

Optimización de las condiciones de bombardeo para transformación genética de arroz (*Oryza sativa*) variedad Amistad 82

Eduardo Menéndez, Juan Arrieta, Alberto Coego, Merardo Pujol,* Yamilet Coll,* Sergio González** y Guillermo Selman.

División de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 6162, Ciudad de La Habana, *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 83, CP 60200, Sancti-Spiritus, **Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 8 de marzo de 1997. Aceptado: 30 de marzo de 1997.

Palabras clave: arroz, transformación transiente, bombardeo de micropartículas
Key words: rice, transient transformation, microparticle bombardment

RESUMEN. En este trabajo se describe la obtención de expresión transiente de un gen reportero en explantes de la variedad cubana de arroz Amistad 82. Dicho gen fue introducido en embriones mediante el bombardeo con micropartículas de oro portadoras de ADN aceleradas con un flujo de helio. Se analizaron diferentes factores involucrados en la eficiencia de esta técnica. Se describe la influencia del tamaño de las partículas, su concentración y dispersión, así como la presión de helio y la distancia al tejido diana. Los mejores resultados del bombardeo al escutelo de embriones se obtuvieron con embriones somáticos bajo las condiciones siguientes: presión de helio $5 \cdot 10^5$ Pa, distancia de vuelo de 10 cm, tamaño de partícula 1,2 μm , concentración de partículas por microlitro $0,25 \cdot 10^6$ y empleo de malla dispersora de 1 000 μm . Por otra parte, la plasmólisis parcial de los embriones aumentó la eficiencia de la transformación. Este resultado permite concluir que este método de transformación puede ser utilizado para el mejoramiento de la variedad de arroz Amistad 82 por medio de la Ingeniería Genética, mediante la introducción en la planta de genes que codifican caracteres de interés agrícola.

ABSTRACT. This report describes the transient expression of a reporter gene in explants of the rice Cuban cultivar Amistad 82. The gene was introduced into embryos through bombardment with gold microparticles carrying DNA accelerated with a helium inflow gun. Several factors involved in the efficiency of this technique were analyzed. The influence of the transient reporter gene expression in explants from the Cuban rice cultivar Amistad 82 has been obtained. Several factors involved in the efficiency of the gene delivery by DNA particle acceleration were analyzed. The influences of the particle size, concentration, and dispersion as well as helium pressure and the distance to the target tissue are described. The best results were obtained by bombarding somatic embryos with 1.2 μm -size particles, at a concentration of $0,25 \cdot 10^6$ particles/mL, a helium pressure of $5 \cdot 10^5$ Pa, with the target tissue at a distance of 10 cm and baffle mesh size of 1 000 μm . Transformation efficiency values obtained in this work lead to the conclusion that this method could be used for the improvement of the Cuban rice cultivar Amistad 82 through Genetic Engineering by introducing into plants, genes coding for agricultural important traits.

INTRODUCCION

Los métodos de cruzamiento convencionales (hibridación sexual) fueron por mucho tiempo la única herramienta disponible para el mejoramiento genético de los cultivos. Sin embargo, el surgimiento, desarrollo y aplicación del cultivo *in vitro* ha permitido desde la propagación y saneamiento hasta la regeneración de plantas completas a partir de protoplastos y la posibilidad de combinar estas tecnologías con la aplicación de los métodos de transformación que aporta la Ingeniería Genética, lo que ha hecho posible la manipulación genética de una forma más directa, precisa y rápida. Con ello, se ha logrado romper la barrera biológica que significa la incompatibilidad sexual entre especies, además de la posibilidad que brinda de alterar un solo carácter en una variedad, manteniendo el resto de sus características fenotípicas.

