

Biotechnologie – 'n Nuwe benadering in planteteling

D.I. Ferreira

Navorsingsentrum vir Plantbiotechnologie, Privaat sak X293, Pretoria 0001

Ontvang 18 Oktober 1990; aanvaar 4 Februarie 1991

UITTREKSEL

Konvensionele planteteling het tydens die laaste halfeeu 'n merkwaardige toename in gewasproduksie tot gevolg gehad. Verskeie tekortkominge in die benadering het egter geleenthede vir die toepassing van biotechnologie in planteteling geskep. Die verskillende benaderings op die gebied van selbiologie (weefselkultuur) en molekulêre biologie (rekombinante DNS-tegnologie) word bespreek en die toepassing daarvan in 'n globale benadering tot planteteling word bepleit.

ABSTRACT

Biotechnology – A new approach in plant breeding

Conventional plant breeding has made a significant impact on the increase in crop production during the last half century. Several shortcomings however, opened up the opportunities for the application of biotechnology in plant breeding. The various approaches in the field of cell biology (tissue culture) and molecular biology (recombinant DNA technology) are discussed and the application thereof is advocated in a global approach to plant breeding.

INLEIDING

Die sogenoemde "Groen Revolusie" het 'n merkwaardige toename in gewasproduksie tot gevolg gehad. Die genetiese opgradering van gewasse deur middel van konvensionele teling was een van die faktore wat 'n rol hierin gespeel het. Belangrike genetiese eienskappe soos siekte- en plaag-bestandheid, opbrengs, aanpassing by spesifieke klimaats-omstandighede, kwaliteit en dies meer is in moderne kultivars ingebou deur die maak van kruisings tussen geslagtelik verenigbare plante (teelouers). Een van die grootste nadele van hierdie benadering is die lang tydsduur (min of meer 10 tot 15 jaar vanaf die kruising gemaak is totdat die produk die boer bereik) wat nodig is om 'n kultivar te ontwikkel en die gepaardgaande koste verbonde aan die ontwikkeling van nuwe kultivars. Voorts word die teelprogram gekortwiek deurdat plante met gewensde eienskappe vanweë kruisingsverenigbaarheid nie met mekaar gekombineer kan word nie.

Ontwikkelings op die gebied van plantbiotechnologie het egter opwindende moontlikhede ten opsigte van planteteling aan die lig gebring. In hierdie aanbieding sal daar kortlik na die toepassing en potensiaal van elk van hierdie aspekte in planteteling verwys word. Die benaderings in plantbiotechnologie kan in twee hoofgroep ingedeel word, naamlik selbiologie en molekulêre biologie, elk met sy eie onderafdelings.

SELBIOLOGIE

Selbiologie word hier gedefinieer as die studie, ontwikkeling en regenerasie van plante vanuit selle, weefsels en organe. Soms word daarna as "plantweefselkultuur" verwys. Dit kan in twee afdelings verdeel word, naamlik "vermeerdering en instandhouding" en "onkonvensionele planteteling" wat weer op grond van die wye verscheidenheid van tegnieke en benaderings verder onderverdeel word.

Vermeerdering en instandhouding

Klonale vermeerdering

'n Belangrike aspek van toegepaste planteteelt is die instandhouding van teellyne en kultivars. In hierdie oopsig maak biotechnologiese metodes reeds 'n integrale deel uit van benaderings om gewasse wat op vegetatiewe wyse vermeerder moet word, in stand te hou.¹ Honderdeduisende plante van gewasse soos aartappels en blombolle word jaarliks deur maatskappye geproduseer en die vinnige klonale vermeerdering *in vitro* is 'n praktiese en ekonomies lewensvatbare manier om dit te doen. Plante kan *in vitro* vanaf meristeme (klein groeipunte), kallus of weefsels *via* adventiewe knoppe, of deur die vorming van somatiese (ongeslagtelike) embrio's geregenereer word.² Die algemene kommersiële toepassing van grootskaalse klonale vermeerdering van plante *in vitro* geskied deur die toepassing van meristemkultuur.³ Hierdie tegnieke word egter ook gebruik om binne 'n kort tydperk massavermeerdering van nuwe kultivars te onderneem. Sodanige vermeerdering geskied dus baie vinniger as wat voorheen die geval was. Geautomatiseerde plantweefselkulturstelsels word tans ontwikkel om die kostes te probeer verlaag.⁴

Kunsmatige saad

Een van die merkwaardigste ontwikkelings van die selbiologie is die vermoë van somatiese plantselle om embrio's in kultuur te vorm. Vandag kan somatiese embrio's vir meer as 130 spesies gekweek word.⁵ Die effektiwiteit van die proses met die gepaardgaande besparing wat dit aan arbeid, tyd en kostes meebring, maak dit 'n baie aantreklike opsie vir die vinnige klonale vermeerdering van plante. Die potensiële produksie is baie hoër as dié van die ander weefselkulturstelsels. Daar is byvoorbeeld bereken dat 'n enkele blaareksplant van olifantgras binne 7 maande meer as $2,5 \times 10^4$ plante kan lewer.⁶ Hierdie ontwikkeling is egter verder gevoer deurdat die embrio's met 'n kunsmatige

voedingsmedium bedek is. Dit word dan binne 'n omhulsel geplaas om 'n kunsmatige saad te vorm. Ontwikkelings om hierdie proses te meganiseer het reeds ver gevorder.⁷

Siektevrye plante

Dikwels word die kweek en verspreiding van plante deur die aanwesigheid van siektes in die materiaal belemmer. Dit is veral virussiektes wat deur die vegetatiewe vermeerdering van plantmateriaal versprei, maar daar is ook virusse wat saadoorddraagbaar is. Die uitskakeling van virussiektes is noodsaaklik, aangesien virusbesmetting tot oesverliese van tot 50% in plante kan lei.⁸ Virusuitskakeling word tans deur die toepassing van meristeemkultuur in kombinasie met hitteterapie en/of chemoterapie bewerkstellig.^{9,10} Die dissektering en kweek van die lootmeristeem met slegs een of twee blaarpromordia stel navorsers in staat om die virusse op 'n fisiese wyse uit te skakel.¹¹ Hierdie tegnieke is belangrik by die kweek van gewasse soos aartappels en veral ornamentale gewasse waar die plante vegetatief vermeerder word.

