

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**  
**PROBLEMAS ESPECIALES EN GENÉTICA (B-0623)**  
**LOS IMPACTOS ECOLÓGICOS DE LA BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**  
**II Semestre 2009**

Valor del curso: 4 créditos

Horario: Martes y Jueves de 1 p.m. a 2:50 p.m.

Tiempo: 4 horas teoría por semana

Requisitos: B-0345, B-0346

Profesores

Dr. Edgar Rojas

e-mail: [earm23@yahoo.com](mailto:earm23@yahoo.com)

Teléfono: 8843-1239

Horario de consulta: Martes de 8 am a 12 m

### **DESCRIPCIÓN**

El curso discute acerca del efecto de los organismos modificados genéticamente y su impacto en el medio ambiente. Muestra al estudiante los posibles daños ambientales y ecológicos causados por la manipulación de genes en la biodiversidad tanto de ecosistemas naturales como agrícolas. Asimismo, analiza los riesgos de la biotecnología agrícola y su riesgo en la salud humana. Además, el curso orienta al estudiante a tener un ojo crítico acerca de la manipulación de genes en la sociedad moderna.

La biotecnología actualmente se considera una herramienta agrícola segura. Sin embargo, varios estudios sugieren que esta puede tener consecuencias ecológicas negativas:

- la transmisión y dispersión de genes genéticamente modificados a plantas silvestres.
- un aumento de la toxicidad, la cual se podría transmitir a lo largo de las cadenas tróficas.
- la perturbación de los sistemas naturales de control de plagas y la creación de nuevas malezas o virus.

Los cultivos transgénicos (cultivos genéticamente modificados o CGM), representan uno de los productos principales de la biotecnología agrícola. A lo largo del mundo, el área plantada con cultivos transgénicos aumentó más de 20 veces en los últimos seis años. La difusión de los cultivos transgénicos amenaza a la diversidad genética al promover monocultivos, lo cual conlleva a la simplificación ambiental y a la erosión genética. La historia ha demostrado repetidamente que la uniformidad genética en áreas cultivadas aumenta la vulnerabilidad a las enfermedades y al ataque de plagas.

### **OBJETIVO GENERAL**

Guiar a los estudiantes a tener una visión crítica acerca de los beneficios y perjuicios de los organismos modificados genéticamente originados mediante técnicas biotecnológicas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Exponer el planteamiento teórico acerca de las técnicas biotecnológicas empleadas en con el mejoramiento genético de organismos vivos.
2. Analizar el impacto ecológico de los organismos modificados genéticamente en ecosistemas naturales y agrícolas.
3. Señalar los principales problemas asociados con la introducción de organismos modificados genéticamente a un ecosistema.
4. Adquirir una visión crítica acerca de la biotecnología y su impacto en la destrucción de la biodiversidad en los ecosistemas.
5. Dar a conocer las directrices nacionales e internacionales sobre la seguridad de los productos de la biotecnología moderna.
6. Considerar la problemática y perspectivas de desarrollo biotecnológico en países en desarrollo con especial referencia a Costa Rica y a los países del área centroamericana.
7. Estimular la creatividad de los estudiantes por medio de la realización de trabajos de investigación y seminarios.

## METODOLOGÍA

El curso comprenderá charlas magistrales impartidas por los profesores y conferencias de invitados expertos en diversos tópicos de la biotecnología agrícola. Además, los estudiantes llevaran a cuatro exposiciones cortas de un artículo de revisión o experimental concerniente a un aspecto puntual de los contenidos del curso. Asimismo, el estudiante deberá realizar un trabajo de investigación, el cual consistirá en la aplicación de una encuesta sobre las posiciones de la opinión pública con respecto a la biotecnología agrícola o la elaboración de hojas informativas sobre diversos tópicos de la biotecnología agrícola. El trabajo deberá presentarse de manera escrita (máximo 10 páginas), una semana antes de la fecha de exposición y presentación oral (15 min. de exposición y 5 min. preguntas).

