

# Transformación de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. subespecie *Indica*) de la Variedad Morelos A-92 con el gen de la SPS de *Synechocystis*

Gamaliel Valdivia Rojas<sup>1</sup>, José Luis Cabrera Ponce<sup>2</sup>, Yazmín Carreón Abud<sup>1</sup> y Miguel Martínez Trujillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria. Morelia, Michoacán, México, 58066.

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Km 9.6 carretera Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, México, 36500

## Resumen

Se transformaron plantas de arroz de la variedad Morelos A-92 con el gen de la Sacarosa Fosfato Sintasa de *Synechocystis*. Para la transformación se utilizó el sistema de producción de callos embriogénicos, biobalística, generación de brotes y finalmente plantas, con el propósito de optimizar algunas de las condiciones del proceso. Se colocaron semillas de arroz de la variedad Morelos A-92 previamente desinfectadas en medio MS adicionado con 2,4-D y al término de 7 días se obtuvieron callos embriogénicos, los cuales fueron utilizados para ensayos de selección en diferentes concentraciones de higromicina y también para ensayos de regeneración utilizando diferentes concentraciones de ANA y BAP. Los callos embriogénicos se transformaron mediante biobalística, utilizando los plásmidos pCAMBIA 1301, el cual confiere resistencia a higromicina, y pUISPSSy, el cual contiene el gen de la SPS de *Synechocystis* fusionado al promotor CaMV 35S. Se encontró que una concentración de 50 mg/L de higromicina es suficiente para seleccionar de manera eficiente a los callos embriogénicos. En el ensayo de regeneración sólo se obtuvieron brotes de buen tamaño en el medio adicionado con 2 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de ANA, a los 25 días. El análisis molecular por PCR confirmó la integración del gen reportero uidA y del gen SPS de *Synechocystis*.

**Palabras clave:** Arroz, callo embriogénico, regeneración, transformación.

## Abstract

Rice plants from the variety Morelos A-92 were transformed with the Sucrose Phosphate Synthase gene of *Synechocystis*. The system of production of calli, biolistic, shoots regeneration and generation of plants was used to optimize some conditions of the process. Seeds of rice were disinfected and cultivated in MS media added with 2,4-D, for 7 days to obtain calli; these were used for selection assays in different concentrations of hygromycin and for regeneration using different NAA and BAP concentrations. The calli were transformed with biolistic, using the pCAMBIA1301 plasmid, which confers hygromycin resistance, and the pUISPSSy plasmid, which contains the SPS *Synechocystis* gene fused to the CaMV 35S promoter. It was found that a concentration of hygromycin 50 mg/L is sufficient to select effectively the embryogenic calli. In the regeneration assay there were obtained shoots only in the media added with BAP 2 mg/L and NAA 0.5 mg/L, at 25 days. The molecular analysis by PCR confirmed the integration of the transgenes uidA and SPS of *Synechocystis*.

**Key words:** Rice, embryogenic calli, regeneration, transformation.

## Introducción

El arroz es parte importante de la alimentación de cerca de 3 mil millones de personas tan sólo en Asia, por lo que es la planta comestible más importante para el hombre. El arroz ocupa el tercer lugar después del maíz y el trigo entre los cereales que se utilizan para la alimentación humana en México, tanto en producción como en consumo. De la superficie sembrada, más del 50% se realiza bajo condiciones de temporal, de ahí la importancia que representa esta modalidad (INIFAP-CIRNO, 2003). En México el programa de mejoramiento genético de arroz emprendido por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) ha tenido buenos resultados, se han liberado variedades importantes de arroz *Indica* cultivadas en condiciones de riego con un alto rendimiento y calidad culinaria para las diferentes zonas con potencial para la producción de arroz. Para la variedad Morelos A-92 se reporta un rendimiento entre 8 y 11 toneladas por hectárea dependiendo de las condiciones, presenta excelente calidad molinera, aceptable

calidad culinaria y resistencia al hongo *Pyricularia oryzae* Cav (Salcedo-Aceves, 1993).

