

## BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

ANTONIO GRANELL

*Institut d'Agroquímica i Tecnologia d'Aliments. CSIC. València.*

Text de la ponència presentada a la Primera Jornada de Biologia «Cap a on va la biologia contemporània», celebrada a Prada dins el marc de la Universitat Catalana d'Estiu, l'agost de 1991.

### RESUM

L'obtenció d'aliments millors i les pràctiques agrícoles menys agressives per a l'ambient s'estan beneficiant de la confluència dels mètodes de millora tradicionals i les noves biotecnologies agrícoles. En aquest article es revisen els diferents aspectes d'allò que s'ha anomenat «la segona revolució verda». Es discuteix l'impacte del cultiu de teixits i de les tècniques de transferència de gens en el disseny de noves plantes, i també la naturalesa dels gens que actualment s'estan introduint. Es dedica una atenció especial al desenvolupament de plantes *a*) resistentes a pestes, *b*) resistentes a herbicides i *c*) amb millors característiques com a productores d'aliments.

PARAULES CLAU: *biotecnologia, plantes transgèniques, cultiu de teixits, enginyeria genètica.*

### SUMMARY

Agricultural biotechnology is emerging, together with conventional plant breeding, as to play an important role in the development of better foods and ecologically safer agricultural practices. In this paper we review different aspects of what has been sometimes called «second green revolution». The impact of tissue culture and gene transfer techniques in the engineering of new plants and the nature of the genes that are currently being introduced into plants is presented. Especial attention has been given to the development of plants *a*) resistant against pests, *b*) resistant to herbicides, *c*) disease resistant, and *d*) with better characteristics for food processing.

KEY WORDS: *biotechnology, transgenic plants, tissue culture, genetic engineering.*

Durant milers d'anys l'home ha estat practicant la millora de plantes quan seleccionava individus que, o bé donaven una major producció o un millor sabor, o bé resultaven més atractius. L'agricultura actual, sofisticada i d'alta producció, es fonamenta en aquelles primeres varietats escollides primitivament per l'home i que han estat més tard millorades pels seleccionadors genètics.

Fonamentalment són dues les raons que han fet possible que aquell primer procés empíric de selecció siga cada vegada més racional: la utilització de les tècniques de cultiu de teixits i la possibilitat d'introduir gens concrets de plantes o d'altres organismes. Cal, no obstant això, un coneixement més profund de la bioquímica i la fisiologia de les plantes per tal de fer encara més predible el procés de selecció dels gens que s'han d'introduir i el possible resultat final.

Si bé el terme *biotecnologia* ha esdevingut familiar durant els darrers quinze anys, la biotecnologia de plantes té una llarga i excitant història. El concepte actual de biotecnologia de plantes es relaciona amb l'aplicació conjunta de tècniques ja existents de cultius de cèl·lules, teixits i òrgans, de les eines pròpies de la biologia molecular i de l'enginyeria genètica, de la millora de les plantes i de la productivitat vegetal.

### Tècniques de cultiu de teixits

El 1860 els estudis en nutrició vegetal ja demostraren que les plantes podien créixer perfectament en dissolucions de sals minerals. Es mostrava així el camí per als cultius hidropònics i per a experiments posteriors, en els quals parts concretes de la planta, com ara els extrems de les arrels, poden ser cultivats independentment de la resta de l'individu.

Una de les tècniques més útils i de més àmplia difusió ha estat el cultiu de meristemes: un procediment pel qual l'àpex d'un brot de la planta s'escindeix i creix *in vitro* en un medi

nutritiu per produir una planta completa. Quan s'hi afegeixen quantitats traça de determinades hormones vegetals, es poden obtenir múltiples brots. Cadascun d'aquests brots és capaç de créixer fins a convertir-se en una planta completa, o *mericlón*, i així esdevé possible, en un sol any, augmentar el nombre de plantes idèntiques des d'una fins a un milió. Modificacions d'aquesta tècnica han estat àmpliament utilitzades, ja que permeten obtenir organismes lliures de virus.