## EVALUACIÓN

Dada la naturaleza del curso, solo se permitirán un máximo de dos ausencias a clase, durante el semestre, para poder aprobar el curso, independientemente de la nota obtenida. La evaluación del curso se realizará de la siguiente manera:

Tareas y Exposiciones orales (seminarios)	40 % de la nota final
Dos exámenes parciales (20% c/u)	40 % de la nota final
Trabajo de investigación	20 % de la nota final

El estudiante que obtenga entre un 60 y un 67.5 de nota de aprovechamiento podrá realizar un examen de ampliación.

## CONTENIDOS

1. Introducción. Desarrollo histórico de la biotecnología. Naturaleza y variedad de procesos biotecnológicos.
2. Herramientas básicas de ingeniería genética y recombinaciones genéticas *in vitro*. Aislamiento y análisis de genes.
3. Vectores de transformación: promotores y terminadores, genes reporteros, genes de selección y genes de interés.
4. Métodos de transformación genética de plantas: *Agrobacterium*, biobalística, electroporación y microinyección.
5. Transformación genética de cloroplastos.
6. Aplicaciones de la transformación genética de plantas.
7. Métodos de selección positivos y negativos. Eliminación de genes de selección.
8. Detección de cultivos genéticamente modificados mediante métodos bioquímicos y moleculares.
9. La dispersión de transgenes a malezas emparentadas o a poblaciones con-específicas a través de la hibridización.
10. La reducción de la adecuación o “fitness” de los organismos no blanco a través de la adquisición de las características transgénicas vía hibridización.
11. La rápida evolución de la resistencia en plagas.
12. La perturbación del control natural de las plagas de insectos a través de los efectos intertróficos.
13. Efectos no anticipados en organismos herbívoros no meta a través de la deposición de polen transgénico en el follaje de la vegetación silvestre de los alrededores.
14. El uso masivo de cultivos transgénicos representa riesgos potenciales substanciales desde un punto de vista ecológico.
15. Los efectos ecológicos no están limitados a la resistencia en las plagas o a la creación de nuevas variedades de malezas o de virus.
16. Los cultivos transgénicos pueden producir toxinas ambientales que se mueven a través de las cadenas tróficas y que también pueden llegar al suelo y al agua, afectando así a los invertebrados y probablemente a procesos tales como el ciclo de nutrientes.
17. Los impactos a largo plazo que pueden resultar de la diseminación masiva de estos cultivos.
18. Las patentes del ADN y monopolios de los organismos vivos.
19. Repercusiones de los cultivos genéticamente modificados en la economía, salud y medio ambiente.
20. Alternativas competitivas a la biotecnología agrícola.
21. Posiciones de la opinión pública con respecto a la biotecnología agrícola.
22. Legislación en Bioseguridad agrícola.

## CRONOGRAMA

Comentario [UD1]:

Tema	Semana
Introducción del curso. ¿Qué es la biotecnología agrícola?	1
Herramientas básicas de ingeniería genética y recombinaciones genéticas <i>in vitro</i> . Aislamiento y análisis de genes.	2
Vectores de transformación: promotores y terminadores, genes reporteros, genes de selección y genes de interés.	3
Métodos de transformación genética de plantas: <i>Agrobacterium</i> , biobalística, electroporación y microinyección. Transformación genética de cloroplastos.	4
Métodos de selección positivos y negativos. Eliminación de genes de selección. Detección de cultivos genéticamente modificados mediante métodos bioquímicos y moleculares. PRIMER EXAMEN PARCIAL	5
Flujo de genes transformados genéticamente en diferentes ecosistemas parte I	6
Flujo de genes transformados genéticamente en diferentes ecosistemas parte II	7
La dispersión de transgenes a malezas emparentadas o a poblaciones con-específicas a través de la hibridización.	8
Efectos no anticipados en organismos herbívoros no meta a través de la deposición de polen transgénico en el follaje de la vegetación silvestre de los alrededores.	9
Los cultivos transgénicos pueden producir toxinas ambientales que se mueven a través de las cadenas tróficas y que también pueden llegar al suelo y al agua, afectando así a los invertebrados y probablemente a procesos tales como el ciclo de nutrientes	10
	11
Cultivos transgénicos vs cultivos tradicionales vs cultivos orgánicos	12
Posibles maneras de manejar el flujo de genes transformados genéticamente en diferentes ecosistemas	13
El uso de plantas transgénicas en Costa Rica. y su impacto ambiental	14
Repercusiones de los cultivos genéticamente modificados en la economía, salud y medio ambiente.	15
Posiciones de la opinión pública con respecto a la biotecnología agrícola. Legislación en Bioseguridad agrícola.	16

