

Un método de transformación genética de maíz para conferirle resistencia ulterior a enfermedades virales

Marta Valdez¹, Kenneth Madriz^{2,*} & Pilar Ramírez^{1,2}

¹ Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica; mvaldez@biologia.ucr.ac.cr.

² Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

* Dirección actual: Biotécnica Análisis Moleculares S. A.

Recibido 14-VII-2004. Corregido 02-IX-2004. Aceptado 02-IX-2004.

Abstract: A method for genetic transformation of maize for resistance to viral diseases. A system for the genetic transformation of maize was developed for two Costa Rican varieties: CR-7 and Diamantes 8843, that can allow the subsequent transfer of viral-derived genes in order to confer resistance to the disease caused by maize rayado fino virus (MRFV). The method is based on particle bombardment of organogenic calli derived from shoot tips. On the other hand, the molecular construction pRFcp-*bar*, containing the coat protein gene of MRFV and the marker gene *bar*, was elaborated. For the visual selection of the transformed material was used also the plasmid pDM803 that contains the reporter gene *uidA* (GUS). The results indicate that devices evaluated: the PIG (" Particle Inflow Gun ") and the Bio-Rad™ are both enough efficient to transfer foreign genes to the genome of the maize. Rev. Biol. Trop. 52(3): 787-793. Epub 2004 Dic 15.

Key words: *Zea mays*, Biotechnology, Genetic Transformation, Biolistics, maize rayado fino virus (MRFV).

Palabras clave: *Zea mays*, Biotecnología, Transformación Genética, Biobalística, virus del rayado fino del maíz (MRFV).

El maíz es uno de los tres cereales de mayor importancia en el mundo. Más de cuatrocientos millones de personas en América Central, México, África y Asia dependen de ese cultivo para su subsistencia. En países tropicales su productividad es baja debido en gran parte a enfermedades virales (FAO y CIMMYT 1997). En América Latina hay muchos virus que atacan el cultivo, siendo uno de los más importantes el virus del rayado fino del maíz (MRFV), descrito y caracterizado por Gámez (1969, 1983). A nivel molecular, su genoma fue clonado y secuenciado por Hammond y Ramírez (2001), quienes además desarrollaron métodos moleculares para el diagnóstico de la enfermedad. Este virus es transmitido exclusivamente por el insecto cica-délido *Dalbulus maidis* (DeLong y Wocott *vide* Gámez 1973), y ocasiona pérdidas de 40 a

50% en el peso de las mazorcas en cultivares criollos adaptados a las condiciones locales en Mesoamérica.

Los nuevos cultivares e híbridos desarrollados por los fitomejoradores son, no obstante, muy susceptibles al MRFV, donde las pérdidas pueden alcanzar el 100%. En varios estadíos de la enfermedad, la planta entera se marchita llegando hasta a morir (Gámez 1980). Es entonces, de fundamental importancia el introducir resistencia no convencional al MRFV en los cultivares de maíz que se siembran en América Latina y en Costa Rica para aumentar su producción, y reducir la aplicación de plaguicidas para el control del insecto vector del virus.

Las técnicas biotecnológicas modernas representan nuevas alternativas para el control de enfermedades virales. Algunas de esas

estrategias se basan en la expresión *in planta*, de genes virales o de secuencias derivadas del patógeno, mediante técnicas de ingeniería genética y de transformación genética (Madriz-Ordeñana 1999). Esta forma de resistencia se conoce como: “resistencia derivada del patógeno” (Sanford y Johnston 1985).

La expresión de la proteína de cubierta viral en plantas transgénicas es una estrategia que ha sido muy utilizada para conferir resistencia a enfermedades virales en muchos cultivos vegetales de importancia agrícola (Beachy *et al.* 1990). Algunos han sido liberados para el cultivo comercial. Estos incluyen tomates resistentes al virus del mosaico de tomate (ToMV) y al virus del mosaico del pepino (CMV), pepino resistente a CMV, calabaza resistente a virus del mosaico amarillo del zuchini (ZYMV) y al virus del mosaico de la sandía (WMV2), etc. (Lomonosoff 1995). Kogel *et al.* (1996), clonaron el gen de la proteína de cubierta del MRFV (*cpMRFV*), clon que luego fue utilizado en la elaboración de una construcción molecular que pudiese ser expresada en plantas transgénicas de maíz. O’Connor-Sánchez *et al.* (2002) desarrollaron un sistema muy eficiente de regeneración de plantas de genotipos tropicales de maíz, basado en la inducción de callos organo-embriogénicos derivados de ápices, para ser utilizado en experimentos de transformación genética por medio de biobalística. Es entonces de gran interés aplicar este método a los genotipos costarricenses de maíz, para conferirles resistencia a enfermedades virales y otras plagas.