Els experiments amb trossos d'arrel o tija escindits de la planta portaren al descobriment que els teixits de pràcticament qualsevol part de la planta poden produir, quan es cultiven en un medi escaient, un teixit desorganitzat (cal·lus) que pot ser molt útil en posteriors manipulacions. En aquest teixit desorganitzat de ràpid creixement, es produeixen mutacions (variacions somaclonals) i, simplement variant la concentració relativa d'algunes hormones, és possible obtenir novament brots i, d'aquí, plantes fèrtils. Alguns genotipus interessants han estat seleccionats seguint aquests procediments.

El control hormonal de l'expressió morfo-genètica dels teixits vegetals en cultiu, primerament demostrada en 1957, es va veure que depenia de la relació de dos tipus de substàncies reguladores del creixement vegetal. Més concretament, de la relació entre auxines i citoquinines. Si el nivell de citoquinines s'augmenta per sobre d'un cert punt es formen brots. Si es baixa, es dispara la formació d'arrels. És més, l'enorme flexibilitat de la cèl·lula vegetal es posa de manifest quan cèl·lules individuals (protoplasts), obtingudes dels teixits de la planta eliminant enzimàticament la paret que les envolta, poden, en poques setmanes, formar agregats dels quals és possible obtenir novament plantes completes en medis relativament simples.

Tot aquest conjunt de tècniques permet obtenir nous genotipus (p. e., per variació somaclonal s'han obtingut noves varietats comercials de creïlla), produir plantes lliures de virus (cultiu de meristemes) i explotar el poten-

cial genètic dels vegetals. I han resultat necessàries per a dur a terme la transformació genètica de plantes, és a dir, la incorporació de material genètic procedent d'altres organismes.

### Transformació genètica

Els milloristes «clàssics» tracten d'importar a una espècie cultivada, mitjançant encreuaments i més encreuaments, trets d'interès agronòmic que són presents en altres plantes. Aquesta aproximació es troba limitada perquè: 1) sols és possible fer encreuaments entre espècies molt relacionades (sexualment compatibles), i 2) es

barregen genomes complets; és a dir, no sols s'incorpora el tret desitjable, sinó molts d'altres que segurament no interessin. Per tal cosa, s'ha de «depurar» el resultat de l'encreuament per retrocreuament amb l'espècie que es vol recuperar. Això pot significar un treball d'entre deu i vint anys. Aquests inconvenients poden salvar-se mitjançant la utilització de tècniques d'enginyeria genètica.

La primera planta transgènica va ser produïda fa aproximadament deu anys.

Avui prop de cinquanta espècies de plantes cultivades poden ser manipulades genèticament. Aquesta llista (vegeu la taula 1) inclou la major part de les dicotiledònies cultivades i un nombre

TAULA I

Cultius d'interès que són susceptibles de transformació genètica

cultius bàsics			oleaginoses i d'altres	ornamentals	llenyoses
tomata <i>Lycopersicon esculentum</i>	encisam <i>Lactuca sativa</i>	cogombre <i>Cucumis sativus</i>	gira-sol <i>Helianthus annuus</i>	petúnia <i>Petunia hybrida</i>	pomera <i>Pyrus malus</i>
creïlla <i>Solanum tuberosum</i>	pèsol <i>Pisum sativum</i> , subsp. <i>hortense</i>	meló <i>Cucumis melo</i>	colza <i>Brassica napus</i>	rosa <i>Rosa</i> sp.	raïm <i>Vitis vinifera</i>
batata <i>Ipomoea batatas</i>	carlota <i>Daucus carota</i> , subsp. <i>sativus</i>	maduixa <i>Fragaria vesca</i>	canola <i>Cinnamomum</i> <i>zeylandicum</i>	crisantem <i>Chrysanthemum</i> sp.	xop <i>Populus</i> sp.
soja <i>Glycine max</i>	col-i-flor <i>Brassica oleracea</i>	nabiu <i>Vaccinium</i> sp.	lli <i>Linum usitatissimum</i>	clavell <i>Dianthus</i> sp.	nouer <i>Juglans regia</i>
dacsa <i>Zea mays</i>	col <i>Brassica oleracea</i>	albergina <i>Solanum melongena</i>	cotó <i>Gossypium</i> sp.	meravelles <i>Ipomoea</i> sp.	om <i>Ulmus minor</i>
arròs <i>Oryza sativa</i>	rave <i>Raphanus sativus</i>	espàrrec <i>Asparagus officinalis</i>			perera <i>Pyrus communis</i>
sègol <i>Secale cereale</i>	api <i>Apium graveolens</i>				papaia <i>Carica papaya</i>
blat <i>Triticum</i> sp.	remolatxa <i>Beta vulgaris</i> var. <i>zapa</i>				kiwi <i>Actinida chinensis</i>

cada vegada més gran de monocotiledònies, entre elles l'arròs (*Oryza sativa*), la dacsca (*Zea mays*) i el blat (*Triticum* sp.). És molt probable que en els pròxims anys totes o quasi totes les espècies d'interès agronòmic siguin susceptibles de transformació genètica.