Bewaring en uitruil van genebronre

Daar is 'n duidelik waarneembare neiging in die wêreld vandag dat die bewaring van die omgewing toenemend belangrik word. Hierdie bewaringsbewustheid kom ook na vore by die bewaring van die verskeidenheid van genetiese bronre. Van die meer as 250 000 plantspesies wat bekend is, word minder as 200 van besondere ekonomiese belang geag, terwyl die oorgrote meerderheid van die wêreld se voedsel van slegs 15 spesies af kom – hoofsaaklik graangewasse, peulplante en wortelagtige gewasse.¹² Daar was 'n periode waartydens min belangstelling in die wye verskeidenheid van spesies getoon is, sodat die genetiese basis van baie van die huidige kommersiële gewasse baie nou is. Deur die toepassing van *in vitro*-vermeerdering kan bedreigde spesies nou gered word, en waardevolle materiaal ook *in vitro* geberg word. Genebanke is besig om tegnologie te ontwikkel waardeur genetiese bronre *in vitro* bewaar kan word. Dit behels tegnieke soos die ontwikkeling van sogenaamde "stadige-groeimedia" waar plante vir meer as 'n jaar op dieselfde medium onder beheerde (laetemperatuur) toestande gekweek word. Kriopreserving (bewaring in 'n gevriesde toestand) word ook reeds toegepas, maar die tegnologie is nog net vir 'n klein aantal spesies (ongeveer 10) ontwikkel.¹³ Die ander groot voordeel van die *in vitro*-opberging van siektervye genebronre is dat dit die internasjonale verspreiding van sodanige plante grootliks vergemakklik. Die plante kan nou maklik ooreenkomsdig internasjonale fitosanitêre regulasies tussen lande vervoer word.

Onkonvensionele planteteling

Vanweë die inherente beperkings van gewone geslagtelike kruisings is verskillende selbiologiese tegnieke ontwikkel om konvensionele teling te ondersteun en te bespoedig. Hierdie tegnieke vervang dus nie konvensionele teling nie, maar is bloot unieke benaderings wat gebruik word om bepaalde probleme in die teelprogram op te los.

Embriokulture

Konvensionele planteteling behels gewoon die maak van

kruisings tussen geslagtelik verenigbare plante. Soms word onverenigbaarheid oorkom deur die maak van brugkruisings, maar in wese bly dit konvensionele benaderings. Partykeer gebeur dit egter dat die embryo's tydens verskillende stadia van die ontwikkeling na bevrugting aborteer. In die verlede is daar dus geen nageslag vanuit so 'n kruising verkry nie. Tegnieke is ontwikkel waardeur die embryo's in 'n vroeë stadium uitgedissekteer en op 'n kunsmatige groei-medium onder steriele toestande gekweek is. Op dié wyse kon nageslag dus verkry word.¹³ Hierdie tegnieke word reeds by 'n groot verskeidenheid gewasse toegepas soos interspesies- en intergenuskruisings by Brassicaceae,¹⁴ intergenuskruisings in die Amaryllidaceae (NSPB, ongepubliseerde resultate) en vir die ontwikkeling van pitlose druwe.¹⁵

Stuifmeekulture (haploïede plantproduksie)

Die vestiging van suiwertelende lyne is 'n kritiese stap in die ontwikkeling van kultivars van die meeste gewasse. Stabiele, homosigotiese teellyne word as kultivars vrygestel of word as teelouers in 'n bastersaadprogram gebruik. Die verkrywing van volledige homosigose word beperk deur twee natuurlike Mendeliane verskynsels, naamlik segregasie en onafhanglike sortering wat genetiese verskeidenheid in plante maksimeer.¹⁶ In 'n konvensionele program word homosigose bewerkstellig deur 'n tydrowende proses van selfbestuiwing en terugkruising. Partenogenese – 'n tegniek waar 'n plant direk uit 'n gameetsel ontwikkel word, is in sommige gevalle gebruik om homosigose te bewerkstellig. In aartappels byvoorbeeld word diploiede van tetraploiede kultivars verkry deur 'n kruising met *Solanum phureja* Juz et Buk., maar die diploiede is dus nog steeds heterosigoties.¹⁷ In garsteling word kruisings tussen kultivars en die wilde species *Hordeum bulbosum* gemaak en die onvolwasse saad word *in vitro* gekweek. Tydens embrio-ontwikkeling word die *H. bulbosum*-chromosome uitgeskakel en word 'n haploïede plant sodoende verkry.¹⁸ In die meeste gevalle word haploïede plante verkry van die kweek van manlike gamete (stuifmeel en/of mikrospore) *in vitro*.¹⁹ Wanner helmknoppe op 'n kunsmatige medium onder steriele en beheerde toestande gekweek word, word plantjies *via* 'n kallusfase of direk deur middel van embriogenese gegeneere. Die verdubbeling van die chromosoomaantal van sulke haploïede plante, spontaan in kultuur of met behulp van 'n chemiese behandeling (kolgisien) lewer dan homosigotiese diploiede. Die produksie van plante vanaf gamete is reeds in meer as 200 plantspesies gerapporteer,²⁰ maar die tegniek is nog net in 'n klein aantal spesies suksesvol toegepas om nuwe kultivars te skep.²¹

Kallus- en selkulture

Natuurlike variasie wat normaalweg met kombinasieteling deur middel van geslagtelike kruisings bewerkstellig word, kan kunsmatig met behulp van mutasieteling verhoog word. Alhoewel kultivars wel op hierdie wyse ontwikkel is, het die groot getalle plante wat evaluateer moes word en die feit dat nespesifieke variasie geskep is, die toepaslikheid van die tegniek beperk. *In vitro*-tegnieke blyk egter 'n lewensvatbare alternatief vir konvensionele mutasieteling te wees. Aanvanklik is gemeen dat plante wat vanuit weefselkulture geregeneere is, genetiese identies sou wees. Dit het egter

spoedig geblyk dat verskille in morfologie, sitologie en biochemie van die plante voorkom en is hierdie vorm van variasie "somaklonale variasie" genoem.²¹ Die graad van somaklonale variasie wat verkry word, kan in 'n mate gemanipuleer word deur die kweektoestande te varieer. Dit is uiters belangrik om te besef dat daar nie 'n algemene behoeft aan die verhoging van kunsmatige genetiese variasie *in vitro* is nie. Voldoende variasie bestaan reeds vir die meeste plante. Dit is egter wel sinvol in gevalle waar daar vir 'n spesifieke eienskap geselekteer word.¹ Die toepassing van 'n spesifieke seleksiedruk op kallus of selkulture kan die groei van spesifieke gemuteerde sellyne tot gevolg hê, waaruit plante geregenereer kan word.⁸ Die tegniek is bruikbaar vir monogeniese eienskappe en verskeie plante is reeds op dié wyse verkry. Enkele voorbeelde is:

- * sulfonylurea (onkruiddoderbestandheid) in tabak;²²
- * Imidasolinoon (onkruiddoderbestandheid) in mielies;²³
- * bestandheid teen die patogeen *Drechslera maydis* in mielies;²⁴
- * bestandheid teen die patogeen *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* in lusern;²⁵
- * bestandheid teen die patogeen *Phoma lingam* in *Brassica napus*;²⁶
- * bestandheid teen die patogene *Pseudomonas* en *Alternaria* in tabak;²⁷
- * bestandheid teen swaar metale in *Brassica napus* en tabak;²⁸
- * toleransie vir die oorproduksie van aminosure (triptofaan) in graangewasse;²⁹
- * toleransie teen soute in lusern.³⁰

Ten spyte van die suksesse wat reeds behaal is, bly sommige navorsers nog skepties oor die praktiese toepassing van hierdie tegnieke.⁸ Die grootste struikelblok is dat die meeste variasie wat in selkulture verkry word, nie in die geregenereerde plante gevestig word nie. Die bestandheid of toleransie is slegs waarneembaar solank as wat die selektiewe agent teenwoordig is. Die gewensde eienskap word dus nie in die genoom gevestig nie, maar kom slegs epigeneties tot uitdrukking.¹ Voorts is geen nuwe kultivars nog volgens hierdie metodes ontwikkel nie. Dit is duidelik dat hierdie tegnieke nie algemene toepassing sal vind nie, maar dat daar wel gevalle is waar dit met groot vrug aangewend sal kan word.

Protoplastkulture

Die benutting van selbiologiese tegnieke in planteteling berus op die vermoë om plante vanaf verskillende bronne (organe, weefsels, selle of protoplaste) te regenereer. Sedert Cocking³¹ daarin geslaag het om protoplaste te isolateer het die tegnologie vinnig ontwikkel. Protoplaste kan beskryf word as "naakte" selle, aangesien die selwand deur chemiese of meganiese prosesse verwyder is. Tans word plantweefsel meesal in 'n hipertoniese oplossing (0.6M) van mannitol met pektinase (ongeveer 0,1%) verteer om enkelselle te lewer. 'n Verdere vertering van die sellulose wand met cellulase (ongeveer 1,0%) lewer dan die protoplaste. Die protoplaste word voorts op verskeie kunsmatige media onder steriele toestande gekweek om eers selwande te regenereer en daarna mikrokalusse, kalusse en uiteindelik lote en wortels om nuwe plantjies te lewer.³² Die regenerasie

van plante uit protoplaste kan egter nog nie vir alle gewasse bewerkstellig word nie. Suksesse is hoofsaaklik met tweesaadlobbiges behaal en veral met die lede van die Solanaceae.³³ Belangrike deurbraak is egter onlangs met die regenerasie van plante uit protoplaste van belangrike eensaadlobbige gewasse soos rys,³⁴ mielies,^{35,36} suikerriet³⁷ en koring³⁸ gemaak. Alhoewel protoplaste ook vir die vinnige *in vitro*-vermeerdering van gewasse of as seleksiesisteem benut kan word, lê die toepassingswaardes egter in twee ander vernuftige benaderings opgesluit. Dit is naamlik somatiese hibridisasie en geenoordragingbenaderings wat afsonderlik bespreek sal word.

Somatiese hibridisasie (Protoplasfusie)

Protoplaste van verskillende bronne kan saamgesmelt word vanweë die afwesigheid van 'n selwand. Hierdie fusie kan spontaan in die kultuur geskied of dit kan chemies geïnduseer word deur poli-ethyleen-glikol (PEG 5-25%) in die teenwoordigheid van Ca^{2+} (50-250mM) by pH 8-10³⁹ of deur elektrofusie.⁴⁰ Daar is verskeie toepassings van hierdie tegnologie in planteteling:

- * kombinasie van volledige genome van geslagtelik onverenigbare spesies kan verkry word;
- * gedeeltelike oordraging van die genoom van die skenker (bv. genoom gefragmenteer deur bestraling) na die ontvanger;
- * manipulasie en oordraging van organelle soos chloroplaaste en mitokondria.

'n Groot aantal somatiese hibriede word in die literatuur beskryf,^{32,41} maar daar is slegs enkeles wat werklik van waarde is. Enkele voorbeelde is:

- * fusie van protoplaste van *Solanum tuberosum* met *S. brevidens* wat bestandheid teen sekere aartappelvirusse toon;⁴²
- * fusie van protoplaste van *Brassica napus* met *B. nigra* om *B. napponigra* te lewer wat bestand is teen die patogeen *Phoma lingam*.⁴³

Genoemde gevalle is egter uitsonderings, aangesien dit redelik onwaarskynlik is dat bruikbare en vrugbare somatiese basters verkry kan word deur die volledige samevoeging van genome van twee onverwante ouers. Gevolglik lyk dit of die ontwikkeling van asimmetriese somatiese basters belowender is, soos blyk uit die resultate wat met *B. napus* en *B. nigra* behaal is.⁴⁴ By asimetriese verbastering word die kern van een van die ouers deur bestraling uitgeskakel en slegs die sitoplasma word dus oorgedra. Voorts word die ontvangerprotoplaste met jodoasetamide behandeld wat seldeling verhoed. Slegs metabolies komplementêre protoplaste sal dus verder tot plante ontwikkel.⁴⁵ Sodoende kan die sitoplasma van een ouer met die kern van 'n ander ouer gekombineer word. Hierdie benadering kan veral goeie toepassing vind in die oordraging van 'n eienskap soos sitoplasmiese manlike steriliteit⁴⁶ – 'n uiters belangrike eienskap in gewasse soos mielies en tamaties waar bastersaad geproduseer word.

Alhoewel die toepassing van selbiologiese benaderings in praktiese planteteling tot 'n groot mate nog in 'n eksperimentele stadium is, is daar voldoende bewyse dat die tegnieke oor die potensiaal beskik om in die nabye toekoms 'n betekenisvolle bydrae tot planteteling te maak.

MOLEKULËRE BIOLOGIE

Hierdie afdeling omsluit 'n studieveld waarna soms ook as "genetiese boukunde" of "rekombinante-DNS-tegnologie" verwys word. In wese behels dit die studie en manipulasie van plante (en ander organismes) op die molekulêre vlak. Die verskillende aspekte wat op planteteling betrekking het, sal van naderby beskou word.

Isolasie en klonering van gewenste gene

Die uiteindelike doelwit met die toepassing van kundigheid en tegnologie in hierdie veld is die skepping van sogenoemde transgeniese plante. Transgeniese plante beskik oor gene wat met behulp van rekombinante-DNS-tegnologie ingebou is. Hierdie gene bestaan uit stukkies DNS wat uit drie hoofdele saamgestel is, naamlik:

- * die koderende gebied wat die aminosuurvolgorde van 'n proteïen kodeer (dit geskied na transkripsie na die boodskapper(m)RNS en translasie van die boodskap op die ribosome);
- * die promotorgebied 5' of "bostrooms" van die koderende sone, wat oor volgordes beskik wat vir die beheer van die uitdrukking van die strukturele geen verantwoordelik is (m.a.w. waar, wanneer en hoe die geen tot uitdrukking kom);
- * die stopsettergebied, 3' of "stroomafwaarts" van die koderende area, met stopvolgordes.