El objetivo de la presente investigación fue desarrollar una metodología para la transformación genética de variedades costarricenses de maíz, utilizando genes marcadores como el gen *bar* y el gen reportero *GUS*, así como el gen *cpMRFV*, por medio del método de bombardeo con micropartículas (biobalística) y de técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro*, que permitan la transferencia ulterior del gen *cpMRFV* a su genoma para poder conferirle resistencia a la enfermedad ocasionada por el MRFV.

METODOLOGÍA

Se utilizó semillas de los genotipos costarricenses CR-5, CR-7 y Diamantes 8843, que fueron proveídas por la Oficina Nacional de Semillas de Costa Rica. Los métodos de desinfección de explantes, y de inducción de callos morfogénicos son similares a los descritos por O’Connor-Sánchez *et al.* (2002). Para la regeneración de plantas los callos se cultivaron en frascos de vidrio Gerber con medio MS (Murashige y Skoog 1962), sin reguladores de crecimiento, en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 12 h generado por lámparas fluorescentes blancas y rosadas para el crecimiento de plantas (2000 lux).

Por otro lado, se elaboró la construcción molecular que denominamos pRF*cp-bar*. Para ello se utilizó un fragmento de 580 pares de bases del gen de la cubierta proteica viral del MRFV regulado por el promotor constitutivo de la actina del arroz (McElroy *et al.* 1991) y con la secuencia de terminación del gen que codifica para la enzima ribulosa -1,5- difosfato carboxilasa oxigenasa (*rubisco*) (Gloria *et al.* 1984). Como gen marcador de selección, se incluyó el gen *bar* que codifica para la enzima fosfinotricina acetyl-transferasa (PAT) (Thomson *et al.* 1987), regulado por el promotor de la Ubiquitina I del maíz (Christensen *et al.* 1992) y la secuencia de terminación *nos* proveniente de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan *et al.* 1983). El gen *bar* contrarresta el efecto inhibidor de la fosfinotricina (PPT) sobre la glutamina sintetasa en las células vegetales, previniendo la acumulación de amoníaco y por ende la muerte celular. Así, la expresión de ese gen foráneo, permite la selección en un medio que contiene PPT de las células vegetales, en relación con aquellas que no lo poseen (Spencer *et al.* 1990). La Figura 1 muestra la construcción molecular final que fué utilizada para los experimentos de transformación genética del presente trabajo. El proceso de elaboración se describe en detalle en Madriz-Ordeñana (1999).

Para efectos de selección visual del material transformado se utilizó el plásmido

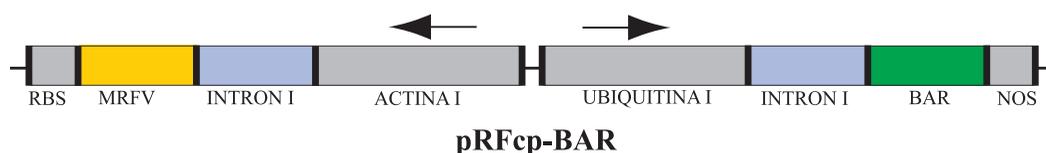


Fig. 1. Representación esquemática lineal de la construcción de ADN pRFcp-BAR.

Fig. 1. Schematic linear representation of ADN's construction for the transformation vector pRFcp-BAR.

pDM803 que contiene el gen reportero *uidA* (*GUS*) que codifica para la enzima β -glucuronidasa (Jefferson 1987), conjuntamente con el pRFcp-*bar*. Al pDM803 se le eliminó el gen *bar* ya que se encuentra también en el pRFcp-*bar* (Madriz-Ordeñana 1999). Ese plásmido fue cedido por los Laboratorios Carlsberg de Dinamarca. El método de preparación del ADN y de los microproyectiles de oro, es similar al presentado por Valdez *et al.* (1998).