La introducción del ADN foráneo en la célula vegetal mediante la Ingeniería Genética, se realiza por diferentes vías. En un inicio se utilizaron patógenos naturales como es el caso de las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y el *Agrobacterium rhizogenes*, los cuales al infestar de forma natural a la célula, le introducen fragmentos del ADN bacteriano. Esta región que se va a incorporar a la célula es manipulada previamente para sustituirle la parte virulenta por un gen de interés. Como desventaja de este método, se tiene su

limitado rango de hospederos, lo que lo hace poco eficiente para transformar monocotiledóneas, en las que se agrupan cultivos de importancia económica como el trigo, arroz, maíz y la caña de azúcar. Por este motivo, se desarrollaron los llamados Métodos de Transformación Directa, que se basan en la introducción del ADN foráneo a la célula vegetal mediante procedimientos físico-químicos. Sin embargo, el número de especies en los cuales pueden emplearse estos métodos está limitado por el desarrollo del cultivo de tejidos *in vitro* y la necesidad de regenerar plantas fértiles a partir de protoplastos en algunos casos.¹

Hasta el presente ninguno de los métodos de transformación genética descritos para arroz, ha podido aplicarse exitosamente a las variedades comerciales que se cultivan en Cuba. Una opción a tener en cuenta por sus resultados en cultivos y variedades recalcitrantes a la transformación genética mediada por *Agrobacterium*, es el empleo de micropartículas aceleradas. Por otra parte, este método no necesita el cultivo de protoplastos, que resulta especialmente complejo dada la respuesta varietal que tienen las variedades de arroz tipo Indica.²

Diversos métodos para la aceleración de las micropartículas han sido desarrollados desde que Sanford y Klein³ lograron la inclusión del virus del mosaico del tabaco (TMV) junto a la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) en cebolla mediante el bombardeo de micropartículas a células vegetales. Sautter⁴ utilizó macroproyectiles portadores acelerados por la acción de un arco eléctrico en una gota de agua, Takenchi y col.⁵ lograron la aceleración de los macroproyectiles mediante el empleo de bajas presiones de helio. Finer y col.⁶ construyeron una pistola que acelera a las micropartículas mediante una corriente de gas, sin el empleo de macroproyectiles que llamaron "Particle Inflow Gun" (PIG). Con este aparato barato y sencillo (Fig. 1) se han obtenido altos niveles de actividad transcritiva y estable en suspensiones celulares de maíz y soya.⁷ En la actualidad este último sistema creado y desarrollado para plantas, ha sido empleado con efectividad en células tan pequeñas como levaduras, hongos filamentosos y algas, y recientemente, en líneas celulares y células de tejidos animales.

Siempre que se emplee un material vegetal diferente como blanco de

la transformación con partículas aceleradas hay que tener en cuenta el ajuste de diversos factores que afectan la eficiencia de la técnica. En este trabajo se evalúa por primera vez, la eficiencia de esta metodología en la transformación genética de una variedad cubana y se determinan las condiciones óptimas. Se realizó la transformación transiente en embriones inmaduros utilizando un "Particle Inflow Gun" para la aceleración de los microproyectiles. Se han estudiado los factores tamaño de partícula y su concentración en el bombardeo, la presión del gas helio, distancia de vuelo y la manipulación de los explantes, incluyendo el tratamiento osmótico.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Las plantas de arroz (*Oryza sativa*) variedad Amistad 82 (semillas suministradas por el Instituto de Investigaciones del Arroz, Cuba) se crecieron en casas verdes en suelo negro fertilizado con fórmula completa y con riego diario, utilizando macetas sin drenaje, 17 h luz y humedad relativa del 50 % por el día y 75 % en la noche.

Medios de cultivo

En todos los casos, se utilizó el medio MSE (MS⁸ con agar 0,6 % y con 400 mg/L de hidrolizado de caseína) como medio basal, el cual se modificó según fue necesario.

Extracción y cultivo de embriones

Se colectaron espigas entre los 9 y 11 d después de la antesis, a las que se les eliminó toda la cubierta. El grano totalmente desnudo se embe-

bió durante 1 min en etanol 90 %; se pasó de inmediato a una disolución de hipoclorito de sodio 6 % por 20 min y se lavó tres veces con agua destilada estéril antes de comenzar la extracción de los embriones. Los embriones colectados se colocaron con el escutelo hacia arriba en placas con medio MSE2-3 %, (MSE con 2 mg/L de 2,4-D y 3 % de sacarosa) y se cultivaron durante 7 d a la oscuridad a 27 °C para el estudio de la influencia del tamaño de partícula y para el resto de las pruebas, se utilizaron embriones sin cultivar.