Tans word die meeste aandag gewy aan die identifikasie en isolasie van gewenste gene vanuit die genome van hoër plante en ander organismes. Die algemeenste benadering is om mRNS te isolateer en komplementêre(c)DNS met trutranskriptase te vervaardig. Hierdie cDNA word gebruik om die strukturele gene vanuit genoombiblioteke wat vanaf kern-DNS gesintetiseer is, te isolateer.

Alhoewel baie plantgene reeds geïsoleer is, val dit in 'n kategorie van gene wat relatief maklik is om te isolateer,¹² soos dié wat vir bergingsproteïene kodeer (bv. zeïen in mielies⁴⁷) of gene wat deur 'n spesifieke sein geïnduseer word wat navorsers in staat stel om cDNA klone te identifiseer op die basis van mRNAs wat aanwesig is in geïnduseerde en afwesig is in ongeïnduseerde weefsels.¹² Daar is egter ook 'n hele aantal ander benaderings wat gevolg kan word om gene te isolateer. Een van die grootste stuikelblokke bly egter steeds die probleme wat met die isolasie van ekonomies belangrike gene ondervind word. Tans word daar hoofsaaklik op eienskappe soos siekte-, plaag- en onkruiddoderbestandheid gekonsentreer, terwyl die gehalte en voedingswaarde van gewasse onder andere ook verbeter kan word deur die oordraging van gene vir die produksie van essensiële aminosure en bergingsproteïene. Poligeniese eienskappe soos toleransie teen koue, hitte, droogte en veral verhoging van opbrengs waarby eienskappe soos verhoogde fotosintese-aktiwiteit en stikstofbinding betrokke is, geniet ook reeds aandag.

Opsporing van gene

Een van die eerste wyses waarop die rekombinante-DNS-tegnologie 'n invloed op bestaande konvensionele teelprogramme uitoefen, is deur die ontwikkeling van DNS-markers vir chromosoomsegmente – die sogenoemde "Restriksie-fragment-lengte-polimorfisme" (RFLP)-karteringstegniek. Ensieme word gebruik om die DNS by spesifieke basisvolgordes te sny, die verskille tussen plante

wys dan op as verskille in lengte tussen die fragmente.⁴⁸ Indien spesifieke RFLP-patrone met bepaalde gewenste eienskappe gekorreleer kan word, kan dit as 'n merker gebruik word. Die opsporing van enkelgeen eienskappe is die mees logiese wyse om RFLP-analises te benut en dit sal waarskynlik in baie gewasse in die toekoms toegepas word. Deur sorgvuldige en stelselmatige ondersoeke sal hierdie tegniek mettertyd ook gebruik kan word in die beheer oor poligeniese eienskappe.⁴⁹ Dit is ook duidelik dat RFLP-kartering 'n integrale deel van genetiese boukunde gaan uitmaak, omdat dit navorsers in staat sal stel om 'n DNS-segment wat 'n gewenste geen bevat, te isolateer.⁴⁹ Hierdie tegnieke sal beslis bydra tot die bevordering en versnelling van konvensionele teelprogramme, deurdat die oordrag en segregasie van gene maklik nagespoor sal kan word. Dit sal egter ook die benaderings van genetiese boukunde bevorder, deurdat dit nuwe moontlikhede vir die opsoring van gewensde gene bied.

Oordraging van gene na plante

Gene wat geïsoleer is, moet egter na die ontvangerplante oorgedra word, waar dit stabiel geïnkorporeer moet word. Twee breë benaderings kan in die oordraging van gene na plante gevolg word. Die gene kan óf met behulp van 'n vektor in die selle ingedra word, óf direkte geenoordraging word sonder die gebruik van 'n vektor uitgevoer. Elk van die benaderings het sy voor- en nadele en hierdie aspekte sal vervolgens kortliks bespreek word.

Geenoordrag met behulp van vektore

Sekere plant-DNS-virusse wat natuurlik voorkom, soos CaMV (blomkoolmosaiekvirus), kan gebruik word as 'n vektor om vreemde DNS na plante oor te dra. Vektore wat op RNS-virusse gebaseer is, word ook oorweeg,⁵⁰ maar die algemeenste stelsel is dié van *Agrobacterium tumefaciens*. Dit is 'n grondbakterium wat na verwonding 'n wye reeks tweesaadlobbige plante infekteer, waar dit dan galle indusseer deur die invloeding van DNS in die plantselle. Hierdie bakterium word dan ook die natuur se eie genetiese ingenieur genoem, omdat dit oor die vermoë beskik om 'n DNS-fragment (T-DNS) na die genoom van die gasheerplant oor te dra. Vreemde gene wat in die T-DNS deur Ti-plasmiede ingevoeg is, word dan gesamentlik op dié wyse na die genoom van die gasheer oorgedra. Deur die T-DNS gene te verwijder, word die vektore ontwapen en vervang met die gewenste gene. In die praktyk word sogenoemde selekteerbare merkergene wat vir bestandheid teen antibiotika soos kanamisien⁵¹ en higromisien⁵² kodeer, ingesluit. Dit maak die seleksie van getransformeerde selle moontlik deur die selle op 'n medium te kweek wat die antibiotikum(a) bevat. Ander merkers wat berus op kwantitatiewe analises soos dié wat gebaseer is op chlooramfenikolasetiltransferase,⁵³ die luciferasegeen van die vuurvlieg⁵⁴ en *E. coli* betaglukoronidase (GUS),⁵⁵ word ook gebruik. Op hierdie wyse kan transgeniese plante dus ontwikkel word wat slegs van die ouers verskil ten opsigte van die vreemde gene wat oorgedra is.⁵⁰ Soms word *A. rhizogenes* met sy Ri-plasmied ook in die eksperimentering met geenoordraging gebruik. Hierdie tegniek werk vir die meeste tweesaadlobbige plante baie goed, maar transformasie van eensaadlobbige plante, veral graangewasse, was minder suksesvol. Transformasie van eensaadlobbiges is meesal

in die bolblomfamilies (Amaryllidaceae, Liliaceae en Iridaceae) bewerkstellig.⁵⁶ Gevolglik is 'n aantal tegnieke vir die direkte oordrag van DNS ontwikkel.

Direkte geenoordragingsmetodes

'n Vektor is nie noodsaaklik vir die oordrag en inkoporing van vreemde gene in die plantgenoom nie. 'n Aantal tegnieke waar die DNS op direkte wyse oorgedra word, is ontwikkel en sal kortliks bespreek word.

