भारतीय वैज्ञानिक एवं औद्योगिक अनुसंधान पत्रिका
वर्ष 26 अंक 2 दिसम्बर 2018 पृ. 63-68

सोयाबीन के पोषण संबंधी गुणों में सुधार हेतु एक कदम

मोनिका जॉली, वेद कृष्णन, विनुथा टी, शेली प्रवीण एवं अर्चना सचदेव
जैव रसायन विभाग, भारतीय कृषि अनुसंधान संस्थान-आई सी ए आर, नई दिल्ली 110 012

सारांश : फाइटिक एसिड अनाज और फल के बीज में कुल फॉस्फोरस का 75.80% का गठन करता है लेकिन अधिकांश इसका उपयोग सुलभ नहीं होता है क्योंकि मोनोगैस्ट्रिक जानवरों को अपने पाचन तंत्र में फाइटेज की कमी होती है जो कि फाइटेट अणु की हाइड्रोलिसिस के लिए महत्वपूर्ण है। यह अवांछित पशु अपशिष्ट से फॉस्फोरस के प्रवाह के कारण यूट्रोफिकेशन की ओर जाता है। इसके अलावा, पॉलीएनायनिक विरोधी पोषक तत्व फाइटिक एसिड आसानी से खनिज धनायनों से बांधता है और उन्हें खनिज की कमी के कारण जानवरों द्वारा अवशोषण के लिए अनुपलब्ध करता है। सोयाबीन की खाद्य उपयोग गुणवत्ता अभी भी सीमित है, मुख्य रूप से कुछ एंटीन्यूट्रीशनल कारकों की उपस्थिति के लिए, उनमें से एक फाइटिक एसिड (डी-मायो-इनोजिटोल 1,2,3,4,5,6 हेक्साकिसफॉस्फेट) है। कम फाइटेट सोयाबीन न केवल मानव स्वास्थ्य में सुधार के लिए वांछनीय है बल्कि पर्यावरण फॉस्फोरस लोड को कम करने के लिए भी ज़रूरी है। वर्तमान अध्ययन में किए गए कदम फाइटिक एसिड बायोसिंथेसिस मार्ग के आईपीके 2 जीन के सटीक और कुशल संपादन के लिए नवीनतम विकसित, लक्षित जीनोम संपादन उपकरण, CRISPR/Cas9 सिस्टम का उपयोग करके कम-फाइटेट सोयाबीन विकसित किया जा सकता है। वर्तमान अध्ययन में फाइटिक एसिड जैव संश्लेषण मार्ग के आईपीके 2 जीन के सटीक और कुशल संपादन के लिए हाल ही में विकसित, लक्षित जीनोम संपादन उपकरणए CRISPR/Cas9 सिस्टम का उपयोग करके कम-फाइटेट सोयाबीन विकसित करने की दिशा में एक कदम का प्रतिनिधित्व किया गया, जिसमें CRISPR/Cas9 IPK2 construct सफलतापूर्वक डिजाइन कर बनाया गया है।

Targeted genome editing with CRISPR/Cas9: a step towards generating nutritionally rich soybean

Monica Jolly, Ved Krishnan, Vinutha T, Shelly Praveen & Archana Sachdev
Department of Biochemistry, ICAR-Indian Agricultural Research Institute, New Delhi 110 012

Abstract

Phytic acid is 75-80% of the total phosphorus in cereal and legume seeds but maximum portion of it is not accessible as the monogastric animals don't have phytase in their digestive tracts which is important for hydrolysis of the phytate molecule. This leads to eutrophication due to the influx of phosphorus from undigested animal waste which is the major source of agricultural phosphorus runoff. Also the polyanionic antinutrient, phytic acid binds to mineral cations and makes them unavailable for absorption by animals leading to mineral deficiencies. Low phytate soybean is thus desirable not only for improving human health but also for reducing the environmental phosphorus load. The implications of phytic acid on the environment, human nutrition and livestock industry have sparked numerous nutritional studies focussing on reduction of its levels. Unfortunately, the negative and altered phenotypes obtained by classical breeding mutations and reverse genetics approaches necessitate the usage of a more targeted and efficient biotechnological intervention for tissue-specific knockdown of phytic acid, obliterating the negative impacts on basal metabolic functions. The steps undertaken in the present study are for developing low-phytate soybean using the latest developed, targeted genome editing tool, CRISPR/Cas9 system for precise and efficient editing of the IPK2 gene of phytic acid biosynthesis pathway. A CRISPR/Cas9 construct for editing the IPK2 gene, involved in phytic acid biosynthesis was successfully designed and generated.