Para la transformación genética de cualquier especie de planta, es imprescindible contar con un protocolo optimizado para la regeneración a partir del tejido previamente transformado, por lo que es de suma importancia ajustar adecuadamente las condiciones de manejo *in vitro* de acuerdo a cada especie y variedad. En México, las variedades cultivadas son en su mayoría del tipo *Indica*, las cuales son más recalcitrantes a la transformación genética con respecto a las variedades de la subespecie *Japonica*.

El éxito temprano en la producción de plantas de arroz transgénicas fue divulgado en 1988 para las variedades de *Japonica* (Zhang y Wu, 1988) y en 1990 para una variedad *Indica* (Peng *et al.*, 1990). Se ha utilizado callo embriogénico y la transformación por biobalística en variedades *Indica* que son difíciles de regenerar obteniendo un porcentaje entre 1 y 5% (Fauquet *et al.*, 1995). Sivamani *et al.* (1996) reportan la transformación de callos embriogénicos utilizando medios

líquidos, de una variedad *Indica*, TN1, mediante bombardeo con partículas, obteniendo el 3% de eficiencia de transformación. Sin embargo, el utilizar medios líquidos aumenta la probabilidad de contaminación, por lo que posteriormente se utilizaron callos embriogénicos derivados de semillas pero sin pasar por un cultivo en medio líquido previo al bombardeo con el ADN (Valdez *et al.*, 1998). Este procedimiento fue utilizado en la variedad Morelos A-92 por Martínez-Trujillo *et al.* (2003) para el estudio de la expresión de un promotor fusionado al gen reportero *uidA*. Recientemente, la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ha sido utilizada con éxito (Hiei *et al.*, 1994; Toki, 1997), sin embargo, no se ha superado la limitante de la baja eficiencia de transformación en la subespecie *Indica* mediante este sistema (Kumar *et al.*, 2005).

Una de las estrategias en el mejoramiento de plantas por transformación genética se enfoca a incrementar la producción de sacarosa y su eventual incremento en la producción de grano. La sacarosa puede ser utilizada directamente por la glucólisis o desplazarse dentro de la planta como carbohidrato soluble a través del floema. Cuando la sacarosa es exportada a los tejidos heterotróficos, se utiliza para el mantenimiento del metabolismo, la biosíntesis de pared celular, la respiración celular o se convierte a almidón para almacenarse como reserva. (Sturm, 1999; Kutschera y Heiderich, 2002). La sacarosa fosfato sintasa (SPS, EC 2.4.1.14) cataliza la penúltima reacción en el camino de la biosíntesis de la sacarosa, a partir de UDP-glucosa (UDPGlc) y de fructosa-6-fosfato (Fru6P) obteniendo sacarosa-6-fosfato (Suc6P) (Lunn y Rees, 1990).

La SPS es una enzima altamente regulada en plantas. Además de la regulación alostérica por la Glc6P y el ortofosfato (pi), en la espinaca (*Spinacia oleracea* L.), la SPS de la hoja se activa por luz y es desactivada en la oscuridad por desfosforilación y fosforilación, respectivamente (Siegl *et al.*, 1990; Huber y Huber, 1996). La fosforilación de la SPS en plantas, se ha reportado en diferentes sitios de serina: 158 en espinaca (Siegl *et al.* 1990; Huber y Huber, 1996) y 162 en el maíz. (Huber y Huber, 1996).

Con el propósito de evadir la regulación de la sacarosa fosfato sintasa, se han aislado diferentes genes que codifican para estas enzimas y se han introducido en otras especies. Se reportó la expresión de la SPS de maíz en plantas transgénicas del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), con un aumento en la actividad de la enzima en las hojas y cambio en el balance de fotoasimilables, de almidón hacia la sacarosa (Worrell *et al.*, 1991). Se ha reportado que el gen de la SPS de *Arabidopsis thaliana* mejora el funcionamiento fotosintético en bajas temperaturas y aumenta la tolerancia a las heladas (Strand *et al.*, 2001; Signora *et al.*, 1998). En plantas de algodón transformadas (*Gossypium hirsutum* L.), con alta actividad de la SPS se mejoró tanto la calidad como el tamaño de la fibra, mostrando con ello un alto rendimiento con respecto a las plantas no transformadas (Haigler *et al.*, 2001). En árboles híbridos del álamo (*Populus tremulata*) con aumento en la actividad de la SPS, se demostró un aumento en la fotosíntesis y altas tasas de crecimiento (Mouillon y Hurry, 2001).