Plasmólisis de los embriones

Los embriones colectados se colocaban temporalmente en medio MSE2-3 %, mientras se completaba la extracción. Después del aislamiento fueron parcialmente plasmolizados según el protocolo siguiente: incubación durante 60 min en MSE2-15 % (MSE con suplemento de 2 mg/L de 2,4-D y 15 % de sacarosa); bombardeo y 24 h más tarde colocación nuevamente en MSE2-3 %. Para el tratamiento control sin plasmólisis, se incubaron los embriones durante los 60 min previos al bombardeo en MSE2-3 %, se realizó éste y 24 h después fueron transferidos a MSE2-3 % fresco.

Preparación del ADN

Se utilizó el plasmidio pCintGUS⁹ que contiene el gen reportero *uidA* (*gus*) bajo un promotor constitutivo en plantas. El plasmidio fue purificado utilizando columnas QUIAGEN (Hilden, Alemania), según el protocolo recomendado por el fabricante.

Preparación de las micropartículas

El recubrimiento de las micropartículas de oro, se realizó según el

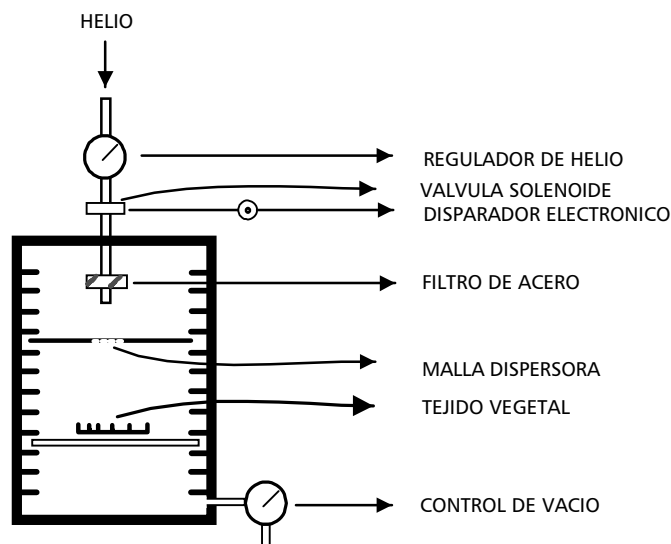


Fig. 1. Esquema del acelerador de micropartículas «Particle Inflow Gun».

protocolo de Klein y col.¹⁰ En un tubo de centrifuga de 0,5 mL se mezclan 20 μ L de ADN plasmídico (1 μ g/ μ L) con 500 μ L de una suspensión de micropartículas (Aldrich Chemicals, EUA) a 50 μ g/ μ L. La mezcla se trata con 25 μ L de CaCl_2 1 mol/L y 10 μ L de espermidina 100 mmol/L y se deja reposar por 10 min a 4 °C. Posteriormente, se elimina el sobrenadante, se lava tres veces con 100 μ L de etanol absoluto y se seca en flujo de aire estéril. Se resuspende en agua destilada estéril a la concentración deseada.

Bombardeo de embriones

La pistola se construyó de acuerdo con el modelo de Finer de 1992,⁹ manteniendo las especificaciones del modelo original y ajustando las condiciones de evacuación de los gases para reducir el impacto acústico y la presión de gas sobre el explante. En todos los casos, se utilizaron embriones recién extraídos, excepto en el experimento relacionado con el estudio de la influencia del tamaño de partícula, en el que se utilizaron embriones somáticos. El bombardeo se realizó a la región central de las placas Petri, ocupando un área de 2,5 cm de diámetro, a razón de 25 embriones por placa. Se utilizó una malla dispersora de 500 μ m colocada a 2,5 cm de distancia de los embriones. Se bombardearon 10 μ L de la suspensión de partículas cargadas con ADN.