प्रस्तावना

सोयाबीन (*ग्लाइसीन मैक्स*) फलियों की एक प्रजाति है, जिसे उसके खाद्य बीजों के लिए व्यापक रूप से उगाया जाता है। इसे अनेक तरीकों से उपयोग में लाया जाता है। एक बहु उपयोगी बीन, सोया का उपयोग सोया दूध, सोया सॉस, मिसो (सोयाबीन पेस्ट), तेम्पे (एक प्रकार का सोया केक), तोफू जैसे खाद्य पदार्थों

में किया जाता है। भुनी हुई सोयाबीन को स्नैक के तौर पर भी प्रयोग किया जाता है। सोयाबीन, सोया बर्गर और सोया स्नैक्स अनेक सुपरमार्केट और स्पेशियैल्टी स्टोर में उपलब्ध हैं। कभी-कभी सोया को ब्रेड, सीरियल्स और मांस उत्पादों में भी मिलाया जाता है और शाकाहारी उत्पादों में मांस के विकल्प के तौर पर भी प्रयोग किया जाता है। इसके तेल का इस्तेमाल मुख्यतया औद्योगिक अनुप्रयोगों में किया जाता है।

सोयाबीन उत्पाद जन्तु उत्पादों के अच्छे विकल्प हो सकते हैं क्योंकि कुछ अन्य बीन्स के विपरीत, सोयाबीन एक 'संपूर्ण' प्रोटीन रूपरेखा पेश करती है। सोयाबीन युक्त खाद्य पदार्थ मांस और अन्य जन्तु उत्पादों का स्वस्थ विकल्प भी हैं जिनमें कोलेस्ट्रॉल और संतृप्त वसा होती है। सोया प्रोटीन मूलतः अन्य फलियों के समान ही होता है। सोयाबीन अन्य किसी भी बड़ी सब्जी या अनाज की फसल के मुकाबले प्रति एकड कम से कम दोगुने से अधिक प्रोटीन, दुधारू जानवरों के लिए छोड़ी गई जमीन के मुकाबले प्रति एकड 5 से 10 गुना अधिक प्रोटीन और मांस उत्पादन के लिए छोड़ी गई जमीन के मुकाबले प्रति एकड 15 गुना तक अधिक प्रोटीन प्रदान कर सकती है।

सोया उत्पादों के सेवन के अनेक स्वास्थ्यगत लाभ हैं, जिनमें स्तन कैंसर, प्रोस्टेट कैंसर, रजोनिवृत्ति के लक्षणों, हृदय रोगों और ऑस्टियोपोरोसिस से बचाव शामिल है। सोया के अनेक स्वास्थ्य संबंधी लाभ इसमें पाया जाने वाले आइसोफ्लेवोन हैं। आइसोफ्लेवोन की रासायनिक संरचना हमारे एस्ट्रोजेन की क्रिया से बहुत मिलती-जुलती है। संरचना की इस समानता के कारण, वे हमारे शरीर में एस्ट्रोजेन की क्रिया में हस्तक्षेप कर सकते हैं। कोशिकाओं में एस्ट्रोजेन ग्रहणकर्ता के प्रकार के आधार पर, आइसोफ्लेवोन एस्ट्रोजन की गतिविधि को कम या सक्रिय कर सकते हैं। आइसोफ्लेवोन उन्हीं ग्रहणकर्ता स्थलों के लिए एस्ट्रोजेन की गतिविधि को बढ़ा भी सकते हैं। अगर रजोनिवृत्ति के दौरान, शरीर में एस्ट्रोजन का प्राकृतिक स्तर कम हो जाता है, तो आइसोफ्लेवोन उसी ग्रहणकर्ता से चिपकर कर इसकी क्षतिपूर्ति कर सकते हैं, जिससे रजोनिवृत्ति के लक्षणों से राहत मिलती है। आइसोफ्लेवोन के सेवन का सबसे अच्छा तरीका सोया या सोया खाद्यों के रूप में है जिससे आप सोया के अन्य स्वास्थ्यकर तत्वों का भी लाभ उठा सकें। सोया में अनेक प्रकार के आइसोफ्लेवोन होते हैं, लेकिन सबसे लाभकारी जेनिस्टाइन और डैडज़ाइन होते हैं। सोया आइसोफ्लेवोन की सबसे अधिक मात्रा सोया बड़ियों और तेम्पे में पाई जाती है। आइसोफ्लेवोन का दूसरा कुदरती स्रोत लाल तिपतिया है। हाल के एक अध्ययन ने दिखाया है कि आइसोफ्लेवोन में प्रभावी एंटीऑक्सीडेंट की शक्तियां डीएनए को मुक्त मूलक (फ्री रैडिकल) की क्षति से बचाकर कैंसर के दीर्घकालिक जोखिम को कम कर सकती है।