La SPS de *Synechocystis* sp. PCC 6803 difiere de la enzima de las plantas en ser insensible a Glc6P y en ser inhibida débilmente por Pi (Lunn y Furnbank, 1999). Sin embargo, una característica aún más interesante es que la SPS de *Synechocystis*

carece de todos los sitios conocidos de fosforilación encontrados en las SPS de plantas (Lunn *et al.*, 1999). Estas observaciones sugieren que la SPS de cianobacteria no está sujeta a la regulación por la fosforilación de la proteína. Para investigar los efectos de expresar la SPS de cianobacterias en plantas, el gen de la SPS de *Synechocystis* se ha introducido en tabaco y tomate bajo el control del promotor CaMV 35S, y en el arroz subespecie *Japonica*, bajo el control del promotor del maíz *Ubi1*. En ambos casos no hubo un incremento significativo en la síntesis de sacarosa por razones no conocidas (Lunn *et al.*, 2003). En este trabajo se reporta la transformación de plantas de arroz *Indica*, con el gen de la SPS de *Synechocystis*, en una variedad de importancia en México (Morelos A92).

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se utilizaron semillas de arroz *Indica*, de la variedad Morelos A-92 obsequiadas por el INIFAP, Campo Experimental Zacatepec, Morelos.

### Plásmidos

Se utilizaron los siguientes vectores: a) pUISPSSy, que contiene el gen de la Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS) de *Synechocystis* fusionado al promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor. b) pCAMBIA 1301, vector con expresión del gen reportero *uidA* (GUS), para dar seguimiento a la expresión transitoria en callos embriogénicos y que también confiere resistencia a higromicina para la selección de callos embriogénicos transformados.

### Inducción de callos embriogénicos

Para la desinfección de semillas, se hizo un lavado inicial con agua destilada, enseguida se trataron con etanol al 70% por 5 minutos y después con hipoclorito de sodio al 6% (Cloralex®) por 40 minutos; por último se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Para la generación de callos embriogénicos derivados de semillas se utilizó el medio MS (Phytotechnology Laboratories M519)(Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 3%, gelrite (Merck) y 2,4-D (2.5 mg/L); este medio se conoce como de inducción. La incubación se llevó a cabo en la oscuridad a 28°C durante 7 días. Los callos embriogénicos de tamaño aproximado a 5 mm de diámetro se seleccionaron para los diferentes tratamientos.

### Optimización de la selección de callos embriogénicos en higromicina

Los callos embriogénicos se colocaron en el medio de inducción adicionado con diferentes concentraciones de higromicina, tomando como referencia 30, 40, 50, 60 70 y 80 mg/L. La selección se llevó a cabo en la oscuridad a 28°C, durante 6 semanas.

### Optimización de la regeneración de callos embriogénicos

Se probaron diferentes relaciones de ANA y BAP en medio de regeneración (MS, sacarosa 3%, gelrite 0.25% (Merck), bencilaminopurina y ácido naftalenacético), para la regeneración de los callos embriogénicos a brotes. Se cultivaron a 28°C con un

fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

### Condiciones de bombardeo

Los callos embriogénicos de aproximadamente 5 milímetros, se colocaron en medio MS adicionado con 2.5 mg/L de 2,4-D, durante 24 horas. Se bombardearon los callos embriogénicos siguiendo las condiciones reportadas por Valdez *et al.* (1998), usando el equipo BioRad Helium PDS-1000/He a 900 psi. Después del bombardeo los callos se mantuvieron durante 3 días en el mismo medio. Posteriormente se les realizó la prueba histoquímica de GUS para verificar la expresión transitoria de acuerdo a Stomp (1992).