Chemiese metodes

PEG is dikwels as 'n samesmeltingsagent gebruik waar die vreemde gene in die vorm van plasmied-DNS na protoplaste oorgedra is. Alhoewel die toepasbaarheid van die tegniek beperk word deur die probleme wat met die regenerasie van plante uit protoplaste van eensaadlobbiges ondervind word, dui onlangse deurbraak in die regenerasie van rys,³⁴ mielies,^{35,36} suikerriet³⁷ en koring³⁸ en die oordraging van gene na mielies⁵⁷ en grasse⁵⁸ met behulp van hierdie tegniek tog daarop dat hierdie benadering wel lewensvatbaar is.

Mikro-insputing

Transgeniese plante is reeds verkry nadat die DNS deur middel van mikro-insputing in plantselle van onder ander tamaties⁵⁹ geplaas is. Alhoewel die tegniek daarop neerkom dat selle en/of protoplaste dus individueel gehanteer word, blyk dit tog suksesvol te wees en kan verdere suksesse verwag word.

Eletroporasie

Hierdie tegniek behels die aanwending van hoëvolt elektriese pulse in 'n oplossing wat 'n mengsel van protoplaste en vreemde DNS bevat. Hierdie behandeling veroorsaak porieë in die selmembraan waardeur die DNS die plantsel binnendring⁶⁰ waar dit dan in die genoom van die sel geïnkorporeer word. Die nadeel bly steeds dat daar van protoplaste gebruik gemaak moet word wat moeilik is om te regenerer. Vreemde gene is egter met welslae na 'n aantal tweesaadlobbiges⁶¹ asook eensaadlobbige gewasse soos grasse,⁵⁸ rys⁶¹ en mielies⁶² oorgedra.

Hoëspoed mikroprojektiele

Die DNS word in die plantsel ingedra deur 'n bombardeament met mikroprojektiele. Hierdie projektleie is byvoorbeeld mikroskopiese tungsten of goudpartikels waarop die DNS geabsorbeer is. Die hoë spoed waarteen die partikels afgevuur word, stel dit in staat om die plantsel binne te dring. Aangesien selle of weefsels op hierdie wyse getransformeer kan word, hou die tegniek groot belofte in. Verskeie plante soos mielies⁶³ en tabak⁶⁴ is reeds op hierdie wyse getransformeer.

Die verskillende benaderings soos in die voorafgaande gedeeltes bespreek, het reeds tot die skepping van sekere transgeniese plante geleid. In die meeste gevalle is daar egter slegs van die merkergene gebruik gemaak om die tegnieke te ontwikkel. Vervolgens sal enkele voorbeeld van die oordraging van gene van landboukundige belang bespreek word.

Voorbeeld van die toepassing van genetiese boukunde

Onkruiddoderbestandheid

Die gebruik van onkruiddoders vorm 'n integrale deel van die moderne landbou. Daar word voortdurend na doeltreffende middels ter bestryding van onkruid gesoek. Vanweë die eise wat gestel word dat die middels omgewingsvriendelik moet wees, is dit moeilik om baie spesifieke middels te ontwikkel. Die middels is dus dikwels ook toksies vir die gewasse en gevolglik het die oordraging van onkruiddoderbestandheid na gewasse 'n belangrike teeldoelwit geword.⁶⁵ Tydens die laaste vyf jaar is daar goeie voordeeling gemaak met die klonering en oordraging van gene na plante, wat onkruiddoderbestandheid tot gevolg het. Hierdie transgeniese plante vertoon gevolglik bestandheid teen spesifieke onkruiddoders. Dit is onmoontlik om binne die spektrum van hierdie oorsig al die suksesse te lys en gevolglik sal daar met enkele voorbeeld volstaan word:

- * sulfonielureas en imidasolinone – die assetolaktaatsintase- (ALS-) geen is na tabak oorgedra waar bruikbare vlakke van onkruiddoderbestandheid waargeneem is;⁶⁶
- * glifosaat – die eerste glifosaatbestande, transgeniese plante is verkry deur die oordraging van die *aroA*-geen van *Salmonella* na tabak,⁶⁷ maar was nie volkome suksesvol nie. Die 5-enolpiruviel-shikimaat-3-fosfaatsintase (EPSPS)-geen wat vanuit *Petunia* geïsoleer is, het egter transgeniese plante met uitstekende bestandheid opgelewer⁶⁸ soos *Petunia*, tamaties en oliesaadraap waarvan sommige reeds in 1987 en 1988 aan veldproewe onderwerp is.⁶⁵
- * fosfinotrisien (PPT) – die *bar*-geen van *Streptomyces hygroscopicus* is na tabak, tamaties en aartappels oorgedra. Die transgeniese plante het 'n verhoogde bestandheid teen PPT vertoon.⁶⁹
- * atrasien – 'n mutant *psbA*-geen is na tabak oorgedra waar verhoogde bestandheid teen atrasien waargeneem is.⁷⁰
- * bromoxiniel – 'n *bxn*-geen van *Klebsiella ozaenae* is gekloneer en na tabak en tamaties oorgedra waar dit tot uitdrukking gekom het, met die gevolglike bestandheid teen die onkruiddoder.⁷¹

Die ontwikkeling van onkruiddoderbestande gewasse is duidelik 'n fokuspunt in die navorsing op transgeniese plante, onder ander omdat dit geredelik vermag kan word. Voorts is die werking en aksie van die meeste van die onkruiddoders bekend, wat dit makliker maak om die gene op te spoor. Onkruiddoderbestande gewasse sal nie net 'n meer koste-effektiewe beheer van onkruid tot gevolg hê nie, maar dit maak ook die algemener gebruik van meer omgewingsvriendelike onkruiddoders moontlik.

Bestandheid teen virussiektes in plante

Verskeie benaderings is gevolg om virusbestandheid na gewasse oor te dra. Die algemeenste metode berus op die bekende "kruisbeskermingsmeganisme" waar infeksie deur 'n matige ras van die virus, bestandheid teen 'n virulente ras tot gevolg het. Hierdie meganisme is afhanglik van die verwantskap tussen die skedeproteïene (CP) van die twee virusse.⁷² Alhoewel daar nog onsekerheid oor die werklike meganism(s) bestaan, is goeie sukses reeds behaal met die skepping van transgeniese plante met bestandheid teen bepaalde virussiektes deur die oordraging van die geen wat vir die CP kodeer. Enkele voorbeeld is:

- * bestandheid teen tabakmosaïekvirus (TMV) in tabak;⁷³
- * bestandheid teen alfalfamosaïekvirus (AIMV) en

- tabakratelvirus (TRV) in tabak;⁷⁴
- * bestandheid teen komkommermosaïkvirus (CMV) in tabak;⁷⁵
- * bestandheid teen aartappelvirus X (PVX) in tabak⁷⁶ en aartappels;⁷⁷
- * bestandheid teen PVX en aartapplvirus Y (PVY) in aartappels.⁷⁸

Die vordering wat gemaak is, is belowend en die toepassing van ander benaderings soos die antisintegnologie behoort spoedig tot die beskikbaarstelling van virusbestande gewasse te lei.