En el cas de les dicotiledònies, el procediment d'elecció és la transformació mitjançant *Agrobacterium*. El que s'ha aprofitat en la transformació per *Agrobacterium* ha estat la seua capacitat «natural» de transferir un tros de DNA (T-DNA) des d'un plasmidi del bacteri fins al cromosoma vegetal. Els biòlegs moleculars han definit quins són els requeriments necessaris i suficients del genoma del bacteri que fan possible la transformació. Així es va saber que perquè es doni la transferència genètica fa falta un nombre de gens (*vir*) presents als plasmidis (Ti) d'aquests bacteris, i també alguns gens presents al cromosoma (*Chv*). Ara bé, els requeriments del tros de DNA que s'ha de transferir semblen estar limitats a les seqüències de vint-i-quatre parelles de bases, repetides i particulars que flanquegen el T-DNA (extrems), possiblement essencials per a la transferència. Fonamentant-se en aquests estudis és com s'han dissenyat els «vectors» de transformació de plantes. En un d'aquests tipus, el gen d'interès s'introdueix, mitjançant les

tècniques de biologia molecular, entre dues seqüències dels extrems en un plasmidi artificial i s'hi introdueix en una raça d'*Agrobacterium* que porta un plasmidi Ti amb la regió *vir* intacta, però en el qual falta la regió T. D'aquesta manera, el gen d'interès contingut entre els extrems del plasmidi modificat serà el que es transferirà a la planta.

Com que la transferència gènica té lloc sols en algunes cèl·lules, cal fer-ne una selecció. És per això que s'incorporen uns marcadors de selecció (vegeu la taula II) que faciliten l'enriquiment en cèl·lules que han incorporat establement el gen d'interès. Tradicionalment s'han utilitzat gens de resistència a antibiòtics o a herbicides. Addicionalment s'han utilitzat marcadors de seguiment (gens que codifiquen per a enzims) que permeten identificar els teixits transformats mitjançant una senzilla anàlisi enzimàtica (vegeu la taula II). El procés d'infecció i selecció generalment es fa en explantats (trossos) de plantes, i el procés de regeneració de l'organisme complet en presència de l'antibiòtic escaient es fa utilitzant les tècniques de cultiu de teixits establerts per a l'espècie en qüestió. En un període de temps de pocs mesos és possible tenir les plantes transgèniques que eventualment donaran llavor i en què es comprovarà que el gen

TAULA II

Marcadors selectius i de seguiment més utilitzats (*nptIII* neomicina fosfotransferasa; *dhfr*, dihidrofolat reductasa; *aphIV*, aminoglicòsid fosforilasa; *cat*, cloramfenicol acetiltransferasa; *luc*, luciferasa; *gus*; glucoronidasa)

marcadors selectius		marcadors de seguiment	
gen de resistència	agent selectiu	gen marcador	mètode seguiment
<i>nptIII</i>	kanamicina	<i>cat</i>	cromatografia
<i>dhfr</i>	metotrexat	<i>luc</i>	luminometria
<i>aphIV</i>	higromicina	<i>gus</i>	fluorometria

és transmès establement a la descendència com caldria esperar.

Com hem dit, el mètode d'elecció, sempre que és possible, és la transformació mitjançant *Agrobacterium*. Tanmateix, les espècies com l'arròs, el blat i la dacsa (i les monocotiledònies en general), majoritàries a l'agricultura mundial, no són transformables per aquest mètode. Més recentment, els mètodes de transferència directa de DNA a protoplasts o cèl·lules en cultiu, amb la posterior selecció i regeneració de plantes transformades fèrtils han començat a donar fruits. En especial, l'èxit s'està estenent rapidísimament amb la introducció de gens mitjançant partícules metàl·liques accelerades (biolística).