La preparación de los explantes, así como las condiciones de mantenimiento de los callos de maíz, antes y después de la transferencia de genes, se realizó de acuerdo con los métodos desarrollados por O'Connor-Sánchez *et al.* (2002). Se realizaron experimentos de bombardeo de los genes transportados por los microproyectiles por medio de dos aceleradores de partículas: el PIG ("Particle Inflow Gun") (Finner *et al.* 1992) y el Bio-Rad™ "PDS-1000, Helium System" (Sanford *et al.* 1987). Este último aparato pertenece al Laboratorio de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical (CATIE) con sede en Turrialba, Costa Rica. Con esos dos aparatos se compararon las eficiencias de transformación genética, en relación con la expresión transitoria del gen reportero *GUS* (Jefferson 1987) y con la resistencia conferida a los tejidos vegetales por el gen marcador *bar*. La expresión en los tejidos del gen *uidA* (*GUS*) se detectó mediante un ensayo histoquímico, en el cual se colocó una muestra de tejido en la solución reveladora X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucurónido). La enzima degrada el sustrato y como resultado se genera una coloración azul (*foci*) en los tejidos transformados que contienen el gen (Gallagher 1992, Vasil y Thorpe 1994).

Para detectar el gen marcador *bar* se desarrolló un protocolo experimental de selección de los callos morfogénicos de nuestros genotipos de maíz bombardeados con los dos aceleradores de partículas. Este protocolo consistió en la utilización del agente selectivo glufosinato de amonio (fosfotricina: PPT) en concentraciones de 3, 4, 5 y 6 mgL⁻¹ en el medio de cultivo para el mantenimiento de los callos control (no transformados), para determinar la susceptibilidad natural de este tipo de material al agente selectivo. De esa manera se determinó la concentración adecuada para discriminar los tejidos efectivamente transformados luego de los experimentos de biobalística. Los experimentos de cultivo *in vitro* y de bombardeo de micropartículas con el PIG, se llevaron a cabo en el laboratorio de cultivo *in vitro* y de transformación genética de plantas, de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica. Los de transformación por medio del acelerador Bio-Rad™ se realizaron en el laboratorio de Biotecnología del CATIE. El tiempo total de ejecución de los experimentos fue de enero de 1999 a mayo de 2003.

RESULTADOS

Los ápices de maíz cultivados en medio MS suplementado con 2 mgL⁻¹ BAP (6-benzilaminopurina), 1 mgL⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y 40 mgL⁻¹ de Adenina (Medio MPC), generaron estructuras organogénicas que luego de ocho semanas generaron callos con capacidad para la regeneración de plantas (Fig. 2 A y B). El porcentaje de formación de estructuras organogénicas fue de 32 a

