

CRISPR/CAS-9 YORDAMIDA MAKKAJO'XORINING ZMESK1 GENI O'CHIRILGAN QURG'OQCHILIKKA CHIDAMLI LINIYALARINI OLISH

Yusupov Abdurahmonbek Nodirjon o'g'li, toyanch doktorant., Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich, katta ilmiy xodim PhD., Mirzaxmedov Muxammadjon Xoshimjon o'g'li, mustaqil tadqiqotchi., Murodov Anvar Adhamjon o'g'li, toyanch doktorant., Obidov Nuriddin, mustaqil tadqiqotchi., Mamajonov Bexzod Orifjon o'g'li, toyanch doktorant., Bashirxonov Ziyodulloxon Hakimullo o'g'li, toyanch doktorant., Kamolova Lola Xayriddinovna, laborant., Buriev Zabardast Tojiboevich, проф

O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi

Tel: 97 273-11-62, Gmail: yusupova0107@gmail.com

Annotatsiya: Qurg'oqchilik ko'plab qishloq xo'jaligi ekinlari qatori makkajo'xori yetishtirishda ham asosiy cheklovlardan biridir. Qurg'oqchilik stressining intensivligiga va o'sish bosqichiga qarab, makkajo'xori hosildorligining yo'qolishi 30 dan 90% gacha o'zgarib turadi. Stress ta'siri ayniqsa gullash va donni to'ldirish bosqichlarida jiddiy kuchli seziladi. Shu sababli ham qurg'oqchilikka chidamli makkajo'xori liniya va navlarini olish bugungi qishloq ho'jaligida foydalanish mumkin bo'lgan suv resurslari cheklangan sharoitda juda muximdir. Quyda makkajo'xorining qurg'oqchilik bilan aloqador ZmESK1 geni asosida tuzilgan CRISPR/Cas9 genetik konstruksiyasini agrobakteriya vositasida makkajo'xori hujayrasiga transformatsiya qilish hamda qurg'oqchilikka chidamliligini oshirish bo'yicha olib borgan tadqiqotimizni bayon qilamiz.

Kalit so'zlar: makkajo'xori, qurg'oqchilik, Agrobakteriya vositasida transformatsiya, CRISPR/Cas9.

СОЗДАНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ С CRISPR/CAS-9 ОТРЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМ ZMESK1

Юсупов Абдурахмонбек Нодиржон ўғли докторант., Аюбов Мирхакамол Собитжанович с.н.с., Мирзахмедов Мухаммаджон Хошимжон ўғли самостоятельный соискатель., Муродов Анвар Адхамжон ўғли докторант., Обидов Нуриддин Шухратжон ўғли м.н.с., Мамажонов Бехзод Орифжон ўғли, докторант., Баширхонов Зиёдулло Ҳакимулло ўғли

докторант., Камалова Лола Хайриддиновна, лаборант., Буриев Забардаст
Таджибоевич, профессор
АНРУз Центр Геномики и Биоинформатики

Тел: 97 273-11-62, Gmail: yusupova0107@gmail.com

Аннотация: Засуха является одним из основных ограничивающих факторов производства кукурузы, а также многих сельскохозяйственных культур. В зависимости от интенсивности стресса засухи и стадии роста растений потери урожая кукурузы колеблются от 30 до 90%. Особенно сильно влияние стресса ощущается на стадиях цветения и налива зерна. Поэтому получение засухоустойчивых линий и сортов кукурузы, которые можно использовать в сельском хозяйстве в условиях ограниченности водных ресурсов, очень важно. Ниже мы описываем наши исследования по повышению устойчивости к засухе с помощью агробактериальной трансформации генетической конструкции CRISPR/Cas9 на основе гена засухоустойчивости кукурузы *ZmESK1* в клетки кукурузы.

Ключевые слова: кукуруза, засуха, агробактериальная трансформация, CRISPR/Cas9.