यद्यपि कई स्वास्थ्य लाभकारी बायोएक्टिव्स के साथ एक कार्यात्मक भोजन के रूप में, सोयाबीन का गुणवत्ता के रूप में उपयोग अभी भी सीमित है, मुख्य रूप से कुछ एन्टीन्यूट्रीशनल कारकों की उपस्थिति के लिए, उनमें से एक फाइटिक एसिड (डी-मायो-इनोजिटोल 1,2,3,4,5,6 हेक्साकिसफोस्फेट) है।

सोयाबीन में फाइटिक एसिड फॉस्फोरस का मुख्य भंडारण रूप है जो फॉस्फोरस का 61.70% है। फाइटेट रूप में फॉस्फोरस अवशोषित नहीं किया जा सकता है मोनोगैस्ट्रिक जानवरों द्वारा, क्योंकि जानवरों में फाइटेज की कमी होती है। पाचन एंजाइम फाइटेज फाइटेट अणु से फॉस्फोरस जारी करने के लिए आवश्यक है। गैर-पचाने योग्य फाइटिक एसिड इसलिए मोनोगैस्ट्रिक जानवरों के लिए एक एन्टीन्यूट्रीशनल कारक है। यह प्रोटीन और जस्ता, लौह और कैल्शियम जैसे महत्वपूर्ण खनिजों के पाचन को प्रभावित करता है। फ़ीड उद्योग में, बिना पचा फाइटेट मोनोगैस्ट्रिक जानवर के गैस्ट्रोइंटेस्टाइनल ट्रैक्ट के माध्यम से गुजरता है जो खाद में फॉस्फोरस की मात्रा को बढ़ाता है। अधिक फॉस्फोरस विसर्जन, यूट्रोफिकेशन के रूप में पर्यावरण की समस्याओं को बढ़ाता है।

फाइटिक एसिड अनाज और फल के बीज में कुल फॉस्फोरस का 75-80% का गठन करता है लेकिन अधिकांश इसका उपयोग सुलभ नहीं होता है क्योंकि मोनोगैस्ट्रिक जानवरों को अपने पाचन तंत्र में फाइटेज की कमी होती है जो कि फाइटेट अणु के हाइड्रोलिसिस के लिए महत्वपूर्ण है। यह अंततः अपरिष्कृत पशु अपशिष्ट से फॉस्फोरस के प्रवाह के कारण यूट्रोफिकेशन की ओर जाता है जो कि कृषि फॉस्फोरस रनऑफ का प्रमुख स्रोत है। इसके अलावा, पॉलीएनायनिक एन्टीन्यूट्रिएन्ट फाइटिक एसिड आसानी से खनिज धनायनों से बांधता है और उन्हें खनिज की कमी के कारण जानवरों द्वारा अवशोषण के लिए अनुपलब्ध करता है। यद्यपि कई स्वास्थ्य लाभकारी बायोएक्टिव्स के साथ एक कार्यात्मक भोजन लोड किया गया है, लेकिन सोयाबीन की खाद्य उपयोगी गुणवत्ता अभी भी सीमित है, मुख्य रूप से कुछ एन्टीन्यूट्रीशनल कारकों की उपस्थिति के लिए, जिनमें से एक फाइटिक एसिड (डी.मायो-इनोजिटोल 1,2,3,4,5,6 हेक्साकिसफोस्फेट) है।

