

Transformasi genetik faktor transkripsi *OsMYB6* dan *OsMYB7* pada kultivar padi Nipponbare untuk manipulasi kadar lignin

Genetic transformation of *OsMYB6* and *OsMYB7* transcription factor into Nipponbare rice cultivar for lignin content manipulation

VINCENTIA ESTI WINDIASTRI[♥], CARLA FRIEDA PANTOUW, DWI ASTUTI, DWI WIDYAJAYANTIE, AMY ESTIATI, SATYA NUGROHO^{♥♥}

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong, Bogor 16911, West Java, Indonesia. Tel.: +62-21-8754587, Fax.: +62-21-8754588. ♥email: vinc002@lipi.go.id, ♥♥nugroho_satya@yahoo.com

Manuskrip diterima: 23 Juni 2018 2018. Revisi disetujui: 3 Agustus 2018.

Abstrak. *Windiastri VE, Pantouw CF, Astuti D, Widyajayantie D, Estiati A, Nugroho S. 2018. Transformasi genetik faktor transkripsi OsMYB6 dan OsMYB7 pada padi Nipponbare untuk manipulasi kadar lignin. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 4: 220-224.* Lignin adalah materi alam yang digunakan sebagai bahan mentah di industri bahan bakar dan kimia. Diprediksikan di masa mendatang, permintaan akan lignin untuk kebutuhan-kebutuhan industri tersebut akan meningkat secara signifikan. Sampai saat ini, lignin lebih banyak diproduksi dari tanaman kayu keras yang mempunyai kandungan lignin lebih tinggi dari pada tanaman tak berkayu, misalnya tanaman rerumputan. Manipulasi peningkatan produksi lignin pada tanaman biomass tak berkayu (misalkan sorgum, padi dan ilalang) dapat menjadi salah satu solusi untuk menjadikan tanaman tak berkayu sebagai sumber lignin terbarukan sehingga dapat mengurangi penebangan hutan berkayu. Banyak gen-gen yang terlibat pada jalur biosintesis lignin dan beberapa faktor-faktor transkripsi juga telah diketahui berperan penting dalam pembentukan dinding sel sekunder. Di antara faktor transkripsi tersebut, yang beberapa di antaranya telah teridentifikasi pada tanaman padi, ada beberapa faktor transkripsi yang juga berperan dalam pembentukan lignin; yakni *OsMYB6* dan *OsMYB7*. Untuk memanipulasi kadar lignin pada tanaman padi, kami telah mentransformasikan faktor transkripsi *OsMYB6*, *OsMYB7* dan pC1305 sebagai kontrol pada tanaman model padi *Nipponbare* dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Efisiensi transformasi yang diperoleh untuk masing-masing faktor transkripsi *OsMYB6*, *OsMYB7* dan kontrol pC1305 secara berurutan adalah sebesar 5%, 11% dan 4%. Dari hasil amplifikasi gen penanda, *hptII*, pada tanaman transforman dapat disimpulkan bahwa faktor transkripsi yang berperan dalam pembentukan lignin, yakni *OsMYB6* dan *OsMYB7* berhasil ditransformasikan ke tanaman padi Nipponbare dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*.

Kata kunci: Faktor transkripsi, lignin, transformasi, *OsMYB6*, *OsMYB7*

Abstract. *Windiastri VE, Pantouw CF, Astuti D, Widyajayantie D, Estiati A, Nugroho S. 2018. Genetic transformation of OsMYB6 and OsMYB7 transcription factor into Nipponbare rice cultivar for lignin content manipulation. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 4: 220-224.* Lignin is a raw natural material for fuel and chemical industry. In near future, it is predicted that lignin demands for those industries will increase significantly. In the current situation, hard woody plants, usually from the forest and plantation, are the main resource of lignin production. It is because woody plants have higher content of lignin than non woody plants, i.e. sorghum, rice and alang-alang. Enhanced lignin content manipulation in the non woody plants, grass plants for an example, could be a solution to get other renewable sources, than woody plants, for lignin production. Biosynthesis of lignin are regulated by many genes and transcription factors, among of them identified from rice, i.e., *OsMYB6* and *OsMYB7* and also involved in secondary cell wall formation. To manipulate lignin content in the rice plants, we transformed *OsMYB6*, *OsMYB7* transcription factors and pC1305 empty plasmid as control into Nipponbare rice cultivar mediated by *Agrobacterium*. Transformation efficiencies for *OsMYB6*, *OsMYB7* and pC1305 control are 5%, 11% and 4%, respectively. The result of marker gene (*hptII*) amplification from the total genome DNA of the transformant plants showed that *OsMYB6* and *OsMYB7* transcription factors were successfully transformed into Nipponbare rice cultivar.