Una vegada hom disposa de les tècniques adients per a fer plantes transgèniques es planteja quins són els gens que volem introduir. Els objectius més senzills són dotar-les d'aquells trets d'interès agronòmic que depenen de l'expressió d'un sol gen. L'onada inicial de recerca en biotecnologia vegetal, impulsada per les indústries agroquímiques i de llavors, ha estat concentrada en «trets agronòmics» de rellevància directa per a aquestes empreses: 1) resistència a insectes (fonamentalment a la toxina Bt); 2) control de les males herbes (introduint gens de resistència a herbicides en els cultius); 3) resistència a malalties (sobretot virus, per bé que fongs i bacteris també reben més atenció recentment), i 4) processament d'aliments. I en una segona onada tenim la resistència a l'estrès (hídric, salí, tèrmic, etc.) i la producció de substàncies d'interès farmacològic.

### Resistència als insectes

No és cap secret que un dels factors que ha contribuït a l'èxit de la agricultura moderna ha estat la utilització d'una àmplia varietat d'insecticides per tal de controlar el dany produït pels insectes. La biotecnologia de plantes apunta cap a unes noves estratègies per al control dels insectes. En un cas s'ha introduït en plantes

transgèniques un gen del bacteri *Bacillus thuringiensis* que codifica una proteïna tòxica, anomenada *toxina Bt*. Aquesta toxina ha estat utilitzada durant desenes d'anys als Estats Units d'Amèrica, per bé que fins ara s'aplicava per fumigació sobre les plantes. És un tòxic molt específic per a lepidòpters, dípters i coleòpters, ja que sols sota les condicions particulars dels estómacs d'aquests insectes és processada i inhibeix específicament llurs bombes idòniques. S'ha demostrat al laboratori, i també en experiments de camp, que les plantes transgèniques portadores del gen per a la toxina Bt són resistents al dany que altrament provoquen les larves. Una altra aproximació ha estat aprofitar els efectes tòxics dels inhibidors de proteases sobre el procés digestiu dels insectes. Els inhibidors de proteases es troben presents en moltes llavors i se suposa que tenen un paper de protecció enfront de l'atac per distints devoradors. Les plantes transgèniques que expressen en les seues fulles un inhibidor de proteases de distints orígens (una proteïna d'uns vuitanta aminoàcids) manifesten resistència als diferents insectes que causen danys importants, com són ara *Heliothis virescens* i altres erugues. S'han aconseguit així plantes transgèniques de tabac (*Nicotiana tabacum*), tomata (*Lycopersicon esculentum*), cotó (*Gossypium* sp.) i dacsa que han passat ja el procés de laboratori i estan ara essent experimentades al camp.

Les plantes tenen molts composts, productes del metabolisme secundari, que tenen una clara activitat enfront de distintes pestes. Cal esperar que en un termini de temps no gaire llarg, tan bon punt se sàpiga més de la biosíntesi d'aquests productes, hom podrà incorporar aquells passos enzimàtics que permetin, a plantes que no els tenen d'una manera natural, sintetitzar aquells productes a partir de productes endògens.

### Control de les males herbes: resistència a herbicides

Un bon herbicida ha d'eliminar la mala herba i deixar completament intacte el cultiu que hi ha

al costat. Atès que moltes vegades es tracta d'espècies molt relacionades, el procés d'obtenció d'un herbicida suficientment selectiu és extremament difícil i costós.

La biotecnologia de plantes permet utilitzar una aproximació complementària. Es tracta d'obtenir plantes transgèniques que siguin resistents a l'herbicida. Els gens de resistència poden provenir d'una altra planta que mostre una resistència natural o bé (més freqüentment) d'un microorganisme que ha estat seleccionat per això. La importància addicional d'aquesta aproximació és que disminueix les restriccions que l'herbicida hagi d'ésser específic per a les males herbes i, per tant, es pot posar més èmfasi en els aspectes ambientals i sanitaris. S'han desenvolupat distints tipus de resistència. En alguns casos la resistència es deu a una mutació en la proteïna amb la qual interaccionava l'herbicida, o bé a un augment en la concentració d'aquella, de manera que es fa necessària una major quantitat de l'herbicida per a ser-li nociu. En altres casos la resistència es deu a l'existència d'un enzim que catalitza la inactivació de l'herbicida per conjugació a una altra molècula o que el converteix en una substància metabolitzable per la planta.