DEVELOPMENT OF DROUGHT-TOLERANT MAIZE LINES BY SWITCHING OFF ZMESK1 GENE USING CRISPR/CAS-9

Yusupov Abdurahmonbek Nodirjon ugli basic doctoral student,, Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich, senior researcher PhD., Mirzaxmedov Muxammadjon Xoshimjon ugli, independent applicant, Murodov Anvar Adhamjon ugli basic doctoral student, Obidov Nuriddin, ugli junior researcher., Mamajonov Bexzod Orifjon ugli basic doctoral student., Bashirxonov Ziyodulloxon Hakimullo ugli basic doctoral student., Kamolova Lola Xayriddinovna, laboratory assistant.,
Buriyev Zabardast Tojiboevich, professor
Center of genomics and bioinformatics Academy of Sciences of the
Republic of Uzbekistan
Tel: 97 273-11-62, Gmail: yusupova0107@gmail.com

Abstract: Drought is one of the major limiting factors for maize production, as well as for many crops. Depending on the intensity of drought stress and the

plant growth stage, maize yield losses range from 30 to 90%. A stress has a powerful impact in plant developing processes, especially at the flowering and grain-filling stages. Therefore, obtaining drought-resistant maize lines and varieties is vital for agriculture in water-deficit conditions. Here, we describe our studies on improving drought tolerance via *Agrobacterium*-mediated transformation into maize cells of a CRISPR/Cas9 genetic construct based on the maize drought-resistant gene ZmESK1

Keywords: *maize, drought, Agrobacterium-mediated transformation, CRISPR/Cas9.*

Kirish

Makkajo'xori butun dunyo bo'ylab 900 milliondan ortiq odam uchun asosiy oziq-ovqat hisoblanadi [1]. U sholi va bug'doydan keyin uchinchi o'rinda turuvchi eng muhim kaloriya manbaidir. Xitoy va Hindiston kabi bir qator yirik guruch ishlab chiqaruvchi davlatlarda ishlab chiqarishning kamayishi, sut mahsulotlari va go'shtga bo'lgan talabning ortishi bilan makkajo'xoriga global talab 2050 yilga kelib ikki baravar oshishi kutilmoqda [2].

Har yili makkajo'xori donining taxminan 15% dan 20% gacha qismi qurg'oqchilik tufayli kamayadi va bunday yo'qotishlar global iqlim o'zgarishi tufayli yanada ortishi mumkin. So'ngi besh yilda qurg'oqchilik natijasida makkajo'xori hosilining yo'qolishi tufayli rivojlanayotgan mamlakatlar 29 milliard AQSH dollarigacha daromad yo'qotgan [3; 4]. Yillik yog'in miqdori, taqsimoti va vaqtining o'zgarishi, shuningdek, yer shari haroratining yil sayin oshishi makkajo'xori yetishtirishni yanada beqarorlashtirmoqda [5;6]. Bunga rivojlanayotgan mamlakatlarda sug'orishni kengaytirish uchun imkoniyat va resurslar cheklanganligi ham kuchli ta'sir o'tkazmoqda [7]. Qurg'oqchilikka chidamlilikni yaxshilash va hosil sifati va miqdorining barqarorligini ta'minlash uchun zamonaviy fan yutuqlaridan foydalanish global ishlab chiqarishni barqarorlashtirishning muhim qismidir. Shu sababli qurg'oqchilik stressiga chidamliligi va suvdan foydalanish samaradorligi yuqori bo'lgan makkajo'xori

navlarini ishlab chiqish ham xususiy, ham davlat sektorida yirik naslchilik dasturlari uchun ustuvor vazifaga aylandi.