Identificación del tejido transformado

La optimización de las condiciones de bombardeo fue evaluada mediante el método de detección histoquímica, que permite la identificación del tejido transformado por la actividad enzimática GUS en presencia del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilglucuronido (X-Gluc), la cual origina el precipitado insoluble 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro índigo de color azul intenso.¹¹ El número de eventos de transformación transitoria fue determinado 48 h después del bombardeo. Los embriones se pasaron a un tubo que contenía la disolución de ensayo y se incubaron 24 h a 37 °C en la oscuridad. Los embriones se observaron en el microscopio estereoscópico y se contaron los puntos azules correspondientes a los eventos donde ocurrió transformación transitoria.

Procesamiento estadístico

A los datos obtenidos se les comprobó la normalidad por la prueba de

Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas por la de Bartlett.¹² Los datos se evaluaron estadísticamente por un análisis de varianzas de clasificación simple. Las medias se compararon por la prueba de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSION

La transferencia de genes a las células del escutelo de embriones ha sido posible a través de la aceleración de las micropartículas cargadas con ADN. Varios son los trabajos que reportan el uso de esta tecnología en la transformación de embriones de cereales y otras plantas monocotiledóneas.^{4,13-15} El bombardeo de micropartículas permite ajustar con un alto grado de flexibilidad las diferentes condiciones para el disparo tales como la distribución de las partículas (idealmente una partícula por célula), la profundidad de su penetración en el tejido a transformar, pudiendo alcanzar varias capas de células y la cantidad de ADN introducido en la célula.¹⁶

El cultivo del arroz, por su importancia en la dieta mundial y las alteraciones que tienen sus rendimientos como consecuencia del ataque de insectos y de agentes fitopatogénicos (hongos y bacterias), ha sido abordado por diferentes laboratorios. Los resultados han correspondido fundamentalmente a las variedades tipo Japónica. Se ha descrito que un explante apropiado para la introducción directa de genes de interés en estas variedades lo constituyen los embriones inmaduros, entre 9 y 12 d después de la fecundación (en este estadio, los embriones alcanzan un tamaño aproximado de 5 mm, lo que facilita su extracción). A partir de éstos, se obtienen embriones somáticos mediante el cultivo en medio con 2,4-D. En el trabajo se emplearon tanto embriones recién extraídos, como cultivados por una semana en presencia de 2,4-D con el objetivo de inducir la formación de los somáticos.

Se evaluó la influencia del tamaño de las partículas portadoras de ADN en la eficiencia de transformación. En este momento es importante tener en cuenta el tamaño de las células a transformar. Un criterio ya generalizado es disparar partículas de alrededor de 1/10 del tamaño de las células.¹⁷ No se observaron diferencias significativas en cuanto al número de puntos de transformación por disparo, para el intervalo de tamaño de partícula entre 0,6 y 1,9 μ m

(Tabla 1), aunque se debe señalar que sobre este aspecto puede haber influido la heterogeneidad de talla de las partículas, así como la del material vegetal utilizado, debida fundamentalmente a diferentes grados de madurez de los embriones.

La observación al microscopio electrónico de los embriones bombardeados permitió apreciar que para este proceso con partículas de menor tamaño (0,6 y 0,8 μ m) los puntos azules que indicaban actividad transiente se situaban casi exclusivamente en la epidermis del escutelo, mientras que para las de mayor tamaño y a su vez, más heterogéneas, esos puntos aparecían tanto en la capa de células epidérmicas como en las subepidérmicas, indicando probablemente que la fracción de partículas más pequeñas se detenía en la superficie, mientras la fracción de las más grandes alcanzaba la subepidermis. Si se pretendiera obtener regeneración de plantas pasando por un estadio de calle, como en este caso, esta diferencia no es fundamental, ya que los callos se formarían a partir de células de los dos tipos, pero si se pretendiera obtener plantas a partir de una organogénesis directa, sería importante tener en cuenta esta distribución de los puntos de transformación transiente, ya que en este caso, las plantas se formarían a partir de las células subepidérmicas solamente¹⁸ correspondiendo con una fracción del total de puntos azules. En este caso, sería mejor utilizar partículas mayores de 0,8 μ m.