Insekbestandheid in plante

Die ontwikkeling van transgeniese plante met bestandheid teen sekere insekte berus tans hoofsaaklik op twee benaderings. Eerstens is 'n tripsien-inhibeerdergeen vanuit *Vigna unguiculata* geïsoleer en na tabak oorgedra⁷⁹ waar dit bestandheid teen *Heliothis virescens* tot gevolg gehad het. Die tweede benadering behels die benutting van *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) wat vir baie jare reeds as 'n veilige biologiese insekbeheermiddel gebruik word en wat tans die grootste belofte toon. Die toksisiteit van die organisme spruit voort uit die produksie van 'n proteïen, die sogenaamde delta-endotoksiën, wat selektief toksies is vir die larwes van insekte.⁸⁰ Verskeie *B.t.*-toksiene met aktiwiteit teen Lepidoptera-, Diptera- en Coleoptera-insekte is reeds geïdentifiseer, gekloneer en na plante oorgedra waar dit bestandheid tot gevolg het:

- * bestandheid teen *Manduca sexta* in tabak;⁸¹
- * bestandheid teen *M. sexta* en ander Lepidoptera-larwes in tamaties;⁸²
- * bestandheid teen Lepidoptera in tabak.⁸³

Sedert die eerste insekbestande transgeniese plante in 1987 geproduseer is, het ontwikkelings vinnig gevolg en word daar tans aan 'n groot aantal soortgelyke projekte gewerk. Dit is 'n uitgemaakte saak dat die gewasse van die toekoms 'n ingeboude bestandheid teen sekere insekte sal hê, maar dit sal nie chemiese beheermaatreëls volledig vervang nie.

Verhoging van proteïengehalte van sade

Die gene wat vir 'n aantal belangrike proteïene in sade kodeer, is reeds geïdentifiseer en geïsoleer en hierdie gene is ook reeds na ander plante oorgedra. 'n Belangrike verskynsel is dat hierdie gene op die regte plek op die regte tyd tot uitdrukking kom. So is die faseoliergeen van boonjies na sonneblomselle⁸⁴ en tabakplante oorgedra waar dit in die sade tot uitdrukking gekom het.⁸⁵

TOEKOMSBLIK

Uit die voorafgaande is dit duidelik dat biotegnologie 'n kragtige tegnologie is en dat dit oor die potensiaal beskik om 'n rewolusionêre bydrae tot planteteling te maak. Na verwagting sal hierdie ontwikkelings egter eerder ewolucionêr as rewolusionêr geskied. 'n Noue interaksie en samewerking tussen plantetelers en biotegnoloë is noodsaaklik om die suksesse wat in die laboratorium behaal word, na die landerye oor te dra. Konvensionele planteteling beskik ook nog steeds oor die potensiaal om gewensde genotipes te lewer en biotegnologiese tegnieke moet slegs aangewend word waar eersgenoemde nie 'n

oplossing bied nie. Die sukses van die aksies word net op een manier gemeet en dit is deur die vrystelling van nuwe kultivars of teellyne. Selfs die intelligentste benadering is gedoen as dit nie koste-effektiif is nie. Tans lê die grootste waarde van die ontwikkelings opgesluit in die begrip wat ontwikkel is van die beheer en uitdrukking van gene en in die vermoë om gene te isolateer. Hierdie kundigheid behoort wetenskaplikes in staat te stel om oor die volgende aantal jare 'n hele reeks gene vir oordraging na plante beskikbaar te stel.

In die meeste gevalle waar vreemde gene van enige organisme na plante oorgedra is, het die gene in die plante tot uitdrukking gekom en is dit stabiel in die genoom van die gasheerplant geïnkorporeer. Die uitdaging lê nou daar-in om bruikbare gene wat eienskappe soos siektebestandheid, droogte- en brakverdraagsaamheid, opbrengs en stikstofbinding beheer, te identifiseer en te kloneer. Dit is moeilik om 'n voorspelling te waag, maar gemeet aan die uitstaande vordering wat in die kort tydperk sedert 1983 gemaak is toe die eerste transgeniese plante geproduseer is, lyk die toekoms rooskleurig.

VERWYSINGS

1. Wenzel, G. (1988). Biotechnology in Agriculture – an Overview. In *Biotechnology*. Vol. 6b. Rehm, H.-J. & Reed, G. eds. (VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim) p. 771-796.
2. Vasil, I.K. & Vasil, V. (1980). Clonal propagation, *Int. Rev. Cytol. Supp.*, II A, 145-173.
3. Zimmerman, R.H., Griesbach, R.J., Hammerschlag, F.A. & Lawson, R.H. (1986). *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops* (Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht).
4. Levin, R., Gaba, V., Tal, B., Hirsch, S., De-Nola, D. & Vasil, I.K. (1988). Automated plant tissue culture for mass propagation, *Bio/Technology*, 6, 1035-1039.
5. Thorpe, T.A. (1988). In vitro somatic embryogenesis, *ISI Atlas of Science – Animal and Plant Sciences*, 81-88.
6. Chandler, S.F. & Vasil, I.K. (1984). Optimization of plant regeneration from long term embryogenic callus cultures of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier grass), *J. Plant Physiol.*, 117, 147-156.
7. Redenbaugh, K., Paasch, B.D., Nichol, J.W., Kossler, M.E., Viss, P.R. & Walker, K.A. (1986). Somatic Seeds: Encapsulation of asexual plant embryos, *Bio/Technology*, 4, 797-801.
8. Vasil, I.K. (1990). The realities and challenges of Plant Biotechnology, *Bio/Technology*, 8, 296-301.
9. Hollings, M. (1962). Heat treatment in the production of virus-free ornamental plants, *Natl. Agr. Advis. Serv. Quart. Rev.*, 57, 31-34.
10. Horst, R.K. & Cohen, D. (1980). Amantadine supplemented tissue culture medium: A method for obtaining chrysanthemums free of chrysanthemum stunt viroid, *Acta Hortic.*, 110, 315-319.
11. Kartha, K.K. (1984). Elimination of viruses. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol 1. *Laboratory Procedures and Their Applications*, Vasil, I.K. ed. (Academic Press, New York) p. 577-585.
12. Steinbiss, H.H. & Davidson, A. (1989). Genetic manipulation of plants: from tools to agronomic applications, *Sci. Prog. Oxf.*, 73, 147-168.
13. Collins, G.B. & Grosser, J.W. (1984). Culture of embryos. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol. 1. *Laboratory Procedures and Their Applications*, Vasil, I.K. ed. (Academic Press, New York) p. 241-257.
14. McNaughton, H. & Ross, C.L. (1978). Inter-specific and inter-generic hybridization in the Brassicaceae with special emphasis on the improvement of forage crops, *Scott. Plant Breed. Stn. Annu. Rep.* 1977-1978, p. 75-110.
15. Monette, P.L. (1988). 1.1 Grapevine (*Vitis vinifera* L.) In *Biotechnology in Agriculture and Forestry 6. Crops I*. Bajaj, Y.P.S. ed. (Springer-Verlag, Berlin), p. 3-37.
16. Morrison, R.A. & Evans, D.A. (1988). Haploid plants from tissue culture: new plant varieties in a shortened time frame, *Bio/Technology*, 6, 684-689.
17. Ferreira, D.I., Lindeque, J.M., Brink, J.A., Van der Mescht, A., Slabbert, M.M., De Bruyn, M.H., De Ronde, J.A., Van Rhyn, C.C. & Visser, A.F. (1989). Potato breeding in South Africa: a new approach using biotechnology, *S. Afr. J. of Sci.*, 85, 357-359.
18. Kasha, K.J. & Kao, K.N. (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Nature*, 225, 874-876.