Adabiyotlar tahlili

Qurg'oqchilikka chidamli ekinlarni barqaror yetishtirish ko'proq oziq-ovqat va yoqilg'iga muhtoj bo'lgan o'sib borayotgan insoniyat talabini qondirishning bir usuli hisoblanadi. Qurg'oqchilikka chidamlilik asosidagi fiziologik jarayonlar hamda metabolitik tarmoqlar murakkab va ko'pincha ularni aniqlash qiyin[8; 9]. So'ngi yillarda makkajo'xorining qurg'oqchilik sharoitidagi morfo-biologik hamda molekulyar o'zgarishlarini tadqiq qilishga oid bir qator muhim tadqiqotlar amalga oshirildi. Xususan, Habben va boshqalarning tadqiqotlari natijisida, transgen makkajo'xori o'simliklarida 1-aminotsiklopropan-1-karboksil kislotasi sintaza 6 genining faoliyatini to'xtatish tufayli etilen biosintezini kamaytirish qurg'oqchilik stressi sharoitida don hosilini yaxshilashi aniqlandi [10]. Shi va boshqalar makkajo'xorining etilenga sezgirlikni pasaytirish orqali ham stress sharoitida yuqori hosilga erishish mumkinligi tajribalar asosida ko'rsatib berdi[11]. Shuningdek, Shi va boshqalar hamda Guo va boshqalarning tadqiqotlari etilen signalining uzatilishini modulyatsiya qiluvchi va etilen reaksiyasining salbiy regulyatorlari hisoblangan ARGOS genlarini ekspressiyasini ortishi transgen makkajo'xori o'simliklarida qurg'oqchilikka chidamlilikni yaxshilashini ko'rsatdi [11;12].

Transgen yondashuvdan tashqari, don hosildorligini oshirish uchun makkajo'xori yetishtirish dasturlarida qurg'oqchilikka chidamlilikka ta'sir qiluvchi xususiyatlarning tabiiy genetik o'zgarishi ham qo'llanilgan. Aniq fenotiplash va molekulyar markerlarni qo'llash, shuningdek miqdoriy belgilarning genetik arxitekturasini tushunish orqali makkajo'xori seleksionerlari qurg'oqchilik sharoitida g'alla hosildorligi oshgan duragaylarni (AQUAmax) ishlab chiqdilar [13;14]. Ushbu duragaylardagi qurg'oqchilikka chidamlilik alohida kichik ta'sirga ega bo'lgan bir nechta genlar tomonidan boshqariladi. Ehtimol, ushbu asosiy genlarning ba'zilar kattaroq ta'sir ko'rsatishi uchun yangi allellarni aniqlashda o'zgartirilishi va seleksiya jarayonini kuchaytirishi mumkin. Biroq, yaqin

vaqtgacha fizik yoki kimyoviy ta'sirlar sabab bo'lgan mutagenез bilan bunday allel o'zgaruvchanlikni yaratish tasodifiy jarayon bo'lib, maqsadli lokusda mo'ljallangan DNK ketma-ketligini o'zgartirishni qiyinlashtirdi. So'nggi bir necha yil ichida DNK ketma-ketligini tez va aniq manipulyatsiya qilish imkonini beruvchi va asosiy genlarni tabiiy xromosoma kontekstida tahrirlash orqali qurg'oqchilikka chidamli germoplazmani rivojlantirish uchun zamin yaratadigan samarali genomni tahrirlash texnologiyalari paydo bo'ldi.

O'simliklardagi aniq molekulyar genetik o'zgarishlarni vujudga keltirishda meganukleazalar, ruh-barmoq nukleazalari (ZFN), transkripsiya faollashtiruvchisiga o'xshash effektor nukleazalar (TALEN) va klasterlangan muntazam intervalli qisqa polindromik takrorlar (CRISPR) kabi genomni tahrirlash vositalari ko'plab tadqiqotchilar tomonidan samarali qo'llanilgan [15; 16; 17; 18]. Bular orasida CRISPR-Cas9 tizimi qo'llanilishi eng oson va yuqori samarali hisoblanadi. Tizim *Streptococcus pyogenes* dan olingan Cas9 endonukleazasi va Cas9 ni genomdagi maqsadli DNK ketma-ketligiga yo'naltiruvchi ximerik yagona yo'naltiruvchi RNKdan iborat. CRISPR-Cas9 genomini tahrirlash Cas9 orqali maqsadli lokusda DNKning ikki zanjirli uzilishini kiritish, so'ngra endogen noaniq gomologik bo'lmagan so'nggi birlashma (NHEJ) yoki yuqori aniqlikdagi gomologiyaga yo'naltirilgan tuzatish (HDR) orqali DNKni ta'mirlash yo'llari orqali amalga oshiriladi. Tizim makkajo'xori, bug'doy, guruch va soya kabi asosiy qishloq xo'jaligi ekinlarida muvaffaqiyatli sinovdan o'tkazilgan [19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30]. Ma'lum makkajo'xori tarkibida endogen ARGOS8 mRNK ekspressiyasi nisbatan past. Transgen o'simliklarda ARGOS8 ning haddan tashqari ko'p ekspressiyalanishi qurg'oqchilik stressi sharoitida hosildorlikni oshiradi [11].