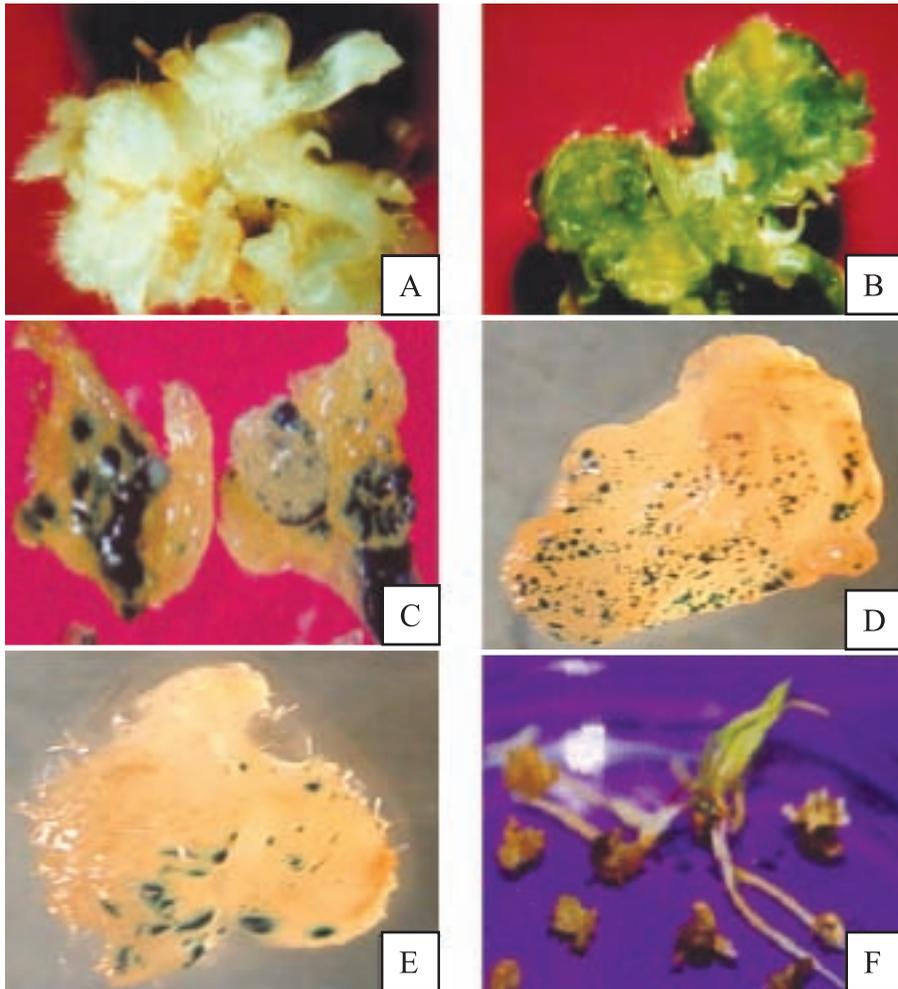


Fig. 2. Organogénesis *in vitro* de maíz, y expresión de genes marcadores de transformación en los callos morfológicos de maíz de la variedad "Diamantes 8843". A- Callo organogénico en oscuridad; B- Callo en proceso de regeneración de plántulas; C- expresión de la β -glucuronidasa en callos de maíz con acelerador PDS-1000/He ; D y E- expresión de la β -glucuronidasa en callos de maíz con PIG; F- Plántula de maíz en condiciones de selección con PPT, luego de 1 mes de cultivo en medio de regeneración.

Fig. 2. *In vitro* organogenesis of maize and expression of the marker genes of transformation in morphogenic calluses of the variety "Diamantes 8843". A - Organogenic callus in darkness; B - Organogenic callus in process of plant regeneration; C - Expression of β glucuronidase enzyme in calluses of maize by using the accelerator PDS 1000/He; D & E - Expression of β glucuronidase enzyme in calluses of maize by using the PIG; F - Plantlet of maize growing in conditions of selection with PPT, after four weeks of culture.

40% para la variedad Diamantes 8843, de 73 a 84% para CR-5 y de 55 a 100% para CR-7. Todos los callos generados fueron capaces de regenerar plantas al ser transferidos a medio de regeneración luego de seis semanas de cultivo.

El número de plántulas regeneradas por gramo de peso fresco de callo varió según el genotipo: 5 para CR-5, 9 para CR-7 y 39 para Diamantes 8843. La capacidad para la inducción de callos entonces, no parece estar relacionada

con la capacidad para la regeneración de esas estructuras globulares. En consecuencia, los experimentos de transformación genética se realizaron sólo en los genotipos Diamantes 8843 y CR-7.

La expresión transitoria de la β -glucuronidasa en los callos de maíz bombardeados con los aceleradores PDS-1000/He y PIG se muestra en la figura 2 (C, D y E). En relación con la tolerancia natural de ambos genotipos al agente de selección PPT, los resultados indican que la concentración adecuada de ese agente es de 6 mgL^{-1} , ya que alrededor del 73 al 75% de los callos control de ambos genotipos se necrosaron. El número de *foci* azules, generados por la actividad de la enzima β -glucuronidasa (gen *GUS*) fue mayor, con un promedio de 41 por muestra, cuando el bombardeo se realizó con el acelerador Bio-Rad TM, que cuando se utilizó la PIG (Cuadro 1). El uso de un tratamiento osmótico (medio MPC suplementado con 12% de sacarosa) por 24 horas antes y después del bombardeo, también mostró un efecto positivo

sobre la expresión transitoria del gen *GUS*, a las 48 horas después del bombardeo. La expresión de este gen siempre fue mayor con el tratamiento osmótico, en ambos aceleradores.

El porcentaje de callos supervivientes luego de 4 meses de selección con 6 mgL^{-1} de PPT varió entre 56% para el tratamiento osmótico en la Bio-Rad TM y 57% en la PIG. Luego de cinco meses de selección con PPT, se obtuvieron 14 clonas resistentes del genotipo Diamantes 8843 cuando se utilizó el aparato PIG y solo 3 con el Bio-Rad TM, no obstante los mejores resultados en expresión transitoria del gen *GUS*, obtenidos con este dispositivo en las semanas siguientes al bombardeo (Cuadro 1). Este último resultado se debió probablemente al largo traslado del material vegetal, para realizar los experimentos de bombardeo en el laboratorio del CATIE en Turrialba.

