setting. *Food Secur.* 6:201-215.
- Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, *et al.* 2017. A CRISPR-CpfI system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat Plants.* 3:17018.
- Toyomasu T, Kawaide H, Sekimoto H, von Numer C, Phillips A. L, Hedden P, Kamiya Y. 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding gibberellin 20-oxidase from rice (*Oryza sativa*) seedlings. - *Physiol Plant.* 99:111-118.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, *et al.* 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid breadwheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.* 32:947-51.
- Wang F, Wang C, Liu P, Lei C. Hao W, Gao Y, *et al.* 2016. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PLOS ONE.* 11:e0154027.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, *et al.* 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid breadwheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.* 32:947-51.

- Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, *et al.* 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J.* 12:797-807.
- Zhang H, Zhang J, Lang Z, Ramon JB, Zhu JK. 2017. Genome editing-principles and application for functional genomics research and crop improvement. *Crit Rev Plant Sci.* 36:291-309
- Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res.* 42:10903-10914.
- Zhou H, He M, Li J, Chen L, Huang Z, Zheng S, *et al.* 2016. Development of Commercial Thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMSS Editing system. *Sci Rep.* 6:37395.
- Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, Eom JS, *et al.* 2015. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J.* 82:632-643.
- Xing Y, Zhang Q. 2010. Genetic and molecular bases of rice yield. *Annu Rev Plant Biol.* 61:421-442.
- Xu Y-L, Li L, Wu K, Peeter AJM, Gage DA, Zeevart JAD. 1995. The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20[oxidase: Molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:6640-6644.
- Xu T, Li Y, Nostrand JDV, He Z, Zhou J. (2014). Cas9-based tools for targeted genome editing and transcriptional control. *Appl Environ Microbiol.* 80:1544-1552.

- Xu R, Yang Y, Qin R, Li H, Qiu C, Li L, *et al.* 2016. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J Genet Genom.* 43:529-532.
- Xia BS, Hanada K, Kizuchi F. 1991. Character expression of the semi-dwarfism gene *sd-1* in rice: Effect of nitrogen levels on the expression of some agronomic characteristics. *Jpn J Crop Sci.* 60:36-41.