### Detección de transgenes

La extracción de ADN de plantas se realizó mediante el DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la amplificación por PCR del gen *uidA* (GUS) se utilizaron los oligonucleótidos específicos OP-36 y OP-37 (Martínez-Trujillo *et al.*, 2003). Para la amplificación del gen *SPS* de *Synechocystis* se diseñaron oligonucleótidos específicos hacia ambos extremos del gen. Se utilizó la enzima *Taq* de la empresa Fermentas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador

Eppendorf modelo 2510 con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C durante 4 minutos, 30 ciclos (95°C durante 1 minuto, 60°C durante 45 segundos, 72°C durante 90 segundos) y un ciclo de 7 minutos a 72°C.

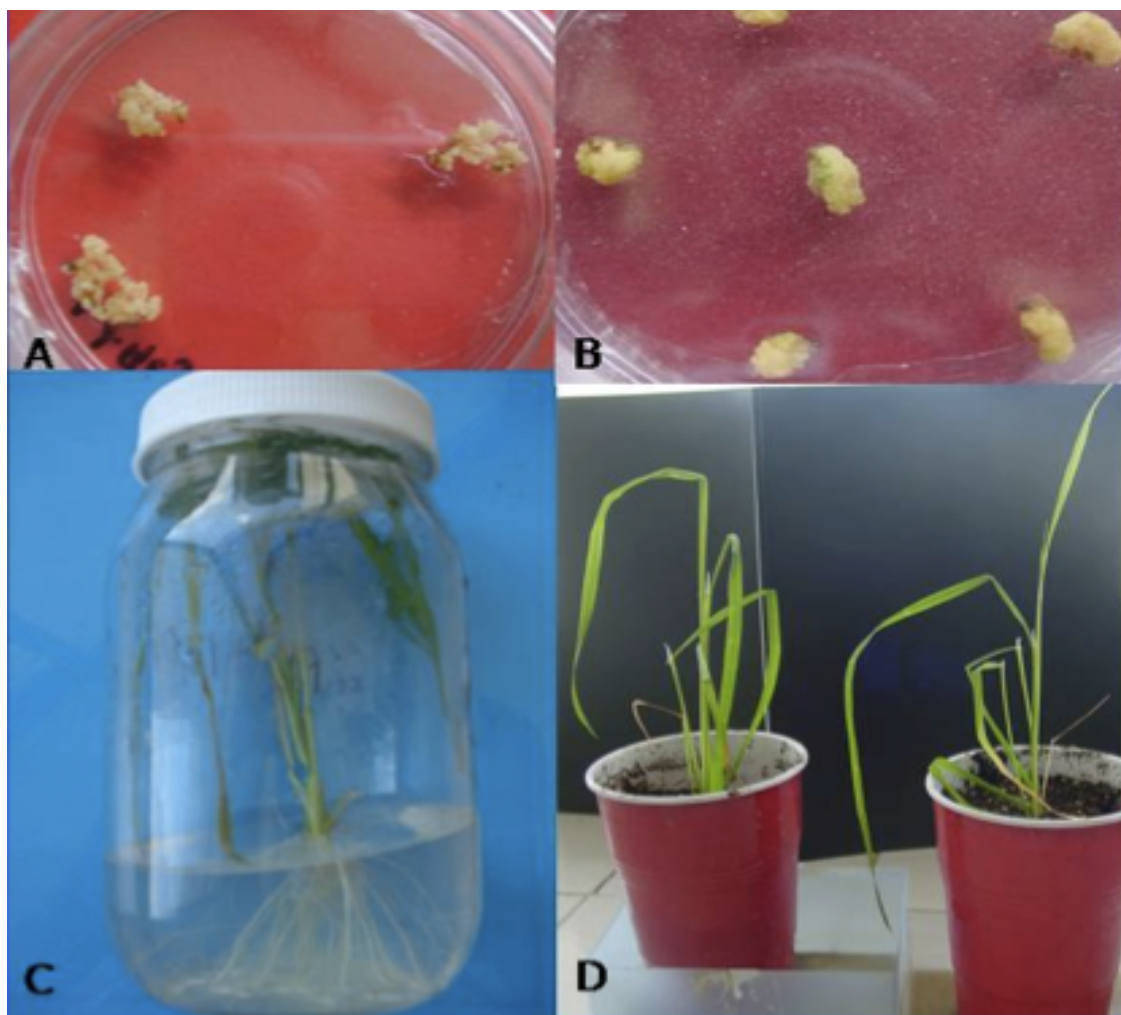
## Resultados

### Ensayo de regeneración

Las semillas de arroz previamente desinfectadas fueron puestas en medio MS adicionado con 2.5 mg/l de 2,4-D, se mantuvieron en este medio hasta que los callos embriogénicos alcanzaron aproximadamente 5 milímetros (a los 6 días), después fueron transferidos a medio MS adicionado con 0.5 mg/L de ANA y diferentes concentraciones de BAP. Al final de los 25 días se encontró que los callos embriogénicos que fueron sometidos a la concentración de 2 mg/L de BAP el 12.5% de los callos generaron brotes (Tabla 1, figura 1). En los siguientes ensayos se utilizó la concentración de hormonas anterior para regenerar las plantas.

### Ensayos de resistencia a higromicina en callos embriogénicos de arroz

Se obtuvieron callos embriogénicos de arroz de 8 días y se



**Figura 1.** Regeneración de callos embriogénicos con resistencia a higromicina. **a)** Callo resistente a higromicina en medio de regeneración. **b)** Callo embriogénico generando brotes. **c)** Plantas enraizadas en medio MS. **d)** Plantas transformadas en aclimatación en suelo.

Combinación de hormonas	Número de callos	Número de callos que iniciaron la diferenciación	Número de brotes en buen estado
ANA 0.5 mg/L + 0 mg/L BAP	40	0	0
ANA 0.5 mg/L + 2.0 mg/L BAP	40	24	5