El Cuadro 1 presenta las condiciones más adecuadas con los dos dispositivos de aceleración de micropartículas cubiertas de ADN evaluados, para la transformación genética de los

CUADRO 1

Comparación de resultados de expresión transitoria del gen *Gus* en experimentos de transformación genética de maíz (*Zea mays* L.), variedad "Diamantes 8843", con dos aceleradores de partículas: Bio-Rad TM (PDS-1000/He) y "Particle Inflow Gun" (PIG), con y sin tratamiento osmótico (12% sacarosa)

TABLE 1

Comparison of results of transitory expression of the gene *Gus* in experiments of genetic transformation of maize (*Zea mays* L.), variety "Diamantes 8843", with two gene guns: Bio-RadTM (PDS-1000/He) and "Particle Inflow Gun" (PIG), with and without osmotic treatment (12% saccharose)

Tipo de acelerador:	PDS-1000/He		PIG	
	Tratamiento osmótico (n=80)	Control (n=43)	Tratamiento osmótico (n=92)	Control (n=50)
No. <i>foci</i> de actividad de la enzima β -glucuronidasa (gen <i>GUS</i>):				
promedio por muestra *	41	31	22	7
desviación estándar	16	25	16	7
Porcentaje de callos supervivientes luego de 4 meses de selección con PPT (6 mgL^{-1})	56	62	57	22

* (10 mg PF de callo)

Condiciones de transformación:

Presión de gas Helio:	1 350 PSI en PDS-1000/He	100 PSI en PIG
Altura de la muestra:	9 cm en PDS-1000/He;	15 cm en PIG
Plásmidos:	co-transformación: pRFVcp + Bar) + pDM803 - Bar: (<i>GUS</i>)	

genotipos costarricenses de maíz examinados. Con esas condiciones se recuperaron 11 eventos adicionales de transformación del genotipo CR-7, con el acelerador PIG luego de 5 meses de selección. Esos callos desafortunadamente, en su mayoría, perdieron su capacidad de regeneración, debido posiblemente al largo período de cultivo en medio de selección, por lo que no fue posible regenerar las plántulas. Sólo una logró sobrevivir dos meses en medio de regeneración (Fig. 2F).

DISCUSIÓN

Los métodos de transformación genética del maíz, utilizados de manera comercial, requieren del cultivo de embriones inmaduros que producen el tipo de callo "Hi-II", de muy alta capacidad embriogénica. Desafortunadamente, sólo unos pocos genotipos, como el A-188, sin interés comercial, producen este tipo de callos morfogénicos (Rhodes *et al.* 1988, Fromm *et al.* 1990, Gordon-Kamm *et al.* 1990). Los transgenes de interés agronómico, integrados de esta manera al genoma del maíz, son luego transferidos por mejoramiento convencional, a las líneas de maíz de valor comercial, lo que toma varios ciclos reproductivos a fin de eliminar los caracteres genéticos no deseados. Este es además, un proceso de alto costo debido a las complejas manipulaciones para aislar embriones inmaduros en cada generación (O'Connor-Sánchez *et al.* 2002).

Por esta razón, y con la finalidad de producir plantas transgénicas de maíz, de interés agronómico, resistentes al virus del rayado fino del maíz (MRFV) en el futuro, esta investigación desarrolló un método alternativo para la regeneración y transformación genética de plantas de maíz de genotipos costarricenses.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Rosemarie Hammond por el asesoramiento en las técnicas moleculares, a Nancy Villalobos y Marlon Delgado

por su asistencia en el trabajo experimental, a Oscar Rocha por la revisión del manuscrito. Se agradece la colaboración de María Elena Aguilar y de Nelly Vázquez del Departamento de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), por facilitar sus instalaciones y equipo. Este trabajo fue financiado por la Universidad de Costa Rica (Proyecto No 111-96-222), por el Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del Fondo de Incentivos, y por el Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología (ICGEB).

RESUMEN

Se desarrolló un sistema de transformación genética para dos variedades costarricenses de maíz: CR-7 y Diamantes 8843, que permita la transferencia ulterior de genes de origen viral a su genoma, y conferirles resistencia a la enfermedad ocasionada por el virus del rayado fino del maíz (MRFV). El método se basa en el bombardeo de microproyectiles en callos organogénicos derivados de ápices de jóvenes *vitrogerminaciones*. Por otro lado, se elaboró la construcción molecular pRFcp-*bar* que contiene el gen de la cubierta proteica del MRFV y el gen marcador *bar*. Para la selección visual del material transformado, se utilizó también el plásmido pDM803 que contiene el gen reportero *uidA* (GUS). Los resultados indican que los dos aceleradores de partículas evaluados: el PIG ("Particle Inflow Gun") y el Bio-Rad™ son igualmente eficientes para transferir genes foráneos al genoma del maíz.