Bizning ushbu tadqiqotimiz doirasida, makkajo'xorining bir vaqtning o'zida, qurg'oqchilikka, sho'rhoklikka va sovuq iqlim sharoitiga javob beruvchi qator genlari, xususan, Eskimo-1genini CRISPR-Cas9 texnologiyasi asosida "o'chirish" orqali O'zbekistonning makkajo'xori yetishtirishda noqulay bo'lgan suv tanqisligi kuzatiladigan mintaqalarida yangi makkajo'xori navlarini takomillashtirish

rejalashtirilgan. Buning uchun genlar bazasidan makkajo'xorining qator genlari va Eskimo-1 geni nukleotidlar ketma-ketligi aniqlandi va ular asosida gRNKlar dizayn qilinib, sintezlash uchun Integrated DNA Technologies (IDT) kompaniyasiga buyurtma berildi. Ushbu gRNKlar yordamida CRISPR/Cas9 texnologiyasiga asoslangan genetik konstruksiyalar tuziladi va *Agrobacterium tumefaciens* hujayrasiga transformatsiya qilindi.

TADQIQOT METODOLOGIYASI

Genetik konstruksiyani makkjo'xori xujayrasiga kiritishda *Agrobacterium tumefaciens*ning LBA4404 shtamidan foydalanildi. Transformatsiya jarayoni Hensel va boshqalar (2009) tomidan ta'riflangan usul yordamida amalga oshirildi. Transgen o'simliklardagi mutatsiyalarni aniqlashda PZR, gel elektroforez va sekvenslash usullaridan foydalanildi. O'simlik materillari sifatida makkajo'xorining "Hi II" liniyasi ishlatildi. Transgen o'simlik olishning barcha bosqichlarida ishlatilgan ozuqalar tarkibi 1-jadvalda keltirilgan.

1-jadval.

Transgen o'simlik olishda qo'llanilgan ozuqa muhitlari va ularning tarkibi

Ozuqa muhiti	Ozuqa muhitining tarkibi
Inokulatsiya ozuqasi (IM)	4 g/L Chu N6; salt mixture; 4 mg/L Chu; N6 vitamins; 0.7 g/L L-Proline; 1.5 mg/L 2,4-D; 36 g/L Glucose; 68.4 g/L Sucrose; 100 µM Acetosyringone, (pH =5.2)
Co-cultivatsiya ozuqasi (CCM)	2 g/L Chu N6 salt mixture; 2 mM CaCl ₂ ; 112 mg/L B5 vitamins; 0.4 g/L L-Cysteine; 2.9 g/L L-Proline; 4.4 mg/L Dicamba; 37.6 g/L Maltose·H ₂ O; 100 µM Acetosyringone; 1 mM DTT; 0.5 g/L MES; (pH =5.8,) 4 g/L-1 Phytigel
Callus induksiya ozuqasi (CIM)	4 g/L Chu N6 salt mixture; 2 mM CaCl ₂ , 5 µM silver nitrate; 112 mg/L B5 vitamins; 2.9 g/L L-Proline; 4.4 mg/L Dicamba; 34.2 g/L Sucrose; 0.1 g/L- Casein hydrolysate; 0.5 g/L- MES; (pH =5.8); 4 g/L- Phytigel; 150 mg/L- Timentin
Kurtak hosil qiluvchi ozuqasi (RM)	4.3 g/L- MS minerals; 2 mM CaCl ₂ ; 103.1 mg/L- MS vitamins; 60 g/L-Sucrose; 0.1 g/L-Myo-inositol, (pH =5.8); 3 g/L-Phytigel; 75 mg/L-Timentin

TAHLILLAR VA NATIJALAR

Makkajo'xori "Hi II" liniyasining urug'lari kichik tuvaklarga ekildi va 3 hafta davomida 20-22 °C haroratda 13:11 (yorug'lik:qorong'ulik) fotoperiodik muhitda o'stirildi. Shundan so'ng yosh nihollar issiqxonada o'stirish uchun tuproqqa o'tkazildi va so'ta hosil qilgunga qadar issiqxonada parvarish qilindi. O'simliklar gullab, changchilari yetilganidan so'ng sun'iy changlantirildi.