ANA 0.5 mg/L + 5.0 mg/L BAP	40	24	2
ANA 0.5 mg/L + 7.5 mg/L BAP	40	28	1
ANA 0.5 mg/L + 10 mg/L BAP	40	20	1

**Tabla 1.** Efecto de la combinación de hormonas sobre la producción de brotes a partir de callos embriogénicos de arroz

sometieron a diferentes concentraciones de higromicina (0, 25, 50, 75 y 100 mg/L) donde fueron subcultivados cada dos semanas, durante seis semanas. En este ensayo se encontró que a una concentración de 50 mg/L de higromicina los callos embriogénicos se morían de una manera eficiente y uniforme. En concentraciones menores, los callos embriogénicos todavía presentaban crecimiento y a concentraciones mayores presentaban una muerte rápida y un aspecto mucilaginoso. Para los ensayos de transformación posteriores se utilizó la concentración de 50 mg/L (**Figura 1**).

Obtención de callos embriogénicos con resistencia a higromicina, co-bombardeados con pCAMBIA1301 y pUISPSSy

Se bombardearon 64 callos embriogénicos derivados de semillas de arroz, con el ADN de los vectores pCAMBIA1301 y pUISPSSy. Los lotes de callos bombardeados fueron sometidos a selección en medio MS con higromicina 50 mg/L. Los callos se subcultivaron cada 2 semanas durante 6 semanas. Los callos resistentes a higromicina se transfirieron a medio de regeneración, en el cual permanecieron por 25 días y se obtuvieron brotes de aproximadamente 3 cm. Los brotes se pasaron a medio de enraizamiento y después a recipientes con tierra dentro del laboratorio, para su aclimatación. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2.

### **Análisis de la presencia de los genes *uidA* y SPS de *Synechocystis* (*spssy*) en plantas co-transformadas con los plásmidos pCAMBIA1301 y pUISPSSy**

El ADN de dos plantas potencialmente transformadas fue extraído y se analizó la presencia de los genes *uidA* y *spssy*. Se amplificaron los fragmentos esperados de 1100 pb y 2200 pb, para los genes mencionados, respectivamente. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con las condiciones reportadas en materiales y métodos (**Figura 2**).