Així s'han obtingut línies mutants seleccionant en cultiu de teixits la resistència a l'herbicida glifosat. Una de les línies seleccionades va resultar que tenia més còpies del normal del gen que codifica per a l'EPSP sintasa, l'enzim de la ruta d'aminoàcids aromàtics que és específicament inhibit pel glifosat i és la raó del seu efecte herbicida. Alternativament, i per tècniques d'enginyeria genètica, s'ha introduït en plantes transgèniques el gen que codifica per a l'EPSP sintasa sota el control de seqüències reguladores que fan que el gen s'expressi fortament en tots els teixits. Aquestes plantes mostren també resistència enfront del glifosat. S'han emprat estratègies semblants per tal d'obtenir plantes de canola (*Cinnamomum zeylandicum*) i de soja (*Glycine max*) tolerants a l'herbicida Roundup (inhibidor de l'EPSP sintasa). També introduïnt gens mutants

d'acetolactat sintasa (ALS), la diana dels herbicides basats en sulfonilurea (com el Glean, etc.), s'han obtingut cotó i canola resistents a aquests herbicides. L'estratègia alternativa d'inactivació de l'herbicida per modificació covalent (p. e., acetilació o nitrilació) ha estat emprada en canola, soja, cotó i dacs, incorporant els gens bacterians específics sota el control de regions reguladores de gens de plantes.

### Resistència a les malalties

El principal progrés en aquest aspecte ha estat, sobretot, en la resistència als virus. Una de les aproximacions ha estat obtenir plantes transgèniques que expressen la proteïna de la coberta del virus. Això confereix resistència enfront de la posterior inoculació del virus. S'ha aplicat a un ventall de cultius: tomata, alfals (*Medicago sativa*), tabac, creïlla, meló i arròs, i amb distints virus: del mosaic de l'alfals, del mosaic del cogombre (*Cucumis sativus*), X i Y de la creïlla (*Solanum tuberosum*), de l'enrotllament de la fulla de la creïlla, etc. Se suposa que el mecanisme d'actuació deu ésser que les càpsides preformades segresten les partícules infectives de RNA, i impedeixen així la infecció. Altres aproximacions impliquen l'ús de tècniques de RNA antisentit en què s'introdueix el cDNA que codifica la proteïna de la coberta en orientació inversa, de manera que la planta transgènica sintetitza una molècula de RNA complementària al missatger de la proteïna de la coberta. Se suposa que quan l'RNA (+) del virus entra en la planta és bloquejat per l'RNA antisentit. Així s'han aconseguit també efectes sobre les malalties virals, si bé no són tan bons com els assolits amb la sobreexpressió de la proteïna de coberta.

Estan essent introduïts mecanismes de protecció enfront d'altres patògens distints dels virus. Així, s'han obtingut plantes de tabac resistents a *Pseudomonas syringae* introduint un gen procedent de microorganismes que desintoxifica la toxina produïda pel patògen. En un

altre exemple, la simptomatologia que produeix el fong *Alternaria longipes* en el tabac disminueix en severitat si les plantes tenen un gen del bacteri *Serratia marcescens* que codifica una quitinasa (enzim que degrada la quitina de la paret del fong).

### Obtenció d'aliments amb millors característiques comercials i nutricionals

Si bé una aplicació racional de la biotecnologia agrícola per tal d'obtenir productes amb millor sabor, durabilitat, etc., passa per un millor coneixement dels processos fisiològics i bioquímics implicats, s'estan començant a obtenir els primers resultats que indiquen que aquest serà un camp molt ric d'aplicacions. El cas més desenvolupat té relació amb la maduració i post-recol·lecció de la tomata. Se sap des de fa bastant temps que en el procés de maduració de la tomata té un paper molt important el regulador del creixement vegetal etilè. També es coneix molt bé quina és la ruta biosintètica per a aquest regulador. Aquesta sembla estar regulada fonamentalment pels nivells del precursor ACC (àcid aminopropà carboxílic) a través de l'enzim ACC sintasa. L'ACC és convertit en etilè mitjançant l'activitat EFE (enzim formador d'etilè). Distints grups han aconseguit bloquejar la síntesi de l'enzim ACC sintasa per tècniques d'enginyeria genètica. Per això, la seqüència codificant de l'ACC sintasa s'ha introduït a l'inrevés en plantes de tomatera sota promotors forts. Aquestes plantes sintetitzen uns nivells alts d'un RNA que és complementari al del missatger de l'ACC sintasa. D'aquesta manera, l'mRNA de l'ACC sintasa no és traduït a proteïna i les tomates no sofreixen l'augment climàtic en la síntesi d'etilè que normalment inicia la maduració. Aquestes tomates tenen una major duració i no pateixen dany quan són transportades als llocs de destinació. Per la resta de les característiques, són perfectament normals, és a