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abdalla, A., Connell, P., Tran, Q.T. y Buetre, B. 2003. Agricultural Biotechnology: potential use for developing countries. ABARE eReport 03.17. 57 p.
2. Acquah, G. 2004. Understanding biotechnology: and integrated and cyber-based approach. Estados Unidos. Pearson Prentice Hall. 402 p.
3. Altieri M.A. (2000). "The ecological impacts of transgenic crops on agroecosystem health." *Ecosystem Health* 6: 13-23.
4. Altieri, M.A. (1994). *Biodiversity and Pest Management in Agroecosystems*. Haworth Press, New York.
5. Altieri, M.A. (1996). *Agroecology: The science of sustainable agriculture*. Westview Press, Boulder.

6. Altman A. 1998. *Agricultural Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong. 770 p.
7. American Soybean Association. 2005. *Dispelling the Myths: the real facts about agricultural biotechnology and biotech food*. 35 p.
8. Arias-Peñate, S. 1990. *Biotecnología: amenazas y perspectivas para el desarrollo de América Central*. Colección Análisis, D. E. I., San José, Costa Rica. 282 p.
9. Barnum, S. 2005. *Biotechnology: an introduction*. 2 ed. Estados Unidos. Thomson Brooks/Cole. 323 p.
10. BIO (Biotechnology Industrie Organization). 2005. *BIO 2005-2006: Guide to biotechnology*. 149 p.
11. BIO (Biotechnology Industrie Organization). 2007. *Guide to biotechnology 2007*. 132 p.
12. Bolivar, Z. 2004. *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. Mexico. 714 p.
13. Centre for Biosafety and Sustainability. 2003. *Genetically Modified (GM) Crops: molecular and regulatory details*. 192 p.
14. Charla, H.S. 2003. *Plant biotechnology: a practical approach*. United States of America. Science Publishers, INC. 302 p.
15. Chrispeels, M. y Sadava, D. 2003. *Plants, Genes and crop biotechnology*. 2 ed. Estados Unidos. 562 p.
16. Donegan, K.K. and R.J. Seidler (1999). "Effects of transgenic plants on soil and plant microorganisms." *Recent Res. Devel. Microbiology* 3: 415-424
17. Donegan, K.K., C.J. Palm, V.J. Fieland, L.A. Porteous, L.M. Ganis, D.L. Scheller and R.J. Seidler (1995). "Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* endotoxin." *Applied Soil Ecology* 2, 111-124.
18. Duke, S.O. (1996). *Herbicide resistant crops: agricultural, environmental, economic regulatory, and technical aspects*, p. 420. Lewis Publishers, Boca Raton.
19. Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. 2004. *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Buenos Aires, Argentina. Ediciones INTA. 446 p.
20. Espinoza, A.M., Arrieta-Espinoza, G. y Sittenfeld, A. 2004. *Relación de los cultivos modificados genéticamente con el ambiente y la salud de la población costarricense*. *Rev. Biol. Trop.* 3: 727- 732.
21. European Initiative for Biotechnology Education. 1997. *Plantas transgénicas*. Unidad 9. 20 p.
22. Genoma España. 2005. *Biotecnología en el sector alimentario*. Fundación Española para el desarrollo de la investigación en Genómica y Proteómica. 81 p.