El aumento de la concentración de micropartículas en las condiciones analizadas provocó una disminución en el número de puntos azules (Tabla 1). Probablemente esta disminución se deba a su agregación. Se observó un aumento en los daños causados al tejido que afectaban drásticamente al tejido vegetal ocasionando la aparición de áreas necrosadas y liberación de compuestos fenólicos. Es posible además, que particularmente las células impactadas sufrieran daños severos que impidieran la expresión transiente. Considerando los daños ocasionados al tejido y el número de eventos de actividad transitoria, la concentración óptima estuvo en el intervalo de 0,25 a 0,5 $\cdot 10^9$ partículas/ μ L.

Para el estudio de la influencia del tamaño de las partículas, se bombardearon tres placas, en el caso de la concentración de partículas se utilizaron cinco placas, para la presión

Tabla 1. Influencia de las condiciones evaluadas sobre la eficiencia de transformación transiente.

Condiciones evaluadas	Tamaño de las partículas (µm)	Concentración de las partículas (partículas/µL)	Presión de gas helio (Pa)	Distancia de la malla (cm)	Distancia total de vuelo (cm)	Puntos de transformación por embrión
Tamaño de las partículas (µm)	0,6	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	327*
	0,8	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	307*
	1,0	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	263*
	1,2	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	214*
	1,4	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	242*
	1,6	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	360*
	1,9	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	279*
Concentración de las partículas (partículas/µL)	1,2	0,25 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	39*
	1,2	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	48*
	1,2	1,0 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	20*
	1,2	2,0 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	11
Presión de gas helio (Pa)	1,2	0,5 · 10 ⁶	4 · 10 ⁵	7,5	10,0	57*
	1,2	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	47*
	1,2	0,5 · 10 ⁶	6 · 10 ⁵	7,5	10,0	64*
	1,2	0,5 · 10 ⁶	7 · 10 ⁵	7,5	10,0	32*
Distancia de vuelo (cm)	1,2	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	5,0	7,5	30*
	1,2	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	7,5	10,0	49*
	1,2	0,5 · 10 ⁶	5 · 10 ⁵	10,0	12,5	29*

La eficiencia de transformación se expresa como promedio de puntos de transformación por embrión. Los supraíndices en los valores de eficiencia de transformación se refieren a las diferencias significativas dentro de cada una de las condiciones evaluadas.

de helio y la distancia de vuelo se realizaron tres experimentos independientes con seis placas cada uno.

La presión de gas helio y la distancia total de vuelo son factores que afectan la velocidad de los microproyectiles. A mayor presión del gas, mayor velocidad de las partículas, aunque es importante tener en cuenta que también aumenta el flujo de helio el interior de la cámara que no puede ser evacuado de inmediato por el conducto de vacío. Las partículas pierden velocidad debido a la fricción con el aire dentro de la cámara de bombardeo, por lo que a mayor distancia de vuelo menor velocidad de impacto. La distancia de vuelo también aumenta la dispersión de las partículas sobre las células blanco.¹⁷

El estudio de la influencia de la presión de gas helio sobre la eficiencia del disparo mostró que entre 5 · 10⁵ y 7 · 10⁵ Pa no hay diferencias significativas en cuanto al número de células que expresan actividad transitoria, pero a 4 · 10⁵ Pa hay una reducción significativa (Tabla 1). Cuando se emplearon presiones de 6 · 10⁵ y 7 · 10⁵ Pa, aparecieron daños en el tejido, que finalmente ocasionaban la aparición de fenoles que limitaban el desarrollo del embrión y propiciaban la apa-

rición de zonas necrosadas. Los mejores resultados se obtuvieron con una presión de bombardeo de 5 · 10⁵ Pa.