सोयाबीन के बीजों में फॉस्फोरस का प्रमुख भंडार आइनोसिटोल फॉस्फोरस (IP6) है जिसे सामान्यतया फाइटिक अम्ल के नाम से जाना जाता है और यह कुल फॉस्फोरस का 70 से 85% होता है। उच्च फाइटिक खुराक से संबन्ध फाइटिक अम्ल की कुपोषण संबंधी भूमिका तथा साथ ही अपनी आंत में फाइटिक अम्ल का पाचन न कर पाने के कारण, इनके स्तरों को कम करने पर केंद्रित

अनेक प्रकार के पोषण संबंधी अध्यन किये जा चुके हैं। पारम्परिक प्रजनन, उत्परिवर्तनों एवं प्रतिलोभ आनुवंशिकी विधियों ने अब तक हमेशा आधारभूत उपापचीय कार्यों के दुष्प्रभावों को नष्ट करने के लिए फाइटिक अम्ल के ऊतक विशिष्ट अवाघात पर ज़ोर दिया है। दुर्भाग्यवश, इन विधियों के परिणामस्वरूप प्राप्त ऋणात्मक एवं परिवर्तित जीनप्ररूपों के कारण, फाइटिक अम्ल पाथवे जीन्स के अधिक लक्षित एवं सक्षम जैवप्रौद्योगिकीय हस्तक्षेप के उपयोग की आवश्यकता प्रतीत होती है। हाल ही में अन्वेषित CRISPR/Cas9 तंत्र की अंतनिर्हित क्षमता को ध्यान में रखते हुए, प्रस्तुत अध्ययन का उद्देश्य, सोयाबीन में (1,4,5) P_3 6/3/5 काईनेस (IPK2) जीन के संपादनार्थ लक्षित जीनोम एडिटिंग उपकरण का अन्वेषण करना था। इसलिए इस अध्ययन में एक कंस्ट्रक्ट जो IPK2 जीन में लक्षित उत्परिवर्तजनीयता उत्पन्न करने के लिए सोयाबीन के पौधों में सक्षम रूप से Cas9 एवं sgRNA- IPK2 को पहुंचा सकता था को डिजाइन कर इस दिशा में एक आरंभिक प्रयास किया गया है।

वर्तमान अध्ययन में फाइटिक एसिड जैव संश्लेषण मार्ग के आईपीके 2 जीन के सटीक और कुशल संपादन के लिए हाल ही में विकसित, लक्षित जीनोम संपादन उपकरण, CRISPR/Cas9 सिस्टम का उपयोग करके कम-फाइटेट सोयाबीन विकसित करने की दिशा में एक कदम का प्रतिनिधित्व किया गया है।

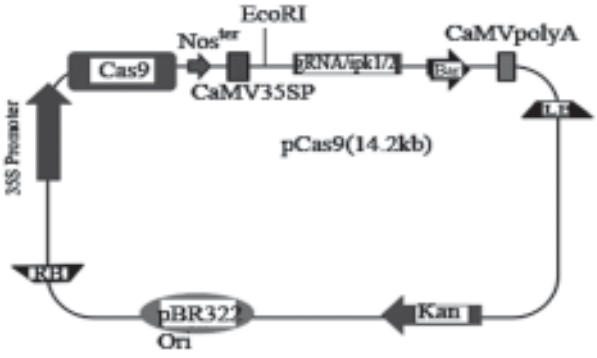
CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)/Cas (CRISPR-associated) प्रणाली, विभिन्न जीवों में जीनोम इंजीनियरिंग के लिए जीन संपादन के लिए एक नई तकनीक है। स्ट्रेप्टोकोकस पायोजेनेस कैस 9-गाइड आरएनए (जीआरएनए) को सोयाबीन (ग्लिसिन अधिकतम) सहित कई प्रजातियों में लक्षित उत्परिवर्तन, जीन एकीकरण और जीन संपादन उत्पन्न करने के लिए सफलतापूर्वक लागू किया गया है[1]। इस तकनीक में दुनिया को बदलने की क्षमता है। हमने सोयाबीन में फाइटेट, बायोसिंथेसिस मार्गों के लक्षित जीन के लिए जीनोम संपादित म्यूटेंट उत्पन्न करने के लिए टाइप II सीआरआईएसपीआर/कैस 9 सिस्टम लागू किया है।