## **Discusión**

Una de las estrategias para modificar la síntesis de sacarosa ha sido la de sobre expresar genes que codifican para las enzimas

sacarosa fosfato sintasas (SPS), de una especie en otra especie diferente, para evadir las respuestas de regulación. En el arroz fue reportado primeramente un gen de sacarosa fosfato sintasa por Valdez-Alarcón (1996), el cual fue denominado como *spS1*, del cual ha sido estudiada su región reguladora, determinando que hay expresión en el escutelo de semillas en germinación y en el parénquima fotosintético de las hojas; asimismo, hay una tasa baja de transcripción y existen mecanismos de regulación post-transcripcionales que potencian la traducción (Martínez-Trujillo *et al.* 2003, Martínez-Trujillo *et al.*, 2004). Con la secuenciación del genoma del arroz, tanto en la subespecie *Japonica* como *Indica*, se encontró que existen 5 genes que codifican para SPS, entre ellos *spS1*, sin embargo, sólo se conoce información sobre la expresión para este último, por lo que pudiera haber diferentes actividades de SPS para diferentes propósitos específicos.

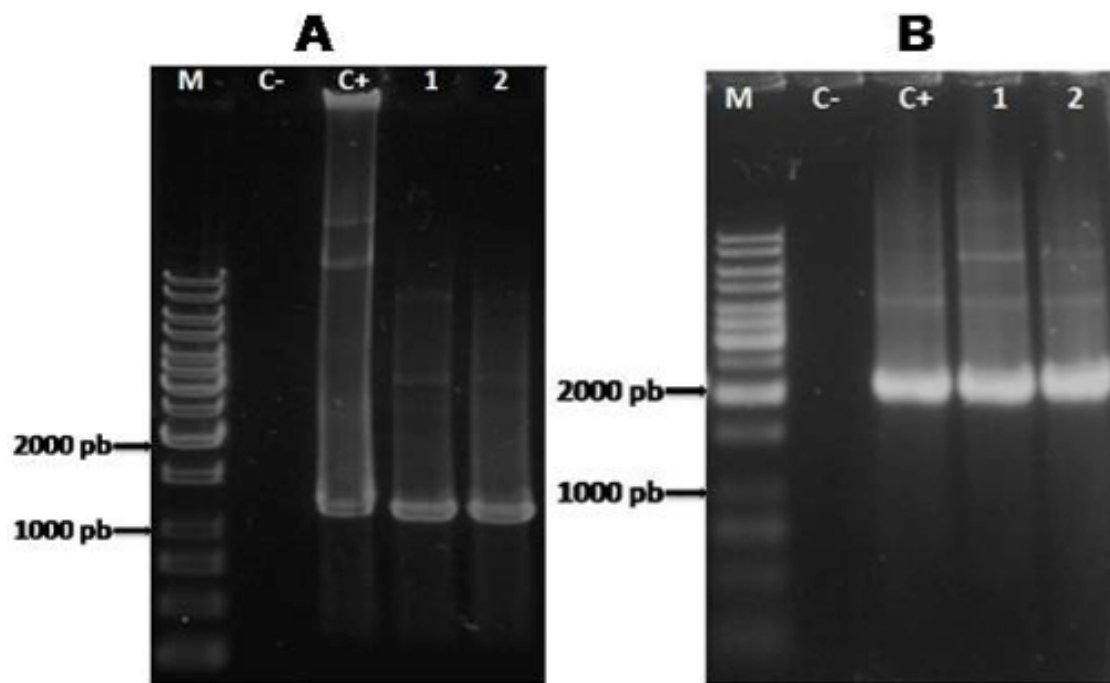
La enzima SPS de *Synechocystis* sp. PCC 6803 difiere de las enzimas de las plantas en ser insensible a Glc6P y en ser inhibida débilmente por Pi (Lunn *et al.*, 1999). Además, carece de todos los sitios conocidos de fosforilación encontrados en las SPS de plantas, lo que hace que no esté sujeta a la regulación o a la inactivación alostérica por la fosforilación de la proteína, lo que supuestamente permitiría incrementar la síntesis de sacarosa, que se canalizaría para la síntesis de otros carbohidratos complejos, entre ellos el almacenamiento de almidón en las semillas. El gen de esta cianobacteria ya ha sido utilizado para transformar plantas de tabaco, tomate y una variedad de arroz de la subespecie *Japonica*, sin un incremento significativo en la síntesis de sacarosa (Lunn *et al.*, 2003). No obstante lo anterior, es conocido que la integración de los genes es al azar y es posible que la expresión obtenida no sea la adecuada, por lo que es conveniente realizar nuevas pruebas al respecto y utilizar incluso nuevas variedades.