23. Gill, D.S. (1995). "Development of herbicide resistance in annual ryegrass populations in the cropping belt of Western Australia." *Australian Journal of Exp. Agriculture* 3, 67-72.
24. Goldberg, R.J. (1992). "Environmental concerns with the development of herbicide-tolerant plants." *Weed Technology* 6, 647-652.
25. Hilbeck, A., M. Baumgartner, P.M. Fried, and F. Bigler (1998). "Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae)." *Environmental Entomology* 27, 460-487.
26. James, C. (2000). "Global review of commercialized transgenic crops: 2000. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Application." *ISSA Briefs* No. 21-2000, Ithaca.
27. Kendall, H.W., R. Beachy, T. Eismar, F. Gould, R. Herdt, P.H. Ravon, J. Schell, and M.S. Swaminathan (1997). "Bioengineering of crops." Report of the World Bank Panel on transgenic crops, *World Bank*, Washington, D.C. p. 30.
28. Kjellsson, G. and V. Simonson (1994). *Methods for risk assessment of transgenic plants*, p. 214. Birkhauser Verlag, Basil.
29. Krinsky, S. and R.P. Wrubel (1996). *Agricultural Biotechnology and the Environment: Science, Policy and Social Issues*. University of Illinois Press, Urbana.
30. Losey, J.E., L.S. Rayor and M.E. Cater (1999). "Transgenic pollen harms monarch larvae." *Nature* 399, 241.
31. Mellon, M and J. Rissler (1998). "Now or never: serious plans to save a natural pest control." Union of Concerned Scientists. Washington DC.
32. National Research Council (1984) *Alternative Agriculture*. National Academy Press. Washington DC.
33. National Research Council (1996). "Ecologically based pest management." *National Academy of Sciences*, Washington, DC.
34. Nuffield Council on Bioethics. 1999. *Genetically modified crops: the ethical and social issues*. Latimer Trend & Company Ltd. 164 p.
35. Palm, C.J., D.L. Schaller, K.K. Donegan and R.J. Seidler (1996). "Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* endotoxin." *Canadian Journal of Microbiology* (in press).
36. Paoletti, M.G. and D. Pimentel (1996). "Genetic engineering in agriculture and the environment: Assessing risks and benefits." *BioScience* 46, 665-671.
37. Peña, L. (ed). 2004. *Transgenic plants: Methods and Protocols*. Totowa, NJ, Humana Press Inc. (Methods in Molecular Biology; v. 286).
38. Pimentel, D., M.S. Hunter, J.A. LaGrow, R.A. Efromson, J.C. Landers, F.T. Mervis, C.A. McCarthy and A.E. Boyd (1989). "Benefits and risks of genetic engineering in agriculture." *BioScience* 39, 606-614.
39. Rissler, J. and M. Mellon (1996). *The Biological Risks of Engineered Crops*. MIT Press, Cambridge.
40. Robinson, R.A. (1996). "Return to resistance: Breeding crops to reduce pesticide resistance." *AgAccess*, Davis.
41. Royal Society of London, USA National Academy of Sciences, Brazilian Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences, Indian National Academy of Sciences, Mexican Academy of Sciences and the Third World Academy of Sciences. 2000. *Transgenic plants and world agriculture*. 19 p.