सामग्री एवं विधि

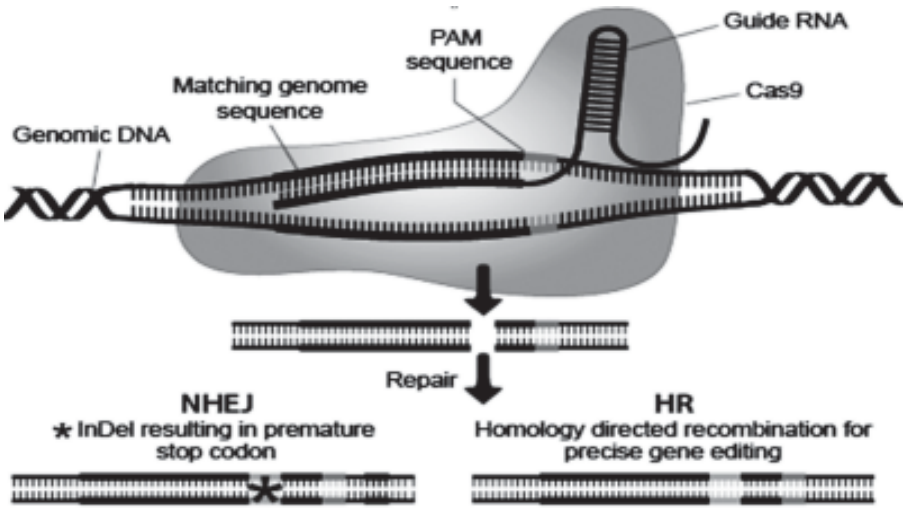
फाइटिक एसिड जैव संश्लेषण के आईपीके 2 जीन को संपादित करने के लिए एक CRISPR/Cas9 निर्माण सफलतापूर्वक डिजाइन और उत्पन्न किया गया है।

शोध की मुख्य विशेषताएं

स्टुपर लैब का CRISPR डिज़ाइन वेब-टूल सफलतापूर्वक डिज़ाइनिंग के लक्ष्य को को चुनने के लिए उपयोग किया गया।