En este trabajo fue posible transformar plantas de arroz de la variedad Morelos A92 con el gen de la SPS de *Synechocystis*. La selección de callos bombardeados en medios con higromicina fue posible a una concentración de 50 mg/L. La eficiencia de transformación obtenida (3.1%) se encuentra dentro del rango reportado por Valdez *et al.* (1998) que mencionan eficiencias

**Tabla 2.** Producción de callos, selección en higromicina y transformación con los plásmidos pCAMBIA 1301 y pUISPSSy

Callos bombardeados	Callos resistentes a higromicina	Plantas obtenidas	Plantas positivas para la detección de los genes <i>uidA</i> y SPS	Eficiencia de transformación (%)
64	8	2	2	3.1





**Figura 2.** Análisis de la presencia de los genes *uidA* y *spssy* en plantas co-transformadas con pCAMBIA1301 y pUISPSSy. **A)** Amplificación por PCR del gen *uidA*. **B)** Amplificación por PCR del gen *spssy*. M, marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas). C- Control negativo (planta no transformada), C+ control positivo (Plásmido con el gen correspondiente). 1 y 2, plantas transformadas.

entre 1.7 al 14%. El principal problema que se tuvo en la producción de plantas co-transformadas con el gen *uidA* y el gen SPS de *Synechocystis* consistió en la generación de brotes a partir de callos, ya que sólo 2 de los 8 callos embriogénicos con resistencia a higromicina generaron brote, por lo que se debe hacer más eficiente este paso o bien partir de un número mayor de callos embriogénicos. La integración del gen *spssy* en las plantas de arroz fue posible detectarla mediante la técnica de PCR, sin implicar técnicas de hibridación, lo que permitió evaluar de manera más rápida las líneas obtenidas.

La transformación de plantas de arroz Morelos A-92 con el gen SPS de *Synechocystis* permitió determinar que las condiciones utilizadas son adecuadas y que esto permitirá con la obtención de más líneas de plantas, iniciar una etapa de análisis de éstas para evaluar sus características agronómicas