42. Royal Society of London. 2002. *Genetically modified plants for food use and human health—an update*. 19 p.
43. Sasson, A. 2005. *Food and nutrition biotechnology: achievements, prospects and perceptions*. UNU-IAS. 36 p.
44. Sasson, A. 2005. *Industrial and environmental biotechnology: achievements, prospects and perceptions*. UNU-IAS. 23 p.
45. Sasson, A. 2005. *Medical biotechnology: achievements, prospects and perceptions*. UNU-IAS. 154 p.
46. Sasson, A. 2006. *Plant and agricultural biotechnology: achievements, prospects and perceptions*. UNU-IAS. 444 p.
47. Saxena, D., S. Flores and G. Stotzky (1999). "Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn." *Nature* 401,480.
48. Schuler, T.H., R.P.J. Potting, I. Dunholm, and G.M. Poppy (1999). "Parasitoid behavior and Bt plants." *Nature* 400, 825.
49. Sittenfeld, A. y Espinoza, A.M. 2002. *Costa Rica: revealing data on public perception of GM crops*. *Trends in Plant Science*. 10: 468-470.
50. Snow, A.A. and P. Moran (1997). "Commercialization of transgenic plants: Potential ecological risks." *BioScience* 47, 86-96.
51. Sociedad Española de Biotecnología. 2000. *Biotecnología y salud: preguntas y respuestas*. 45 p.
52. Sociedad Española de Biotecnología. 2000. *Plantas transgénicas: preguntas y respuestas*. 45 p.
53. Sociedad Española de Biotecnología. 2003. *Biotecnología y alimentos: preguntas y respuestas*. 31 p.
54. Sociedad Española de Biotecnología. 2004. *Biotecnología y medio ambiente: preguntas y respuestas*. 72 p.
55. Steinbrecher, R.A. (1996). "From green to gene revolution: The environmental risks of genetically engineered crops." *The Ecologist* 26, 273-282.
56. Tabashnik, B.E. (1994). "Delaying insect adaptation to transgenic plants: Seed mixtures and refugia reconsidered." *Proc. R. Soc. London* 255, 7-12.
57. United States Department of Agriculture (1999). "Genetically engineered crops for pest management." *USDA Economic Research Service*, Washington DC.
58. Valdez, M., Rodríguez, I. y Sittenfeld, A. 2004. *Percepción de la biotecnología en estudiantes universitarios de Costa Rica*. *Rev. Biol. Trop.* 3: 745- 756.
59. Indra K. Vasil. 2008. *A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops*. *Plant Cell Rep.* DOI 10.1007/s00299-008-0571-4
60. Anthony V. Arundel, Brigitte van Beuzekom, Iain Gillespie, *Defining biotechnology - carefully*, *Trends in Biotechnology*. Volume 25, Issue 8, , August 2007, Pages 331-332.
61. Benoit Van Aken, *Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution*, *Trends in Biotechnology* Volume 26, Issue 5, , May 2008, Pages 225-227.
62. Gerda M. Botha, Christopher D. Viljoen, *Can GM sorghum impact Africa?*, *Trends in Biotechnology* Volume 26, Issue 2, , February 2008, Pages 64-69.
63. Henry I. Miller, *Biotech's defining moments*, *Trends in Biotechnology* Volume 25, Issue 2, , February 2007, Pages 56-59.
64. Matty Demont, Yann Devos, *Regulating coexistence of GM and non-GM crops without jeopardizing economic incentives*, *Trends in Biotechnology* Volume 26, Issue 7, , July 2008, Pages 353-358

