

# MODIFICACIÓN GENÉTICA DE VARIEDADES ARGENTINAS DE ARROZ CON *Agrobacterium*

MARIANA P. LÓPEZ; H.O. GHIGLIONE; MARÍA A. LINARES FIGUEROA y J.A. CURÁ<sup>1</sup>

Recibido: 09/04/02

Aceptado: 27/01/03

## RESUMEN

Un sistema muy utilizado en la transformación genética de plantas se basa en el uso de *Agrobacterium*, que posee un plásmido denominado Ti. El ADN-T de dicho plásmido es transferido a la planta huésped donde se integra al genoma de la misma. El objetivo de este trabajo fue la obtención de callos de arroz derivados de escutelo modificados genéticamente. Para la técnica de transferencia génica se utilizaron las cepas GV3101 y AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* llevando el plásmido pCRGL. Mediante transformación con la cepa GV3101 se obtuvieron callos transformados de las variedades Don Juan INTA, El paso 144 y Yerúa. Esta última fue la única que se pudo transformar con la cepa AGL1. Para comprobar el éxito de la transformación se procedió a la amplificación por PCR de un fragmento específico de ADN genómico de los callos y también su análisis mediante Southern blot. Se demostró la factibilidad de modificar el genoma del arroz mediante el uso de *A. tumefaciens* considerando las variedades y cepas bacterianas a utilizar para tal fin.

**Palabras clave.** Arroz, *Agrobacterium tumefaciens*, OGM.

## GENETIC MODIFICATION OF ARGENTINEAN RICE VARIETIES BY *Agrobacterium*

### SUMMARY

A very well-known system for plant genetic transformation is based on *Agrobacterium* which carries a plasmid denominated Ti. The T-DNA from this plasmid is transferred to the host plant where it integrates in its genome. The aim of this work was to obtain calli derived from scutella of rice genetically modified. Strains GV3101 and AGL1 of *Agrobacterium tumefaciens* carrying the plasmid pCRGL were used for the genetic transference. Calli transformed from Don Juan INTA, El paso 144 and Yerúa varieties were obtain with the strain GV3101. Yerúa was also transformed with the strain AGL1. To prove the success of the transformation, a specific fragment of genomic DNA from calli was amplified by PCR and analyzed by Southern blot. It is been demonstrated the feasibility to modify rice genome using *A. tumefaciens* considering varieties and strains to accomplish it.

**Key words.** Rice, *Agrobacterium tumefaciens*, GMO.

### INTRODUCCIÓN

La manipulación genética de plantas ha sido practicada exitosamente durante cientos de años. Los fitomejoradores desarrollaron esquemas de cruzamiento de plantas para introducir y mantener caracteres deseables en líneas endocriadas y los rendimientos en granos como maíz y trigo han crecido firmemente durante los últimos 60 años. Sin embargo, los métodos clásicos de mejoramiento vegetal son lentos y limitados para algunos objetivos.

Las técnicas del ADN recombinante prometen superar estas limitaciones permitiendo a los genetistas identificar y clonar genes específicos para caracteres deseables, tales como resistencia a un pesticida, e introducirlos dentro de plantas actualmente útiles. La incompatibilidad sexual, una limitante en el cruzamiento convencional entre dos líneas, se vuelve irrelevante y el proceso se hace más rápido porque las plantas transgénicas que expresen el gen pueden seleccionarse directamente (Watson *et al.*, 1992).

<sup>1</sup>Cátedra de Bioquímica - Facultad de Agronomía, UBA-CONICET. Av. San Martín 4453 (C1417DSE) - Buenos Aires - ARGENTINA. E-mail: acura@mail.agro.uba.ar

Una vez aislado el gen de interés es necesario clonarlo en el ADN-T. Un problema asociado con las técnicas genéticas que utilizan plásmidos Ti de *Agrobacterium* es que éstas moléculas son grandes (aproximadamente 200.000 pb) y por lo tanto difíciles de manipular *in vitro* (Grierson y Covey, 1991).