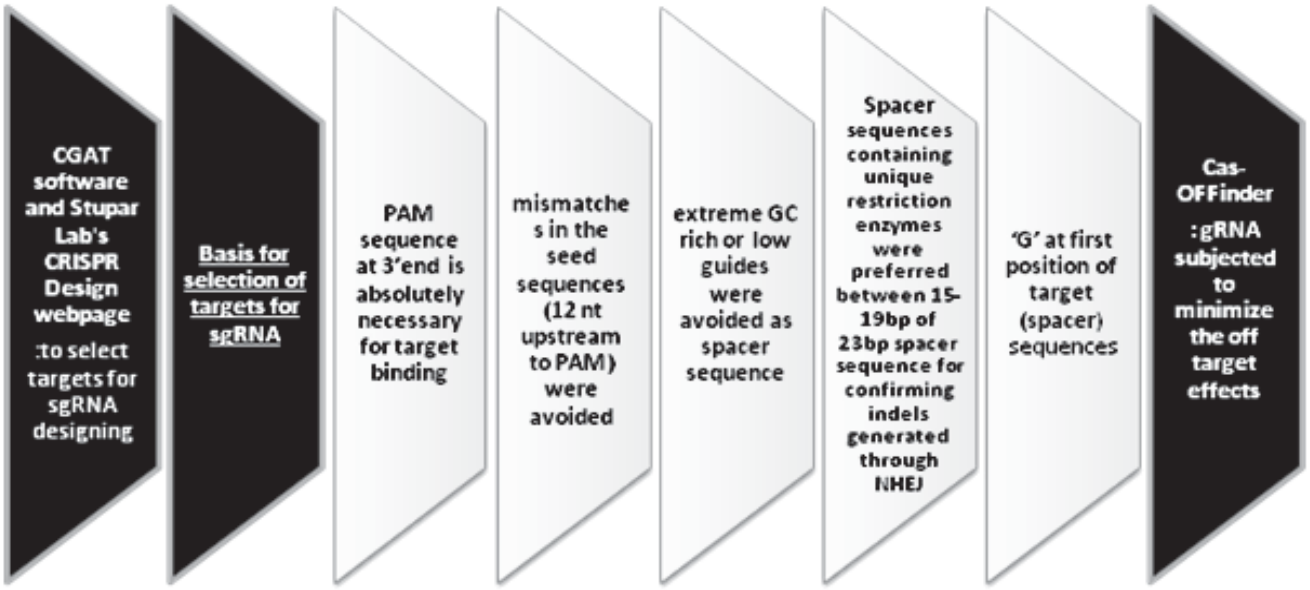
चित्र 2



चित्र 1

Target	Target/Spacer sequence	Location of the target	Restriction sites
1.	GCTCAAGATCCCGGAGCACCAGG	3bp	BstYI, PsuI, Alw21I
2.	GGTGGCCGGGCACAAGGCCAAGG	24bp	StyI, EcoT14I
3.	GTGGTGTACGAGAAGGATCTAGG	664	Mf1I, XhoII

चित्र 3

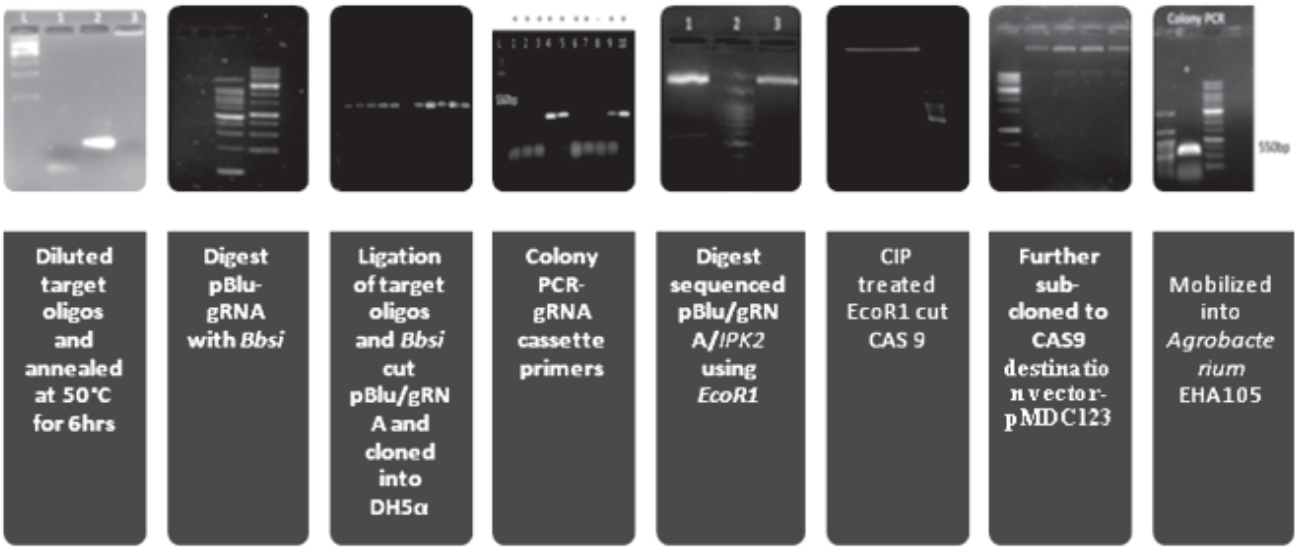


चित्र 4

इनपुट अनुक्रम में उनके स्थान और इस उपकरण का उपयोग कर अद्वितीय प्रतिबंध साइटों के साथ आईपीके 2 जीन के लिए लक्षित अनुक्रमों की एक शृंखला उत्पन्न की गई।