## Referencias

- Christou P, Ford TL, Kofron M.** 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Biol/Technology* 9: 957-962.
- Fauquet CM, Zhang S, Chen L, Marmey P, de Kochko A, Beachy RN.** 1995. Biolistic transformation of rice: now efficient and routine for Japonica and Indica rices. In: *RICE GENETICS III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium*, pp 153-165.
- Haigler CH, Ivanova-Datcheva M, Hogan PS, Salnikov VV, Hwang S, Martin K, Delmer DP.** 2001. Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Molecular Biology* 47: 29-51.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T.** 1994. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6 (2): 271-282.
- Huber SC, Huber JL.** 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 431-444.
- INIFAP-CIRNO.** 2003. Guía para la Asistencia Técnica Agrícola para el Área de Influencia del Campo Experimental Valle del Fuerte. *Agenda Técnica*, sexta edición. 208 pp.
- Kumar KK, Maruthasalam S, Loganathan M, Sudhakar D, Balasubramanian P.** 2005. An Improved *Agrobacterium*-Mediated Transformation Protocol for Recalcitrant Elite Indica Rice Cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter* 23: 67-73.
- Kutschera U, Heiderich A.** 2002. Sucrose metabolism and cellulose biosynthesis in sunflower hypocotyls. *Physiologia Plantarum* 114: 372-379.
- Li LC, Rongda QU, de Kochko A, Fauquet CM, Beachy RN.** 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Reports* 12: 250-255.
- Lunn JE, Furbank RT.** 1999. Sucrose biosynthesis in C4 plants. *New Phytologist* 143: 221-237.
- Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT.** 2003. Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 223-237.
- Lunn JE, Rees T.** 1990. Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase from seeds of *Pisum sativum*. *The Biochemical Journal* 267: 739-743.
- Martínez-Trujillo M, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L.** 2003. Improvement of Rice Transformation Using Bombardment of Scutellum-Derived Calli. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 429-437.
- Martínez-Trujillo M, Chávez-Bárceñas T, Limones-Briones V, Simpson J, Herrera-Estrella L.** 2004. Functional analysis of the promoter of the rice sucrose phosphate synthase gene (*spS1*). *Plant Science* 166: 131-140.
- Mouillon JM, Hurry V.** 2001. Effects of elevated sucrose phosphate synthase activity on photosynthesis, carbohydrate partitioning

- and growth rate in hybrid aspen (*Populus tremula* sp. *tremuloides*). *En: Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT.* 2003. Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 223-237.
- Murashige T, Skoog FA.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Peng J, Lyznik L, Lee L, Hodges TK.** 1990. Co-transformation of *Indica* rice protoplasts with *gusA* and *neo* genes. *Plant Cell Reports* 9: 168-172.
- Salcedo-Aceves J.** 1993. Morelos A-92 variedad de arroz para el Estado de Morelos. *SARH-INIF, Folleto Técnico* No. 9. México.
- Sato Y, Yokoya S.** 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Reports* 27: 329-334.
- Shimamoto K, Terada R, Izawa T, Fujimoto H.** 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- Siegl G, MacKintosh C, Stitt M.** 1990. Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. *FEBS Letters* 270: 198-202.
- Signora L, Galtier N, Skùt L, Lucas H, Foyer CH.** 1998. Overexpression of sucrose phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* results in increased foliar sucrose/starch ratios and favours decreased foliar carbohydrate accumulation in plants after prolonged growth with CO<sub>2</sub> enrichment. *Journal of Experimental Botany* 49: 669-680.
- Sivamani E, Shen P, Opalka N, Beachy RN, Fauquet CM.** 1996. Selection of large quantities of embryogenic calli from *Indica* rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. *Plant Cell Reports* 15: 322-327.
- Stomp AM.** 1992. Histochemical localization of "β-glucuronidase. *In: Gallagher SR (ed), GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*, pp 103-113, Academic Press, San Diego, CA.
- Strand AÊ , Foyer CH, GardestroÈm P, Hurry V.** 2001. Increased expression of sucrose-phosphate synthase in transgenic *Arabidopsis thaliana* results in improved photosynthetic performance and increased freezing tolerance at low temperatures. *En: Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT.* (2003) Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 223-237.
- Sturm A.** 1999. Invertases: Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7.
- Toki S.** 1997. Rapid and Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 16-21.
- Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, Hinata K.** 1988. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology* 6: 1072-1074.
- Valdez M, Cabrera-Pouce JL, Sudhakar D, Herrera-Estrella L, Christou P.** 1998. Transgenic Central America, West African and Asian elite rice varieties resulting from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants utilizing three different bombardment devices. *Annals of Botany* 82: 795-801.
- Worrell AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, Voelker TA.** 1991. Expression of a maize sucrose-phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *The Plant Cell* 3: 1121-1130.
- Zhang HM, Yang H, Rech T, Golds TJ, Davis AS, Mulligan BJ, Cocking EC, Davey MR.** 1988. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts. *Plant Cell Reports* 7: 379-384.
- Zhang W, Wu R.** 1988. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theoretical Applied Genetics* 76: 835-840.