Esto se ha resuelto, en parte, mediante el uso del sistema del vector binario. Este sistema consiste de dos plásmidos: el vector y el plásmido *vir* (virulencia). El vector contiene la región que va a ser transferida a las plantas (ADN-T). Es pequeño, fácil de manipular y se replica en *E. coli* y *Agrobacterium*. El plásmido *vir* es un plásmido Ti construido que carece de la región T pero contiene todas las funciones *vir* requeridas para la transferencia del ADN-T. Cuando ambos plásmidos están presentes en la misma célula de *Agrobacterium*, los genes codificados en el plásmido *vir* inducirán la transferencia del ADN-T hacia las células de las plantas (Hajdukiewicz *et al.*, 1994).

Aunque los métodos que utilizan *Agrobacterium* para la transformación genética de plantas superiores han sido bien descriptos para especies dicotiledóneas no ha sido así para las monocotiledóneas, excepto en algunos pocos casos (Bytebier *et al.*, 1987).

Si bien el arroz como especie monocotiledónea presenta limitaciones a la transformación con *Agrobacterium*, Yukoh *et al.* (1994) afirman haber producido plantas transformantes de arroz con una eficiencia similar a aquella obtenida con dicotiledóneas mediante el co-cultivo de callos derivados del escutelo de semillas de arroz con *A. tumefaciens*.

El objetivo del presente proyecto consistió en la obtención de callos genéticamente modificados de variedades de arroz de importancia agrícola en la producción argentina mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*.

## MATERIALES y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron tres variedades comerciales de arroz (*Oryza sativa* L.): Don Juan INTA, El Paso 144 y Yerúa.

### Cepas bacterianas

Fueron utilizadas dos cepas diferentes de *Agrobacterium tumefaciens*: AGL1 (supervir, onc<sup>-</sup>, Rif<sup>r</sup>, rec) (Lazo *et al.*, 1991) y GV3101 (supervir, onc<sup>-</sup>, Gen<sup>r</sup>). Se contó también con la cepa JM 109 de *Escherichia coli*

(endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17, relA1, supE44, F<sup>r</sup>, traD36, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI) de Promega.

### Plásmidos

El vector pPZP122 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) de 8.626 pb fue utilizado para la construcción del sistema binario. La región ADN-T del mismo posee 2.572 pb, la cual contiene un gen que otorga resistencia al antibiótico gentamicina a la planta. Dentro de dicha región posee un sitio de múltiple clonaje (SMC) adyacente al Borde Derecho (BD) que flanquea al ADN-T. El SMC se encuentra dentro del péptido alfa del operón LacZ permitiendo que insertos de ADN en el mismo puedan ser identificados por la falta de color azul sobre un medio que contenga X-Gal. Los vectores pPZP se replican en alto número de copias en *E. coli* (alrededor de 200 por célula) utilizando el origen de replicación ColE1 del plásmido pBR322, en cambio en menor número (de 3 a 5) en *Agrobacterium* usando el origen de replicación de un amplio rango de hospedantes del plásmido pVS1 (Deblaere *et al.*, 1987).

El inserto que se introdujo al SMC fue un fragmento *HindIII/EcoRI* de 3.000 pb que se movilizó desde el pBI221 (CLONTECH). Este fragmento posee la región promotora de CaMV 35S, la región codificante del gen *gusA* (GUS) de 1.806 pb y la región terminadora del gen de la nopalina Sintasa (NOS). La expresión del gen GUS en células y tejidos de plantas es un excelente indicador para la identificación de la transformación. De esta manera se obtuvo el plásmido pPZP122::35SCaMV::GUS::NOS, al cual denominamos pCRGL (López, 2001) (Figura 1).

### Transformación de *E. coli*

Una vez obtenido el plásmido pCRGL, se procedió a la transformación de *E. coli* JM109 siguiendo con la metodología descrita por Ausubel *et al.* (1994). La suspensión de células transformadas fue alicuotada en placas con LB conteniendo 24 µg ml<sup>-1</sup> de cloranfenicol, 20 mM de IPTG y 40 mg ml<sup>-1</sup> de X-Gal. Las colonias aisladas que resultaron de color blanco fueron cultivadas en medio LB suplementado con el mismo antibiótico. Se extrajo el ADN plasmídico de los cultivos crecidos en esas condiciones y se verificó la presencia del plásmido pCRGL.

### Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Las cepas AGL1 y GV3101 fueron transformadas usando el mismo protocolo. Con células competentes de las cepas AGL1 y GV3101 de *A. tumefaciens*, se procedió a la electroporación de las mismas siguiendo el protocolo de Mattanovich *et al.* (1989). Alicuotas de la suspensión bacteriana fueron plaqueadas en medio LB conteniendo 50 µg ml<sup>-1</sup> de rifamicina y 24 µg ml<sup>-1</sup> de

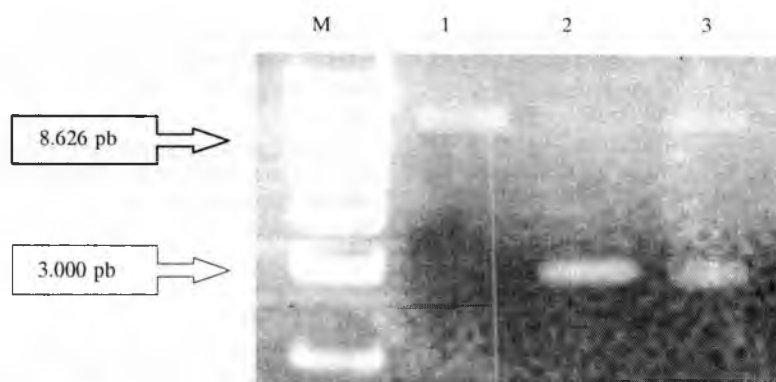


FIGURA 1. Productos de la digestión de *EcoRI* y *HindIII* en un gel de agarosa 1,0%. M: marcadores 1 kb DNA Ladder; 1: pZP122; 2: fragmento 35SCaMV::GUS::NOS del pBI221; 3: pCRGL.

cloranfenicol para la cepa AGL1 y 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de gentamicina y 24  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de cloranfenicol en el caso de la cepa GV3101. Luego de 48 h de incubación a 28 °C se determinó la eficiencia de transformación, la que resultó ser baja ya que se obtuvieron 274 colonias  $\mu\text{g ADN}^{-1}$  de AGL1 y 233 colonias de GV3101  $\mu\text{g ADN}^{-1}$ . Se seleccionaron algunas colonias al azar, se les extrajo ADN mediante Plasmid Mini Preparation (Sambrook *et al.*, 1989) y posteriormente se amplificó por PCR el ADN plasmídico extraído y de suspensiones de colonias tomadas al azar. De esta manera se pudo establecer la presencia del inserto en las células transformantes mediante el análisis de los productos obtenidos por PCR en un gel de agarosa 1,4% en TAE el ADN plasmídico extraído a seis de las colonias anteriores tomadas al azar, fue luego digerido con *EcoRI* y *HindIII*. Los productos de la digestión fueron separados en un gel de agarosa 1,0% en TAE.

#### Cultivo y transformación de callos de arroz

El cultivo de los callos derivados de escutelo se realizó siguiendo la metodología propuesta por Yukoh *et al.* (1994). Se esterilizaron superficialmente semillas de arroz durante 20 min con 33% (v/v) de lavandina comercial (55 g Cl<sub>1</sub><sup>-1</sup>) y 0,1% de Tritón X-100, seguido por varios lavados con agua destilada estéril. Estas fueron sembradas en frascos de 170 ml conteniendo cada uno 20 ml de 2N6 (Cuadro N° 1). Allí fueron mantenidas durante cuatro semanas en oscuridad a 25  $\pm$  2 °C.

Transcurrido este período, los callos se dividieron en porciones de aproximadamente 1-2 mm y cultivados durante cuatro semanas en 2N6L en las mismas condiciones ambientales, renovando el medio semanalmente.

Luego se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de un cultivo de las cepas AGL1 ó GV3101 conteniendo el plásmido pCRGL incu-

CUADRO N° 1. Medios utilizados en el cultivo de tejidos de arroz.