Makkajo'xori yetilmagan embrionlarini ajratib olish.

Makkajo'xori so'talari changlantirilganidan 12-14 kun o'tgach, so'talar yig'ib olindi va tashqi meva qobig'i olib tashlanib 70% spirt (5-minut) va natriy gipoxlorid eritmasida sterilizatsiya qilindi. Sterilizatsiyadan so'ng so'talar distillangan, sterillangan suv bilan 4-5 marta yuvildi. Laminar ichida so'talardan embrion disklar (uzunligi 1.5-2.5mm) skalpel yordamida ajratib olinib IM ozuqa muhitida saqlandi.

Agrobakteriyalarni o'strish va yetilmagan embrionlarni zararlash.

A. tumefaciens tarkibida 100 mg/L spektinamitsin bo'lgan LB qattiq ozuqa muhitida 2-3 kun davomida 21°C xaroratli inkubatorida o'strildi. Transformatsiya kuni qattiq ozuqadan Agrobakteriya kollarari shpatel yordamida yig'ib olinib IM suyuq ozuqa muhitida harorati 21 °C bo'gan inkubatorida 3 soat davomida inkubatsiya qilindi. OD₆₀₀ 0.7 ga keltirildi. Inokulyatsiya uchun yetilmagan embrionlarni IM suyuq ozuqa muhitida bir marta yuvib olindi. Embrion diskleri ustiga avvalgan tayyorlab olingan Agrobakteriya eritmasidan 1 ml qo'shib 15-minut xona haroratida, vaqti-vaqti bilan chayqatib inkubatsiya qilindi. So'ngra namunalar yuzasida agrobakteriyani o'sishini oldini olish maqsadida yetilmagan embrion diskleri filtr qog'ozga qo'yib ortiqcha namlik olib tashlandi va Co-cultivatsiya ozuqa muhitiga (CCM) o'tkazilib 3 kun davomida harorat 21°C qorog'u sharoitda inkubatsiya qilindi.

Kallus hosil qilish, regeneratsiya va ildiz hosil qilish.

Co-cultivatsiya bosqichidan so'ng yetilmagan embrion diskleri callus induksiya ozuqa muhitida (CIM) 7 kun davomida 24°C haroratli qorog'u sharoitda saqlandi. Keyingi bosqichda 14 kun davomida tarkibida selektiv

antibiotik bo'lgan CCM qattiq ozuqa muhitida saqlanadi. Shu holatda kallus hosil bo'lgunga qadar (3 oy) har 14 kunda ozuqa muhiti almashtirilib turiladi.