- उपयुक्त वेब-टूल्स का उपयोग कर IPK2 जीन को लक्षित करने वाले टार्गेट/स्पेसर अनुक्रम डिजाइन किये गए जो लक्षित डिजाइनिंग एवं सलेक्शन के मूलभूत पैमाने को पूरा करते और न्यूनतम ऑफ-टार्गेट प्रभावों को भी ध्यान में रखा गया।
- तीन लक्ष्यों के लिए एसजीआरएनए डिज़ाइनिंग के लिए निम्नलिखित मानदंडों के आधार पर 23 इच के अनुक्रमों का चयन किया गया।

1. 3'एंड पर PAM अनुक्रम



चित्र 5

2. बीज अनुक्रम में विसंगतियां नहीं होनी चाहिए (PAM के लिए 12 nt अपस्ट्रीम)

3. एक्सट्रीम जीसी समृद्ध या जीसी कम गाइड अनुक्रम स्पेसर अनुक्रम

a) स्पेसर अनुक्रम जिनमें अनन्य प्रतिबंध एंजाइम शामिल हैं, that cut between 15-19bp of selected 23bp spacer sequence for NHEJ repair तंत्र के माध्यम से उत्पन्न indels की पुष्टि के लिए

b) 'G' लक्ष्य (स्पेसर) अनुक्रमों की पहली स्थिति में अनिवार्य है

- चयनित स्पेसर अनुक्रमों के लिए 'off targets' अनुपस्थिति की पुष्टि कैस-ऑफफिंडर और BLAST टूल्स द्वारा की गई।
- डिजाइन और चयनित तीन अनुक्रमों में, क्लोनिंग के लिए बीबीएसआई साइट के साथ 23nt लक्ष्य अनुक्रम 1 और CRISPR@Cas9 के निर्माण के लिए आगे विश्लेषण के लिए अद्वितीय Afw1 unique एंजाइम साइट लिया गया।
- pBlu/gRNA (शटल वेक्टर) में आगे क्लोनिंग के लिए, वांछित BbsIlkbZV वाले 23nt के टार्गेट/स्पेसर अनुक्रम 1 का चयन किया गया।
- अनुक्रमण द्वारा शटल वेक्टर में टार्गेट अनुक्रम की उपस्थिति की पुष्टि की गयी। IPK2 स्पेसर अनुक्रम युक्त 557bp के गाइड RNA कैसेट (gRNA- IPK2) का EcoRI के साथ पाचन किया गया और फिर Cas9 MDC123(डेस्टिनेशन वेक्टर) के भीतर क्लोनिंग कर Cas9/gRNA-IPK2 कंस्ट्रक्ट तैयार किया गया।
- Target sequence 1 सफलतापूर्वक बीबीएसआई प्रतिबंधित पीबीएलयू/जीआरएनए (शटल वेक्टर) में शामिल किया गया और अनुक्रम सार्वभौमिक प्राइमर्स (एम 13 प्राइमर) द्वारा पुष्टि की गई। Target sequence 1 युक्त 557 bp गाइड आरएनए कैसेट को ईकोआर1 के साथ प्रतिबंधित किया गया और EcoR1 प्रतिबंधित कैस 9 एमडीसी 123 (गंतव्य वेक्टर) में क्लोन किया गया।
- 14.2kb full construct जिसमें कैस 9 जीन और गाइड आरएनए कैसेट शामिल है, कोलोनी पीसीआर और restriction enzyme द्वारा पुष्टि की गई, जिसमें ~ 550bp बैंड गाइड आरएनए casseette release हुआ।
- जीआरएनए प्राइमरों का उपयोग कर प्लाज्मिड में पीसीआर द्वारा भी पुष्टि की गई।
- डीएस-9712 में फाइटिक एसिड के अस्थायी संचय के पैटर्न में रैखिक वृद्धि का खुलासा किया।
- सोयाबीन के वन्य प्रकार डी एस-9712 में फायेटिकअम्ल संचयन का जैव रसायनिक विश्लेषण, उत्परिवर्तितों के तुलनात्मक विश्लेषण में सहायक होगा जो भावी अध्यनों में CRISPR@Cas9 के माध्यम से उत्पन्न इंडेल्स के माध्यम से उत्पन्न किये जायेंगे।