65. Robert H. Richmond, Environmental protection: applying the precautionary principle and proactive regulation to biotechnology, Trends in Biotechnology Volume 26, Issue 8, August 2008, Pages 460-467.
66. Rudra D. Tripathi, Sudhakar Srivastava, Seema Mishra, Nandita Singh, Rakesh Tuli, Dharmendra K. Gupta, Frans J.M. Maathuis, Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants, Trends in Biotechnology Volume 25, Issue 4, April 2007, Pages 158-165.
67. Shane H. Morris, EU biotech crop regulations and environmental risk: a case of the emperor's new clothes?, Trends in Biotechnology Volume 25, Issue 1, January 2007, Pages 2-6.
68. Tomas Macek, Pavel Kotrba, Ales Svatos, Martina Novakova, Katerina Demnerova, Martina Mackova, Novel roles for genetically modified plants in environmental protection, Trends in Biotechnology Volume 26, Issue 3, March 2008, Pages 146-152.
69. Valdez, M., López, R., Jiménez, L. 2004. Estado actual de la biotecnología en Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 3: 733- 743.
70. Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., Datta, K., Datta, S., Dix, P.J., Fauquet, C., Huang, N., Kohli, A., Mooibroek, H., Nicholson, L., Nguyen, T.T., Nugent, G., Raemakers, K., Romano, A., Somers, D.A., Stoger E., Taylor, N. y Visser, R. 2005. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. Mol. Breeding. 15: 305-327.
71. Broothaerts, W., Mitchell, H.J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L.M.A., Yang, W., Mayer, J.E., Roa-Rodriguez, C. and Richard, A. J. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. Nature. 433: 629-633.
72. Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J. y Angharad, M.R. Gatehouse. 2006. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. TRENDS in Plant Science. 6: 302-308.
73. Clark, E. 2006. Environmental risk of genetic engineering. Euphytica. DOI: 10.1007/s10681-006-5940-x.
74. Peterson, R. y Shama, L. 2005. A comparative risk assessment of genetically and conventional wheat production systems. Transgenic Research. 14:859–875.
75. Sang-Min Chung, Manjusha Vaidya and Tzvi Tzfira. 2006. Agrobacterium is not alone: gene by viruses and other bacteria. TRENDS in Plant Science. 1: 1-4.
76. Sharma, K.K., Bhatnagar-Mathur, P. y Thorpe, T.A. 2005. Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 41: 102-112.
77. Zongrang Liu, Changhe Zhou, Keqiang Wu. 2008. Creation and analysis of a novel chimeric promoter for the complete containment of pollen- and seed-mediated gene flow. Plant Cell Rep. 27:995–1004.
78. Jaime E. García G. 2007. Cultivos genéticamente modificados: las promesas y las buenas intenciones no bastan. Rev. Biol. Trop. Vol. 55 (2): 347-364.
79. Jörg Romeis, Detlef Bartsch, Franz Bigler, Marco P Candolfi, Marco M C Gielkens, Susan E Hartley, Richard L Hellmich, Joseph E Huesing, Paul C Jepson, Raymond Layton, Hector Quemada, Alan Raybould, Robyn I Rose, Joachim Schiemann, Mark K Sears, Anthony M Shelton, Jeremy Sweet, Zigfridas Vaituzis, Jeffrey D Wolf. 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. Nature Biotechnology. VOLUME 26 NUMBER 2. 203-208.
80. Alexandra Hu'sken Æ Antje Dietz-Pfeilstetter. 2007. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). Transgenic Res.16:557–569.
81. Ana M. Espinoza-Esquível, Griselda Arrieta-Espinoza. 2007. A multidisciplinary approach directed towards the commercial release of transgenic herbicide-tolerant rice in Costa Rica. Transgenic Res. 16:541–555.
82. Olivier Sanvido Æ Franco Widmer, Michael Winzler Æ Bernhard Streit, Erich Szerencsits, Franz Bigler. 2008. Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. Transgenic Res.17:317–335.
83. Matilde Eizaguirre, Ramon Albajes, Carmen Lopez, Jordi Eras, Belen Lumbierres, Xavier Pons1. 2006. Six years after the commercial introduction of Bt maize in Spain: field evaluation, impact and future prospects. Transgenic Research. 15:1–12.
84. P. K. Ranjekar, Aparna Patankar, Vidya Gupta, Raj Bhatnagar, Jagadish Bentur and P. Ananda Kumar. 2003. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. CURRENT SCIENCE, VOL. 84, NO. 3. 321-329.
85. Anita Grover and R. Gowthaman. 2003. Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. CURRENT SCIENCE, VOL. 84, NO. 3. 330-340.
86. S. R. Bhat and V. L. Chopra. 2003. Choice of technology for herbicide-resistant transgenic crops in India: Examination of issues. CURRENT SCIENCE, VOL. 84, NO. 3. 435-438.
87. I. Dasgupta, V. G. Malathi and S. K. Mukherjee. 2003. Genetic engineering for virus resistance. CURRENT SCIENCE, VOL. 84, NO. 3. 341-354.
88. Paul Christou and Harry Klec (e). 2004. Handbook of plant biotechnology. England : J. Wiley & Sons.