Medio	Composición
2N6	Macronutrientes N6, micronutrientes N6, vitaminas N6, 1 g l <sup>-1</sup> casaminoácidos, 30 g l <sup>-1</sup> sacarosa, 2 mg l <sup>-1</sup> 2,4-D, 0.65% agar, pH 5.8.
2N6L	Medio 2N6 sin agar.
2N6-AS	Medio 2N6 más 10 g l <sup>-1</sup> glucosa y 100 $\mu\text{M}$ acetosiringona, pH 5.2 (Chu, 1978).
2N6-CG	Medio 2N6 más 250 mg l <sup>-1</sup> cefotaxima o carbenicilina y 50 mg l <sup>-1</sup> gentamicina.
AAM	Sales y aminoácidos AA (Toriyama y Hinata, 1985), vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962), 500 mg l <sup>-1</sup> casaminoácidos, 68.5 g l <sup>-1</sup> sacarosa, 36 g l <sup>-1</sup> glucosa, 100 $\mu\text{M}$ acetosiringona, pH 5.2.

bado toda la noche (ON) en LB conteniendo rifampicina o gentamicina, respectivamente, suplementado con acetosiringona y se disolvieron en 20 ml de medio AAM. Porciones friables de callo se sumergieron en el medio y se co-cultivaron durante 10-15 min. Posteriormente, se removieron los callos y fueron colocados en placas conteniendo 2N6-AS hasta la visualización de una fina capa bacteriana creciendo alrededor de los mismos.

Se procedió al lavado de los callos en una solución conteniendo 2N6 suplementado con 1 mg ml<sup>-1</sup> de cefotaxima durante 30 min, repetido dos veces. Por último, se los cultivó reiteradamente en 2N6-CG hasta eliminar la presencia de *A. tumefaciens*.

### Ensayo de actividad GUS

La expresión del gen GUS en callos de arroz se ensayó histoquímicamente de la manera descrita por Jefferson (1987) utilizando X-Gluc como sustrato. Las células que expresen el gen resultan de color azul oscuras.

### Amplificación de ADN por PCR

Los callos que resultaron resistentes a gentamicina y expresaron el gen GUS se analizaron mediante PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos:

50SCaMV: 5' – GAT GAC GCA CAA TCC CAC TATC – 3'

GUS5: 5' – CAC GGG TTG GGG TTT CTAC – 3'

Estos oligonucleótidos permitieron amplificar un fragmento de 144 pb que contenía partes de la región promotora del CaMV 35S y de la región codificante del gen *gusA*.

El programa de amplificación en el termociclador consistió en la desnaturalización del ADN durante 1 min a 95 °C; seguido de 30 ciclos de: 30 seg a 95 °C, 30 seg a 50 °C y 30 seg a 72 °C. Finalmente, 5 min a 72 °C.

### Southern blot

El ADN genómico de los callos se aisló usando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) o mediante el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983). Se digirieron 5 µg con *EcoRV* y se separaron electroforéticamente en agarosa. El resultado de la corrida se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Zeta-Probe®, Bio-Rad), la cual fue hibridada con el fragmento de 144 pb (Sambrook *et al.*, 1989). Dicho fragmento había sido purificado por la técnica de Glass Milk a partir de un gel de agarosa 1,4% que contenía el producto de la amplificación por PCR del plásmido pCRGL (Figura 2). Una vez purificado el fragmento, el mismo fue marcado con dATP-biotinilado siguiendo el protocolo de marcación de NEBlot-Phototope™ (New England BioLabs). La detección se realizó utilizando el kit Phototope®-Star Detection (New England Biolabs) y se expuso la membrana sobre una película Kodak X-Omat AR-5 durante 5 min y finalmente fue revelada.