REFERENCIAS

- Beachy, R.N., S. Loesch-Fries & N.E. Tumer. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 451-474.
- Bevan, M.W., R.B. Flavell. & M.D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of the T-DNA. *Nucl. Ac. Res.* 11: 369-385.
- Christensen, A.H., R.A. Sharrock & P.H. Quail. 1992. Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression, transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
- Finner, J., P. Vain, M.W. Jones & M.D. McMullen. 1992. Development of the Particle Inflow Gun for ADN delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.* 11: 323-328.

- FAO & CIMMYT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) and (International Maize and Wheat Improvement Center). 1997. White maize: a traditional food grain in developing countries. 22 p.
- Fromm, M.E., F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas & T.M. Klein. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio Technol.* 8: 833-839.
- Gallagher, S. 1992. GUS protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic, USA. 219 p.
- Gómez, R. 1969. A new Leafhopper-borne virus of corn in Central America. *Plant Dis. Rep.* 53: 929-932.
- Gómez, R. 1973. Transmission of rayado fino virus of maize (*Zea mays*) by *Dalbulus maidis*. *Ann. Appl. Biol.* 73: 285-292.
- Gómez, R. 1980. Rayado Fino Virus disease of maize in the American tropics. *Trop. Pest Manage.* 26: 26-33.
- Gómez, R. 1983. The ecology of maize rayado fino virus in the American tropics. *In* R.T. Plum & J.M. Thresh (eds.). *Plant Virus Epidemiology*. Blackwell Scientific, Oxford, pp: 267-275.
- Gloria, C., R. Broglie, C. Edward & N-H. Chua. 1984. Tissue specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5- biphosphate carboxylase. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 3: 1671-1679.
- Gordon-Kamm, W.J., T.M. Spencer, M.L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, N.G. Willets, T.B. Rice, C.J. Mackey, R.W. Krueger, A.P. Kaush & P.G. Lemaux. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-608.
- Hammond, R.W. & P. Ramirez. 2001 Molecular characterization of the genome of Maize Rayado Fino Virus, the Type member of the Genus Marafivirus. *Virology* 282: 338-347.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol.* 6: 265-270.
- Kogel, R., R.W. Hammond & P. Ramirez 1996. Incidence and geographic distribution of maize rayado fino virus (MRFV). *Plant Dis.* 80: 679-683.
- Lomonosoff, G.P. 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 323-343.
- Madriz-Ordeñana, K. 1999. Molecular studies of the defence responses of maize (*Zea mays* L.) in interaction with Maize Rayado Fino Marafivirus (MRFV). Tesis PhD. The Royal Veterinary & Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- McElroy, D., A.D. Blowers, B. Jeness & R. Wu. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1(Act1) 5_region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.* 231: 150-160.
- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- O'Connor-Sánchez, A., J.L. Cabrera-Ponce, M. Valdez-Melara, P. Téllez-Rodríguez, J.L. Pons-Hernández & L. Herrera-Estrella. 2002. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. *Plant Cell Rep.* 21: 302-312.
- Rhodes, C.A., D.A. Pierce, J.L. Mettler, D. Mascarenhas & J.J. Detmer. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* 240: 204-207.
- Sanford, J.C. & S.A. Johnston. 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasites own genome. *J. Theor. Biol.* 115: 395-405.
- Sanford, J.C., T.M. Klein, E.D. Wolf, & N. Allen. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Part. Sci. Technol.* 5: 27-37.
- Spencer, T.M., W.J. Gordon-Kamm, R.J. Daines, & P.G. Lemaux. 1990. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell cultures. *Theor. Appl. Genet.* 79: 625-631.
- Thomson, C.J., N.R. Nova, R. Tizzard, R. Cramer, J.E. Davis, M. Lauwerys & J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 6: 2519-2523.
- Valdez, M., J.L. Cabrera-Ponce, D. Sudhakar, L. Herrera-Estrella & P. Christou. 1998. Transgenic Central American, West African and Asian elite rice varieties resulting from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants utilizing three different bombardment devices. *Ann. Bot.* 82: 795-801.
- Vasil, I., & T. Thorpe. 1994. *Plant cell and tissue culture*. Kluwer Academic, Netherlands. 593 p.