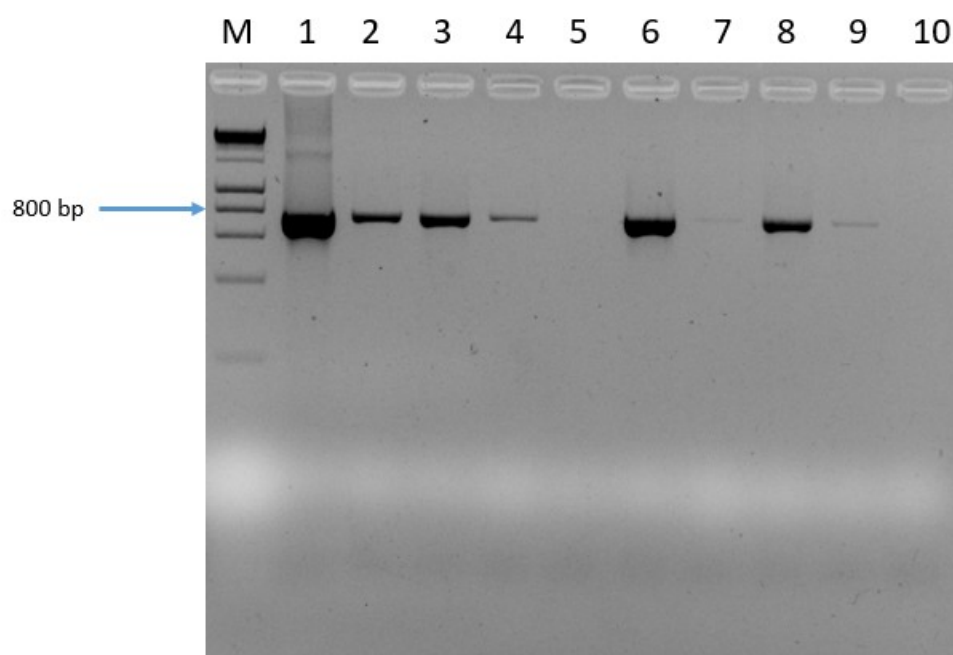
Kalluslar orasidan dastlabki somatik embrionlar hosil bo'lishni boshlaganida embrionlarni kurtak hosil qiluvchi qattiq ozuqa muhitiga (RM) o'tkazildi. Embrionlar avvaliga 7 kun qorong'u sharoitda, so'ngra yana 7 kun 16/8 fotoperiodik tizimli muhitda saqlandi. O'simliklar rivojlanishi bilan ozuqa idishlari yirikroqlariga almashtirildi. O'simlik bo'yi 10 sm ga yetganida tuproqqa ko'chirildi tashqi muhit sharoitiga moslashtiriladi (1-rasm).



1-rasm. Somatik embriogenez natijasida hosil bo'lgan o'simlilar

Transgen o'simliklardagi mutatsiyalarni aniqlash

Somatik embriogenezdən olinga o'simliklardan CTAB usuli yordamida genom DNKsi ajratildi. Konstruksiya tarkibidagi Cas9 oqsili sintezi uchun javobgar genga maxsus praymerlar bilan PZR reaksiyasini o'tkazildi. Gel



elektroforez usuli yordamida PZR reaksiyasining natijasini tahlil qilish orqali dastlabki taxminiy transgen o'simliklar saralab olindi (2-rasm). Saralab olingan o'simliklarning Eskimo1 genidagi mutatsiyalar maxsus praymerlar vositasida SeqStudio qurilmasi yordamida sekvenslash orqali aniqlandi.

2-rasm. Cas9 oqsili sintezi uchun javobgar genga maxsus praymerlar bilan o'tkazilgan PZR reaksiyasining elektrofaragrammasi. M-hyperladder 1kb; 1-musbat nazorat (plazmid DNK); 2- T₀37_1; 3- T₀37_2; 4- T₀37_3; 5- T₀37_4; 6- T₀37_5; 7- T₀37_6; 8-kallus to'qimasi 9- ildiz to'qimasi 10- manfiy nazorat

Adabiyotlar

1. Shiferaw B., Prasanna B. M., Hellin J., Bänziger M. (2011). Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Secur.* 3 (3), 307–327. 10.1007/s12571-011-0140-5
2. Shiferaw B., Prasanna B. M., Hellin J., Bänziger M. (2011). Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Secur.* 3 (3), 307–327. 10.1007/s12571-011-0140-5
3. Shiferaw B., Prasanna B. M., Hellin J., Bänziger M. (2011). Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Secur.* 3 (3), 307–327. 10.1007/s12571-011-0140-5
4. Liu S., Qin F. (2021). Genetic dissection of maize drought tolerance for trait improvement. *Mol. Breed.* 41, 8. 10.1007/s11032-020-01194-w
5. IPCC (2012). “Changes in climate extremes and their impacts on the natural physical environment,” in *Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation*. Editors Field C. B. B. V., Stocker T. F., Qin D., Dokken D. J., Ebi K. L., et al. (Cambridge, England: Cambridge University Press;)
6. Meseka S., Menkir A., Bossey B., Mengesha W. (2018). Performance assessment of drought tolerant maize hybrids under combined drought and heat stress. *Agronomy* 8, 274. 10.3390/agronomy8120274
7. World Bank (2005) Agriculture Investment Sourcebook. Agriculture and Rural Development. World Bank, Washington DC.
8. Hays, D.B., Do, J.H., Mason, R.E., Morgan, G. and Finlayson, S.A. (2007) Heat stress induced ethylene production in developing wheat grains induces kernel abortion and increased maturation in a susceptible cultivar. *Plant Sci.* 172, 1113–1123.
9. Kawakami, E.M., Oosterhuis, D.M. and Snider, J.L. (2010) Physiological effects of 1-methylcyclopropene on well-watered and water-stressed cotton plants. *J. Plant Growth Regul.* 29, 280–288
10. Habben, J.E., Bao, X., Bate, N.J., DeBruin, J.L., Dolan, D., Hasegawa, D., Helentjaris, T.G. et al. (2014) Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions. *Plant Biotechnol. J.* 12, 685–693.
11. Shi, J., Habben, J. E., Archibald, R. L., Drummond, B. J., Chamberlin, M. A., Williams, R. W., et al. (2015). Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both *Arabidopsis* and maize. *Plant Physiol.* 169, 266–282. doi: 10.1104/pp.15.00780