dir, maduren i assoleixen les característiques organolèptiques típiques una vegada són tractades exògenament amb etilè. Una aproximació semblant s'ha fet amb plantes transgèniques modificant l'enzim EFE.

Hi ha moltes altres aplicacions que estan essent desenvolupades: millorar el contingut en determinats aminoàcids de les proteïnes de reserva dels cereals, variar el percentatge d'insaturació dels olis d'origen vegetal, canviar els nivells i tipus de midó, etc. Cal esperar que en els propers mesos puguem disposar de plantes modificades genèticament per a alguns d'aquests caràcters. Hem de dir, no obstant això, que l'aplicació de les tècniques d'enginyeria genètica a la millora agrícola no són la «panacea», i que les tècniques d'encreuaments i d'altres de la genètica clàssica són inevitables, especialment quan la major part dels trets desitjables, dels quals normalment es desconeixen els fonaments fisiològics i bioquímics, depenen d'un seguit de gens interrelacionats. En aquest darrer cas, les tècniques de biologia molecular, com els RFLP (polimorfisme dels fragments de restricció), comencen a ésser una eina valuosa per al seleccionador genètic en les pràctiques de millora.

### BIBLIOGRAFIA

- ABEL, P. P., R. S. NELSON, N. M. DE B. HOFFMANN, S. G. ROGERS, R. T. FRALEY i R. N. BEACHY. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*. 232: 73
- AUSTIN, R. B., R. B. FLAVELL, I. E. HENSON i H. J. B. LOWE. (1986). *Molecular biology and crop improvement*. Cambridge University Press. Cambridge.
- BOTTERMANN, J. I. J. LEEMANS. (1988). Engineering herbicide resistance in plants. *Trends Genet.* 4: 219-222.
- CUOZZO, M., K. M. O'CONNELL, W. KANIEWSKI, R. X., FANG, N. H. CHUA i N.E. TUMER. (1988). Viral protection in transgenic plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein of its antisense RNA. *Biotechnology*. 6: 549-557.
- DE GREEF, W., R. DELON, M. DE BLOCK, J. LEEMANS i J. BOTTERMAN. (1989). Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. *Biotechnology*. 7: 61-64.

- DELANNAY, X. (1989). Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. **Biotechnology**, *7*: 1265-1269.
- FRALEY, R. T., N. M. FREY & J. SCHELL. (1988). **Genetic improvements of agriculturally important crops**. Cold Spring Harbor Laboratory, Nova York.
- GASSER, S. C. & R. T. FRALEY. (1989). Genetically engineering plants for crop improvement. **Science**, *244*: 1293-1299.
- GEISON, M. (1991). The proof of the cloning is in the eating. **Trends Biotechnology**, *9*: 5-7.
- HOYKHAAS, P. J. J. (1989). Transformation of plant cells via *Agrobacterium*. **Plant Mol. Biol.** *13*: 327-336.
- HAUGHN, G. W., J. SMITH, B. MAZUR & C. SOMERVILLE. (1988). Transformation with a mutant *Arabidopsis acetolactate synthase* gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides. **Mol. Gen. Genet.** *211*: 266-271.
- NORTH, G. (1990). The race for resistance genes. **Nature**, *347*: 517.
- RATNER, M. (1989). Crop Biotech'89: Research efforts are market driven. **Biotechnology**, *7*: 337-341.
- STARK, D. M. & R. BEACHY. (1989). Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. **Biotechnology**, *7*: 1257-1262.
- VASIL, V., A. M. CASTILLO, M. E. FROMM & I. K. VASIL. (1992). Herbicide fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. **Biotechnology**, *10*: 667-674.