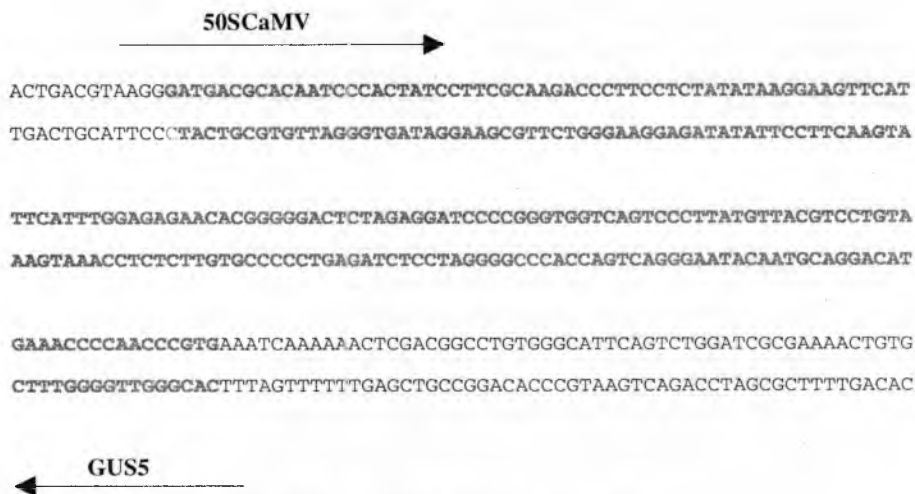


FIGURA 2. Secuencia de la sonda utilizada.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### Callos de arroz modificados genéticamente mediante *A. tumefaciens* cepa AGL1

El análisis histoquímico de la expresión del gen GUS se realizó mediante la técnica de Jefferson (1987), no observándose coloración azul en ninguna de las células. Una posible explicación a la falta de color podría deberse a que las células hayan envejecido y/o muerto con la consecuente falta de funcionalidad de los elementos celulares, imposibilitando la expresión del gen. Se observó que los callos presentaban una coloración parda y no blanca-amarillenta translúcida como la que presentan los que están en activo crecimiento. En gramíneas, la capacidad de diferenciación declina gradualmente a medida que aumenta el tiempo en cultivo (Nabors y Hooker, 1982).

Sin embargo, se procedió a la extracción del ADN genómico usando el DNeasy Plant Mini Kit para determinar mediante análisis por PCR si el ADN-T se había incorporado a las células vegetales. Los productos de la reacción de PCR fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa 1,4% (Figura 3). En la figura se puede destacar que Yerúa fue la única variedad en que se amplificó el fragmento de 144 pb correspondiente al gen foráneo introducido. La extracción del ADN mediante este kit permite asegurar que la amplificación corresponde al ADN genómico de la planta y no al bacteriano.

### Callos de arroz modificados genéticamente mediante *A. tumefaciens* cepa GV3101

Para determinar la expresión del gen GUS se tiñó el tejido vegetal usando X-Gluc (Jefferson, 1987). Los callos co-cultivados con *A. tumefaciens* cepa GV3101 sin el plásmido pCRGL (control negativo) no denotaron coloración. En cambio, en los callos co-cultivados con la cepa GV3101 conteniendo el plásmido pCRGL se pudo observar coloración azul en un alto porcentaje de ellos, no así en todas las células de los mismos.

Se pudieron detectar diferencias en cuanto a la calidad de los callos entre las variedades. Los callos de la variedad Yerúa mostraron mayor friabilidad, mientras que los de El Paso 144 y Don Juan INTA tenían una apariencia heterogénea dada por zonas pardas y otras translúcidas. Kamiya *et al.* (1988) en un estudio con 500 variedades de arroz demostraron que la formación de callos y la regeneración de plantas es altamente dependiente del genotipo. Además, las variedades índicas, como las que fueron utilizadas en este trabajo, muestran menor respuesta comparadas con las japónicas al cultivo *in vitro*. Con aquellos callos en activo crecimiento que resultaron resistentes al tratamiento selectivo con gentamicina y que expresaron el gen GUS, se procedió a la extracción del ADN genómico mediante la técnica de Dellaporta *et al.* (1983).

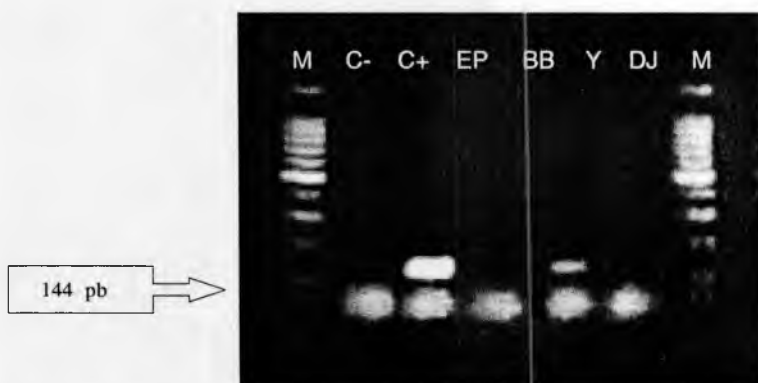


FIGURA 3. Amplificación de 400 ng de ADN genómico mediante PCR de callos de arroz co-cultivados con *A. tumefaciens* AGL1 transformado con el plásmido pCRGL. M: marcadores de 100 bp DNA Ladder; C-: control negativo; C+: control positivo; EP: El Paso 144; Y: Yerúa; DJ: Don Juan INTA.