12. Guo, M., Rupe, M.A., Wei, J., Winkler, C., Goncalves-Butruille, M., Weers, B.P., Cerwick, S.F. et al. (2014) Maize ARGOS1 (ZAR1) transgenic alleles increase hybrid maize yield. *J. Exp. Bot.* 65, 249–260.
13. Cooper, M., Gho, C., Leafgren, R., Tang, T. and Messina, C. (2014) Breeding drought-tolerant maize hybrids for the US corn-belt: discovery to product. *J. Exp. Bot.* 65, 6191–6204.
14. Gaffney, J., Schussler, J., Loffler, C., Cai, W., Paszkiewicz, S., Messina, C., € Groeteke, J. et al. (2015) Industry scale evaluation of maize hybrids selected for increased yield in drought stress conditions of the U.S. Corn Belt. *Crop Sci.* 55, 1608–1618.
15. Gao, H., Smith, J., Yang, M., Jones, S., Djukanovic, V., Nicholson, M.G., West, A. et al. (2010) Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant J.* 61, 176–187.
16. Li, T., Liu, B., Spalding, M.H., Weeks, D.P. and Yang, B. (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat. Biotechnol.* 30, 390–392.
17. Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.C., DeKever, R.C., Moehle, E.A., Worden, S.E., Mitchell, J.C. et al. (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 459, 437–441
18. Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Sun, S., Wu, C., Jiang, B., Han, T. et al. (2015) CRISPR/ Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS ONE*, 10, e0136064.
19. Du, H., Zeng, X., Zhao, M., Cui, X., Wang, Q., Yang, H., Cheng, H. et al. (2016) Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *J. Biotechnol.* 217, 90–97.
20. Jacobs, T.B., LaFayette, P.R., Schmitz, R.J. and Parrott, W.A. (2015) Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol.* 15, 16.
21. Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B. and Weeks, D.P. (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41, e188.
22. Liu, Y., Qin, L., Han, L., Xiang, Y., and Zhao, D. (2015). Overexpression of maize SDD1 (*ZmSDD1*) improves drought resistance in *Zea mays* L. by reducing stomatal density. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 122, 147–159. doi: 10.1007/s11240-015-0757-8
23. Liang, Z., Zhang, K., Chen, K. and Gao, C. (2014) Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J. Genet. Genom.* 41, 63–68.
24. Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., Guo, X. et al. (2016) Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol. Plant*, 9, 628– 631.

25. Svitashhev, S., Young, J.K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S.C. and Cigan, A.M. (2015) Targeted mutagenesis, precise gene editing and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol.* 2, 931–945.
26. Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. and Qiu, J.L. (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* 32, 947–951.
27. Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., 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.
28. Zhou, H., Liu, B., Weeks, D.P., Spalding, M.H. and Yang, B. (2014) Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res.* 42, 10903–10914.
29. Zhou, J., Peng, Z., Long, J., Sosso, D., Liu, B., Eom, J.-S., Huang, S. et al. (2015) Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J.* 82, 632–643
30. Hensel G, Kastner C, Oleszczuk S, Riechen J, Kumlehn J. *Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize.* *Int J Plant Genomics.* 2009;2009:835608. doi: 10.1155/2009/835608. Epub 2009 Jun 21. PMID: 19584907; PMCID: PMC2699555.