La distancia de vuelo de las micropartículas influyó notablemente en la eficiencia de transformación. La distancia óptima resultó 10 cm. A mayor distancia, disminuía la eficiencia, debido probablemente a la disminución de la velocidad de las partículas. A distancias menores de 10 cm se obtuvo igualmente una disminución en la eficiencia de transformación que pudiera ser consecuencia del daño causado, ya sea por el impacto de aquellas a altas velocidades o por el flujo de gases, lo que se correspondería con los resultados obtenidos a altas presiones de helio.

El choque acústico que se genera durante la aceleración de las partículas a velocidades supersónicas, puede dañar, incluso matar a las células vegetales expuestas al disparo, especialmente cuando están traumatizadas como resultado de la penetración de los microproyectiles y más aún, cuando en estas condiciones son cultivadas en medio selectivo. El empleo de la malla dispersora ubicada entre el soporte de las partículas a disparar y las células blanco, reduce los daños que se le producen al tejido en el momento del disparo.¹⁸

Las mallas reducen el impacto sobre el tejido, con lo que se observa una alta eficiencia de transformación.

Se estudió la distancia a la cual debería ubicarse el material vegetal, así como el tamaño de los orificios de la malla. Al usar mallas de 500 y 1 000 µm, se observó un aumento del número de eventos de actividad transitoria en comparación con la efectividad lograda en los disparos sin malla.

Los efectos de las condiciones osmóticas han sido evaluados tanto para la expresión transiente como para la transformación estable en diferentes cultivos, incorporando altas concentraciones de sacarosa, manitol y (o) sorbitol a los medios sólidos empleados previa y posteriormente al bombardeo. El ajuste de la presión osmótica en el bombardeo de las micropartículas fue descrito por Sanford y su grupo en 1991¹⁹ para la transformación de cloroplastos y en 1992 por Perl y col.²⁰ en eventos de transformación estable en calllos originados del escutelo de trigo. Al bombardear embriones parcialmente plasmolisados en medio MSE2-15 % antes del disparo, se observó un incremento significativo del número de células que expresaban actividad GUS con respecto al

control en el que los embriones fueron mantenidos en el mismo medio con un 3% de sacarosa (Tabla 2). Este resultado pudiera deberse a que la plasmólisis del embrión antes del bombardeo y una lenta recuperación de la turgencia celular posterior a él, contribuyan a la supervivencia de las células^{20,21} o que el tratamiento disminuya el daño físico a ella. La recuperación paulatina de la presión normal por decrecimiento de la concentración de sacarosa puede inducir la división de las células²² lo que podría favorecer la multiplicación de las transformadas. Es posible también que este procedimiento facilite la penetración de las micropartículas a la célula o que disminuya la cantidad de ADN que las partículas pierden antes de entrar en aquella. La posibilidad de que este tratamiento influya en la estabilidad del ADN plasmídico dentro de la célula parece poco probable.

La permanencia prolongada de los embriones en medios con altas concentraciones de sacarosa provoca daños que afectan la formación de callos con alto poder de regeneración,²³ por lo que a las 24 h de bombardeados, los embriones se transfirieron a medio MSE2-3%. La influencia del tiempo de permanencia en este medio, luego del bombardeo, no fue estudiada por lo que pudiera ser objeto de estudio y optimización.

En los experimentos realizados en este trabajo, los mejores resultados del bombardeo al escutelo de embriones se obtuvieron utilizando los somáticos bombardeados bajo las condiciones siguientes: presión de helio de $5 \cdot 10^5$ Pa, distancia de vuelo de 10 cm, tamaño de partícula de $1,2 \mu\text{m}$, concentración de partículas por microlitro de $0,25 \cdot 10^9$ y uso de malla dispersora de $1\,000 \mu\text{m}$. Por otra parte, la plasmólisis parcial de los embriones aumentó la eficiencia de la transformación. La combinación de estos factores debe permitir la obtención de eficiencia aún superiores.