Aproximadamente 400 ng de ADN purificado, se utilizaron para la amplificación por PCR de las muestras con los oligonucleótidos específicos. Los productos de la reacción fueron analizados en un gel de agarosa 1,4% (Figura 4). Se observó que en las tres variedades se amplificó un fragmento de 144 pb. Esto coincide con los datos aportados por la tinción histoquímica. Por lo tanto, se habrían obtenido probables callos transformantes. Comparando los resultados obtenidos con la cepa AGL1 transformada con el plásmido pCRGL, se obtuvieron callos transformados a partir de las tres variedades utilizando la cepa GV 3101 llevando el mismo plásmido. Aunque una notable diferencia en la producción de callos resistentes a higromicina fue observada por Cheng *et al.* (1998) entre diferentes cepas de *Agrobacterium* y variedades de arroz, esta podría no estar atribuida simplemente a un solo factor tal como genotipo o a la combinación plásmido/cepa de *Agrobacterium*.

Finalmente, para confirmar la presencia del inserto en los callos, se llevó a cabo un análisis de Southern blot. Se digirieron con *EcoRV* 5 µg de

ADN genómico de cada una de las muestras y se separaron electroforéticamente durante 5 h en un gel de agarosa de 0,8% en TAE. Luego se procedió a la desnaturalización del ADN y a su transferencia capilar a la membrana de nylon (Zeta-Probe®, Bio-Rad). Se llevó a cabo la detección de los posibles insertos utilizando la sonda de 144 pb. Es importante destacar que en las tres variedades utilizadas se pudo observar integración del ADN-T al genoma de los callos (Figura 5). El patrón de hibridación de los transformantes primarios muestra una única banda de aproximadamente 700 pb. El resultado es coherente con el valor previsto ya que la enzima *EcoRV* libera fragmentos de diversos tamaños, entre ellos, uno de 689 pb que debería hibridar con la sonda ya que contiene el fragmento del cual se obtuvo esta última.

#### CONCLUSIONES

Es indudable el gran interés actual en el uso de las técnicas de ADN recombinante para lograr objetivos tales como la obtención de variedades to-

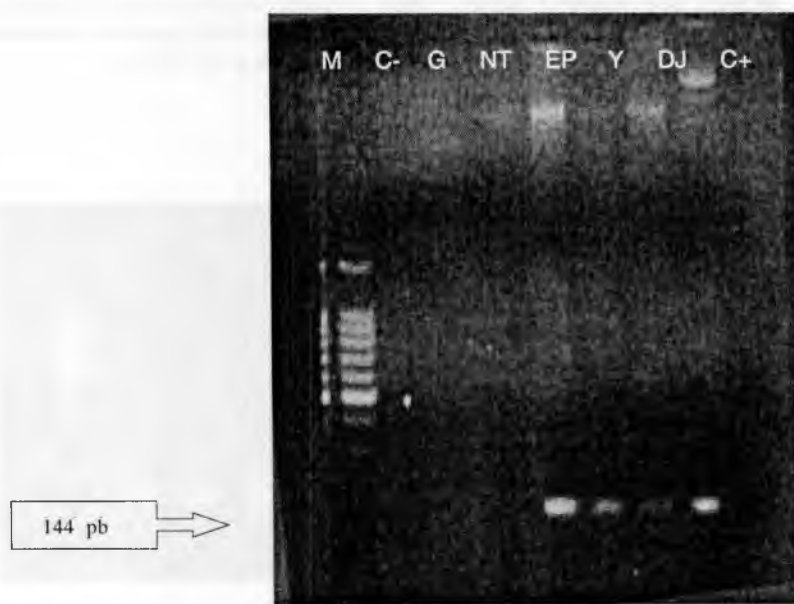


FIGURA 4. Amplificación mediante PCR de ADN genómico de callos de arroz transformados y sin transformar con GV3101. M: marcadores; C-: control negativo; G: ADN plasmídico de GV3101 sin el plásmido pCRGL; NT: no transformado; EP: El paso 144; Y: Yerúa; DJ: Don Juan INTA; C+: control positivo.