परिणाम और विवेचना

इस प्रकार वर्तमान अध्ययन में एक कंप्यूटर आधारित खोज ने आईपीके 2 जीन को खारिज करने के लिए तीन 23 इच लंबे स्पेसर

अनुक्रम उत्पन्न किए गए उनके प्रतिबंध एंडोन्यूक्लियस साइट्स के साथ। जेनरेट किए गए स्पेसर अनुक्रमों को 'लक्ष्य से बाहर' गतिविधि मूल्यांकन के संपर्क में लाया गया और CRISPR/CAS9 निर्माण की पीढ़ी के लिए लक्ष्य अनुक्रम 1 आगे बढ़ाया गया।

डिज़ाइन और चुने गए तीन अनुक्रमों में, क्लोनिंग के लिए बीबीएसआई साइट के साथ 23nt लक्ष्य target1 और CRISPR/Cas9 निर्माण पीढ़ी के लिए अद्वितीय विश्लेषण के लिए अद्वितीय AfwI unique एंजाइम साइट लिया गया। लक्ष्य target 1 सफलतापूर्वक बीबीएसआई प्रतिबंधित पीबीएलयू/जीआरएनए में शामिल किया गया (शटल वेक्टर) और sequence universal primers (एम 13 प्राइमर) द्वारा पुष्टि की गई। लक्ष्य target 1 युक्त 557 bp guide RNA cassette को 1 के साथ प्रतिबंधित किया गया और ईकोआरआई प्रतिबंधित कैस Cas9 MDC123 (destination vector) में क्लोन किया गया। 14.2kb full construct जिसमें कैस 9 जीन और गाइड आरएनए कैसेट शामिल है, कोलोनी पीसीआर और restriction digestion द्वारा पुष्टि की गई जिसमें ~ 550bp बैंड गाइड आरएनए कैसेट को जारी किया गया।

CRISPR / CAS 9 (क्लस्टर नियमित अंतराल वाले छोटे पैलिंड्रोमिक दोहराव) जीन संपादन के लिए एक नई तकनीक साबित हुई है। हालांकि, सोयाबीन पौधों में transformation से पहले डिजाइन किए गए एसजीआरएनए की प्रभावकारिता की पूर्व-सत्यापन अनिवार्य है। इस अध्ययन में डिज़ाइन किया गया निर्माण कैस 9/ जीआरएनए-आईपीके 2 (CAS9/gRNA-IPK2) डीएनए सर्जरी और जीनोम संपादन के लिए प्रयोग को स्थापित करने की दिशा में अधिक precise तथा एक प्रारंभिक कदम है[3]। इस जीनोम एडिटिंग टेक्नोलॉजी में न केवल चुनिंदा जीन संशोधन को सक्षम करने का एकमात्र लाभ है जो की ट्रांसजेन मुक्त आनुवंशिक रूप से संपादित फसलों को उत्पन्न करने के लिए एक बहुमुखी उपकरण के रूप में भी कार्य करता है। कम फाइटेट सोयाबीन की पीढ़ी न केवल मानव स्वास्थ्य में सुधार के लिए वांछनीय है बल्कि पर्यावरण फॉस्फोरस लोड को कम करने के लिए भी लाभकारी है।

संदर्भ

1. Curtin S J, Xiong Y, Michno J M, Campbell B W, Stec AO, Cermak T, Starker C, Voytas DF, Eamens A L, Stupar R M, CRISPR/Cas9 and TALENs generate heritable mutations for genes involved in small RNA processing of Glycine max and Medicago truncatula. *Plant Biotechnol J*. Oct 31. doi: 10.1111 pbi. (2017) 12857.

2. Jacobs T B, Lafayette P R, Schmitz R J & Parrott W A, (2015) Targetted Genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 .BMC Biotechnol , 15:16.

3. Liang Z, Zhang K, Chen K & Gao C, Targetted mutagenesis in Zea mays using TALLENs and the CRISPR/Cas system, *Journal of Genetics and Genomics*, **41**: (2013) 63-69.

4. Michno J M, Wang X, Liu J, Curtin S J, Kono T J & Stupar R M,

CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and Medicago truncatula using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. GM Crops Food.;6(4):243-52. doi: 10.1080/21645698.2015.1106063. (2015).