Las pruebas de actividad GUS practicadas a los escutelos que fueron cultivados por 6 semanas después del disparo mostraron embriones totalmente coloreados de azul, lo que sugiere la presencia de integración estable del gen *uidA*.

Estos resultados indican la potencialidad del método de transformación por bombardeo de micropartículas para la obtención de plantas

Tabla 2. Efecto del tratamiento osmótico antes del bombardeo en la expresión transitiva GUS.

Tratamiento osmótico	Puntos azules/embrión	Embriones
No	13	100
Si	82	100

transgénicas de la variedad de arroz Amistad 82 y posiblemente de otras variedades de tipo Indica.

BIBLIOGRAFIA

- Potrykus I. Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**, 205, 1991.
- Jones T.J. and Rost T.L. Histochemistry and ultrastructure of rice (*Oryza sativa*) zygotic embryogenesis. *American Journal of Botany*, **76**, 504, 1989.
- Sanford J. and Klein T. Delivery of substances into cells and tissue using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*, **5**, 27, 1987.
- Sautter C., Waldner H., Neuhaus-Url G., Galli A., Neuhaus G. and Potrykus I. Microtargeting: high efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of microprojectiles. *Bio/Technology*, **9**, 1080, 1991.
- Takenchi Y., Dotson M. and Keen N. Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Molec. Biology*, **18**, 835, 1992.
- Finer J., Vain P., Jones M. and McMullen M. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports*, **11**, 323, 1992.
- Vain P., Keen N., Murillo J., Rathus C., Nemes C. and Finer J. Development of the particle inflow gun. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **33**, 237, 1993.
- Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **15**, 473, 1962.
- Jefferson R. A., Kavanagh T.A. and Bevan M.W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J.*, **6**, 3901, 1987.
- Klein T.M., Wolf E.D., Wu R. and Sanford J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, **327**, 70, 1987.
- Jefferson R.A. Assaying Chimeric genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Molecular Biology Reporter*, **5**, 387, 1987.
- Sigarroa A. Biometría y diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de La Habana. 1985.
- Chibbar R., Kartha K., Leung N., Qureshi J. y Caswell K. Transient expression of marker genes in immature zygotic embryos of spring wheat (*Triticum aestivum*) through microprojectile bombardment. *Genome*, **34**, 453, 1991.
- Li H., Yang X., Hu D., Liu J. and Guo Z. Protoplasts culture and plant regeneration of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Botanica Sinica*, **33**, 706, 1991.
- Casas A., Kononowicz A., Zehr U., Tomes D., Axtell J., Butler L., Bressan R. and Masegawa P. Transgenic *Sorghum* plants via microprojectile bombardment. *P.N.A.S. USA*, **90**, 1212, 1993.
- Iglesias V.A., Gisel A., Bilanz R., Leduc N., Potrykus I. and Sautter C. Transient expression of different marker genes in meristem cell of wheat immature embryos after ballistic micro-targeting. *Planta*, **192**, 84, 1994.
- Sanford J.C., Smith F.D. and Russell J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*, **217**, 463, 1993.
- Sanford J., Devit M., Russell J., Smith F., Harpending P., Roy M. and Johnston M. An improved helium-driven biolistic device. *Technique*, **3**, 3, 1991.
- Perl A., Kless H., Blumenthal A., Gali G. and Galun E. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization of culture conditions and DNA-microprojectiles delivery procedures. *Mol. Gen. Genet.*, **235**, 279, 1992.
- Bilanz R., Zhang S., Leduc N., Iglesias V., Gisel A., Simmonds J., Potrykus I. and Sautter C. Transient genes expression in vegetative shoot apical meristem of wheat after ballistic micro targeting. *The Plant Journal*, **4**, 735, 1993.
- Norstog K. Induction of embryo-like structures by kinetin in cultured barley embryos. *Dev. Biol.*, **23**, 677, 1970.
- Ghosh-Biswas G., Iglesias V.A., Datta S. y Potrykus I. Transgenic indica rice obtained by direct gene transfer to protoplasts. *Journal of Biotechnology*, **32**, 1, 1994.