FIGURA 5. Análisis mediante "Southern blot" de ADN genómico de callos de arroz (5µg) digeridos con *EcoRV* hibridado con la sonda de 144 pb. Y: Yerúa; EP: El paso 144; DJ: Don Juan INTA; NT: no transformados.

lerantes a plagas, salinidad y anegamiento, resistentes a herbicidas, etc. El arroz es uno de los cereales más importantes del mundo e intensos esfuerzos se están llevando a cabo mediante la ingeniería genética para incrementar su rendimiento y mejorar su calidad. En el presente trabajo, se demostró que se puede modificar el genoma del arroz mediante el uso de *A. tumefaciens*, considerando especialmente las variedades y las cepas bacterianas a utilizar para tal fin.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Livore de la EEA INTA Concepción del Uruguay y al Sr. Juan Carlos Ruffini de La Arrocería Argentina S.A. por proveer las semillas. Al laboratorio del Dr. A. Theologis del PGEC, UC, Berkeley, USA por facilitarnos las cepas y plásmidos. Al Dr. Gerald Lazo de USDA, PWA, Albany, California, USA, por la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*.

#### BIBLIOGRAFÍA

- AUSUBEL F.M.; R. BRENT; R.E. KINGSTON; D.D. MOORE; J.G. SEIDMAN; J.A. SMITH and K. STRUHL. 1994. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- BYTEBIER B.; F. DEBOECK; H. DEGRAVE; M. Van MONTAGU and J.P. HERNALSTEENS. 1987. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of monocotyledon *Asparagus officinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 5345-5349.
- CHENG X.; R. SARDANA; H. KAPLAN and I. ALTOSAAR. 1998. Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 2767-2772.
- CHU CC. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Peking: Science Press. 43-50.
- DEBLAERE R.; A. REINAERTS; H. HOFTE; J.P. HERNALSTEENS; J. LEEMANS and M. Van MONTAGU. 1987. Vectors for cloning in plant cells. *Meth Enzymol.* 153: 277-292.
- DELLAPORTA S.; J. WOOD and J. HICKS. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- GRIERSON D. y S.N. COVEY. 1991. Biología Molecular de las Plantas. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. 243 p.
- HAJDUKIEWICZ P.; S. ZORA and M. PAL. 1994. The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology.* 25: 989-994.
- JEFFERSON R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS genes fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.



- KAMIYA M.; H. YAMANAKA and K. OONO. 1988. Intervarietal variations in somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* 4: 127-151.
- LAZO G.R.; P.A. STEIN and R.A. LUDWIG. 1991. A DNA Transformation-Competent *Arabidopsis* Genomic Library in *Agrobacterium*. *BioTechnology*. 9:963-967.
- LÓPEZ M.P. 2001. Trabajo de Intensificación para acceder al título de Ingeniero Agrónomo: "Modificación genética de arroz (*Oryza sativa* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*". Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.
- MATTANOVICH D.; F. RÜKER; A. DA CÁMARA MACHADO; M. LAIMER; F. REGNER; H. STEINKELLNER; G. HIMMLER and H. KATINGER. 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucleic Acid Research*. 17 (16): 6747.
- NABORS M. and T. HOOKER. 1982. Using spontaneously occurring and induced mutations to obtain agriculturally useful plants. *Bioscience*. 25: 761-768.
- SAMBROOK J.; E.F. FRITSCH and T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd. Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- TORIYAMA K. and K. HINATA. 1985. Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* 41: 179-183.
- WATSON J.D.; M. GILMAN; J. WITKOWSKI and M. ZOLLER. 1992. Recombinant DNA. Scientific American Books, New York. 626 p.
- YUKOH H.; O. SHOZO; K. TOSHIHIKO and K. TAKASHI. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*. 6 (2): 271-282.