19. Han, H. & Hongyuan, Y. (1986). *Haploids of higher plants in vitro* (China Academic Publishers, Beijing).
20. Maheshwari, S.C., Rashid, A. & Rayagi, A.K. (1982). Haploids from pollen grains – retrospect and prospect, *Am. J. Bot.*, 69, 865-879.
21. Larkin, P.J. & Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, *Theoret. Appl. Genet.*, 60, 197-214.
22. Chaleff, R.S. & Ray, T.B. (1984). Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures, *Science*, 223, II48-II51.
23. Anderson, P.C. & Georgeson, M. (1986). Selection and characterization of imidazolinone tolerant mutants of maize, In *Biochemical basis of herbicide action, 27th Harden Conf. Prog. Abstr.*, (Wye College, Ashford, UK).
24. Brettell, R.I.S., Goddard, B.V.D., & Ingram, D.S. (1979). Selection of Trms-cytoplasm maize tissue cultures resistant to *Drechslera maydis* T-toxin, *Maydica*, 24, 203-213.
25. Hartman, C.L., McCoy, T.J. & Knous, T.R. (1984). Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*, *Plant Sci. Lett.*, 34, 183-194.
26. Sacristan, M.D. (1982). Resistance responses to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*, *Theoret. Appl. Genet.*, 61, 193-200.
27. Thanutong, P., Furusawa, I. & Yamamoto, M. (1983). Resistant tobacco plants from protoplast derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins, *Theoret. Appl. Genet.*, 66, 209-215.
28. Misra, S. & Gedamu, L. (1989). Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants, *Theoret. Appl. Genet.*, 78, 161-168.
29. Hibberd, K.A., Anderson, P.A. & Barker, M. (1986). Tryptophan overproducer mutants of cereal crops, *United States Patent No. 4, 581, 847*.
30. Smith, M.K. & McComb, J.A. (1983). Selection for NaCl tolerance in cell cultures of *Medicago sativa* and recovery of plants from a NaCl-tolerant cell line, *Plant Cell Rep.*, 2, 126-128.
31. Cocking, E.C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles, *Nature*, 187, 927.
32. Fowke, L.C. & Constabel, F. (1985). *Plant Protoplasts*, (CRC Press Inc., Boca Raton).
33. Ferreira, D.I. & Zelcer, A. (1989). Advances in protoplast research on *Solanum*, *Int. Rev. Cytol.*, 115, 1-64.
34. Kyozuka, J., Hayashi, Y. & Shimamoto, K. (1987). High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods, *Mol. Gen. Genet.*, 206, 408-413.
35. Shillito, R.D., Carswell, G.K., Johnson, C.M., DiMaio, J.J. & Harms, C.T. (1989). Regeneration of fertile plants of protoplasts of elite inbred maize, *Bio/Technology*, 7, 581-587.
36. Prioli, L.M. & Sondahl, M.R. (1989). Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.), *Bio/Technology*, 7, 589-594.
37. Srinivasan, C. & Vasil, I.K. (1986). Plant regeneration from protoplasts of sugarcane, *J. Plant Physiol.*, 126, 41-48.
38. Vasil, V., Redway, F. & Vasil, I.K. (1990). Regeneration of plantlets from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Bio/Technology*, 8, 429-434.
39. Keller, W.A. & Melchers, G. (1973). The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion, *Z. Naturforsch.*, 28c, 737.
40. Zimmermann, U. & Scheurich, P. (1981). High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields, *Planta*, 151, 26.
41. Gleba, Y.Y. & Sytnik, K.M. (1984). *Protoplast Fusion: Genetic Engineering in Higher Plants* (Springer-Verlag, Heidelberg).
42. Gibson, R.W., Jones, M.G.K. & Fish, N. (1988). Resistance to potato leaf roll virus and potato virus Y in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*, *Theoret. Appl. Genet.*, 76, 113-117.
43. Sjodin, C. & Glimelius, K. (1989). *Brassica napobrassica*, a somatic hybrid resistant to *Phoma lingam*, *Theoret. Appl. Genet.*, 77, 651-656.
44. Sacristan, M.D., Gerdemann-Knorck, M. & Schieder, O. (1989). Incorporation of hygromycin resistance in *Brassica nigra* and its transfer to *B. napus* through asymmetric protoplast fusion, *Theoret. Appl. Genet.*, 78, 194-200.
45. Tanno-Suenaga, L., Ichikawa, H. & Imamura, J. (1988). Transfer of the CMS trait in *Daucus carota* L. by donor-recipient protoplast fusion, *Theoret. Appl. Genet.*, 76, 855-860.
46. Izhar, S. & Zelcher, A. (1986). Protoplast fusion and generation of cybrids for transfer of cytoplasmic male sterility, In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 3, Plant Regeneration and Genetic Variability*, Vasil, I.K. ed. (Academic Press, New York) p. 589-599.
47. Schwall, M. & Feix, G. (1988). Zein promoter activity in transiently transformed protoplasts from maize, *Plant Science*, 56, 161-166.
48. Beckmann, J.S. & Soller, M. (1986). Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement, *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 3, 225-227.
49. Bernatzky, R. & Tanksley, S.D. (1989). Restriction fragments as molecular markers for germplasm evaluation and utilisation, In *The use of plant genetic resources*, Brown, A.H.D., Marshall, D.R., Frankel, O.H. & Williams, J.T. eds. (Cambridge University Press, Cambridge) p. 353-362.
50. Uchimiya, H., Handa, T. & Brar, D.S. (1989). Transgenic plants, *J. of Biotechnology*, 12, 1-20.
51. Bevan, M.W., Flavell, R.B. & Chilton, M.D. (1983). A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation, *Nature*, 304, 184-187.
52. Van Der Elzen, P., Lee, K.Y., Townsend, J. & Bedbrook, J. (1985). Simple binary vectors for DNA transfer to plant cells, *Plant Mol. Biol.*, 5, 149-154.
53. Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, E., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M. & Schell, J. (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells, *EMBO J.*, 2, 987-995.
54. Ow, D.W., Wood, K.V., Deluca, M., De Wet, J.R., Helinski, D.R. & Howell, S.H. (1986). Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants, *Science*, 234, 856-859.
55. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. & Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J.*, 6, 3901-3907.
56. Van Haaren, M.J.J., Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A. (1987). The *Agrobacterium* system and its applications, In *Plant Molecular Biology*, Von Wettstein, D. & Chua, N.-M. eds. (Plenum Publishing Corporation, New York) p. 541-564.
57. Maas, C. & Werr, W. (1989). Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts, *Plant Cell Rep.*, 8, 148-151.
58. Vasil, V., Hauptmann, R.M., Morrish, F.M. & Vasil, I.K. (1988). Comparative analysis of free DNA delivery and expression into protoplasts of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass) by electroporation and polyethylene glycol, *Plant Cell Rep.*, 7, 499-503.
59. Toyoda, H., Matsuda, Y., Utsumi, R. & Ouchi, S. (1988). Internuclear microinjection for transformation of tomato callus cells, *Plant Cell Rep.*, 7, 293-296.
60. Bates, G.W., Piastuch, W., Riggs, C.D. & Rabbusay, D. (1988). Electroporation for DNA delivery to plant protoplasts, *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 12, 213-218.
61. Toriyama, K., Arimoto, Y., Uchimiya, H. & Hinata, K. (1988). Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts, *Bio/Technology*, 6, 1072-1074.
62. Rhodes, C.A., Pierce, D.A., Mettler, I.J., Mascarenhas, D. & Detmer, J.J. (1988). Genetically transformed maize plants from protoplasts, *Science*, 240, 204-207.
63. Klein, T.M., Gradziel, T., Fromm, M.E. & Scanford, J.C. (1988). Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles, *Bio/Technology*, 6, 559-563.
64. Tomas, D.T., Weissinger, A.K., Ross, M., Higgins, R., Drummond, B.J., Schaaf, S., Molone-Schoneberg, J., Staebell, M., Flynn, P., Anderson, J. & Howard, J. (1990). Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves, *Plant Molec. Biol.*, 14, 261-268.
65. Maxur, B.J. & Falco, S.C. (1989). The development of herbicide resistant crops, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 441-470.
66. Haughn, G.W., Smith, J., Mazur, B. & Somerville, C. (1988). Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides, *Mol. Gen Genet.*, 211, 266-271.
67. Comai, L., Facciotti, D., Hiatt, W.R., Thompson, G., Rose, R.E. & Stalker, D.M. (1985). Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate, *Nature*, 317, 741-744.
68. Steinrucken, H.C., Schulz, A., Amrhein, N., Porter, C.A. & Fraley, R.T. (1986). Overproduction of a 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant *Petunia hybrida* cell line, *Arch. Biochem. Biophys.*, 244, 169-178.
69. De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V., Movva, N.R., Thompson, C., Van Montagu, M. & Leemans, J. (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme, *EMBO J.*, 6, 2513-2518.
70. Cheung, A.Y., Bogorad, L., Van Montagu, M. & Schell, J. (1988). Relocating a gene for herbicide tolerance: a chloroplast gene is converted into a nuclear gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 391-395.
71. Stalker, D.M. & McBride, K.E. (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Klebsiella ozaenae* plasmid-borne gene encoding a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil, *J. Bacteriol.*, 169, 955-960.
72. Wilson, T.M.A. (1989). Plant-viruses: a tool-box for genetic engineering and crop protection, *Bio Essays*, 10, 179-185.
73. Abel, P.P., Nelson, R.S., De, B., Hoffman, N., Rogers, S.G., Fraley,

- R.T. & Beachy, R.N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene, *Science*, 232, 738-743.
74. Van Dun, C.M.P., Bol, J.F. & Van Vloten-Doting, L. (1987). Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology*, 159, 299-305.
75. Cuozzo, M., O'Connel, K.M., Kaniewski, W., Fang, R-X., Chau, N-H. & Turner, M.E. (1988). Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA, *Bio/Technology*, 6, 549-557.
76. Hemenway, C., Fang, R-X., Kaniewski, W.K., Chua, N-H. & Turner, N.E. (1988). Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA, *EMBO J.*, 7, 1273-1280.
77. Hoekema, A., Huisman, M.J., Molendijk, L., Van Der Elzen, P.J.M. & Cornelissen, B.J.C. (1989). The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X, *Bio/Technology*, 7, 273-278.
78. Lawson, C., Kaniewski, W.K., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P. & Turner, N.E. (1990). Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: Resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank, *Bio/Technology*, 8, 127-134.
79. Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F. & Boulter, D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco, *Nature*, 300, 160-163.
80. Dulmage, H.T. (1981). Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control, In *Microbial controls of pests and plant diseases 1970-1980*, Burges, H.D. ed. (Academic Press, New York) p. 193-222.
81. Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, c., Zabeau, M., Van Montagu, M. & Leemans, J. (1987). Transgenic plants protected from insect attack, *Nature*, 328, 33-37.
82. Fischhoff, D.A., Bowdish, K.S., Perlak, F.J., Marrone, P.G., McCormick, S.H., Niedermeyer, J.G., Dean, D.A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E.J., Rochester, D.E., Rogers, S.G. & Fraley, R.T. (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants, *Bio/Technology*, 5, 807-813.
83. Barton, K.A., Whiteley, H.R. & Yang, N. (1987). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects, *Plant Physiol.*, 85, 1103-1109.
84. Murai, N., Sutton, D.W., Murray, M.G., Slightom, J.L., Merlo, D.J., Reichert, N.A., Sengupta-Gopalan, C., Stock, C.A., Barker, R.F., Kemp, J.D. & Hall, T.C. (1983). Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors, *Science*, 222, 476-482.
85. Sengupta-Gopalan, C., Reichert, N.A., Barker, R.F., Hall, T.C. & Kemp, J.D. (1985). Developmentally regulated expression of the bean beta-phaseolin gene in tobacco seed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3320-3324.