Keywords: lignin, transformation, transcription factors, *OsMYB6*, *OsMYB7*

PENDAHULUAN

Lignin, berasal dari bahasa Latin *lignum* yang berarti kayu, adalah polimer organik kompleks yang memberi bentuk struktur jaringan pada tanaman vaskular. Berdasarkan asal tanamannya, secara luas lignin dibagi menjadi tiga kelas; yakni lignin kayu lunak

(Gymnospermae), lignin kayu keras (Angiospermae) dan lignin rerumputan atau tanaman tahunan (Gramineae). Persentase lignin pada tanaman berkayu keras adalah yang tertinggi, dengan persentase sebesar 20-35% dari kayu. Pada umumnya, lignin Gramineae terdiri dari lignin *guaiacyl*, sedangkan lignin tanaman berkayu keras terdiri dari lignin *guaiacyl-syringil* (Bajpai 2017). Tanaman dapat

memproduksi lignin untuk kemudian disimpan pada dinding sel sekunder (Calvo-Flores et al. 2015). Fungsi lignin pada tanaman, selain dalam pembentukan dinding sel, adalah memberi tegakan pada tanaman, mengatur air pada batang dan berperan dalam siklus karbon tanaman (Bajpai 2017).

Selain sebagai salah satu bahan utama serat alam-selain selulosa, hemiselulosa, pectin, dan lain-lain, lignin juga merupakan polimer alam yang paling umum dijumpai di dunia. Pada awalnya, lignin tidak digunakan untuk menghasilkan produk bernilai tambah. Walaupun setiap tahunnya sejumlah besar lignin dihasilkan dari bahan limbah industri pulp dan kertas, namun lignin hanya digunakan sebagai sumber energi dengan cara pembakaran. Baru-baru ini, dengan perkembangan teknologi, lignin dapat digunakan untuk menghasilkan produk bernilai tambah seperti pengganti sebagian resin berfenol, pembuatan busa polyurethane (PU), dan lain-lain (Faruk dan Sain 2015). Meskipun demikian lignin juga merupakan biomolekul target yang ingin diturunkan kadarnya, terutama pada, pada industri yang menggunakan polisakarida lignoselulosa, seperti industri pulp kayu dan lignin. Hal ini dikarenakan keberadaan lignin membuat proses produksi membutuhkan proses lebih banyak, untuk memisahkan lignin dari bahan yang diinginkan (Mukherjee et al. 2016).

Studi mengenai biosintesis lignin telah banyak dilakukan (Zhong dan Ye 2009; Zhao dan Dixon 2011; Yoon et al. 2015). Pada tanaman *Arabidopsis*, keluarga protein MYB banyak berperan dalam biosintesis lignin dan pembentukan dinding sel sekunder (Rao dan Dixon 2018), salah satunya adalah *AtMYB1* yang telah berhasil ditransformasikan pada tanaman padi dan menghasilkan tanaman padi transforman yang mengandung lignin lebih tinggi dari pada kerabat liarnya (Koshihira 2016). Pada tanaman padi terdapat gen ortholog dari *AtMYB61* yakni *OsMYB6* dan *OsMYB7* yang telah teridentifikasi sebagai faktor transkripsi yang berperan pada pembentukan dinding sel sekunder pada padi dan diperkirakan juga berperan dalam biosintesis lignin (Hirano et al. 2013). Oleh karena itu, pada penelitian ini, kami bermaksud untuk mempelajari strategi manipulasi kandungan lignin pada tanaman padi dengan mentransformasikan faktor transkripsi *OsMYB6* dan *OsMYB7* pada tanaman model padi kultivar Nipponbare melalui perantara *Agrobacterium*.

BAHAN DAN METODE

Benih, sterilisasi dan persiapan kultur kalus

Benih padi yang digunakan adalah kultivar Nipponbare dari koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Setelah dikupas, benih padi dicuci dengan air dan disterilisasi permukaannya dengan cara dicuci dengan fungisida (Benlate[®]SP) 3% (w/v) selama sepuluh menit, alkohol 70% selama satu menit dan Bayclin[®] 70% (v/v) yang mengandung beberapa tetes Tween selama 30 menit sambil digoyang. Setelah itu, benih dicuci dengan akuades steril sebanyak lima kali, masing-masing selama lima menit dan ditanam pada media induksi

kalus selama tiga minggu pada kondisi gelap. Empat hari sebelum ditransformasi, kalus dipotong menjadi beberapa bagian dan ditumbuhkan kembali di media induksi kalus pada 28°C kondisi gelap.

Plasmid dan strain *Agrobacterium*

Plasmid pGWB2-*OsMYB6* dan pGWB2-*OsMYB7* yang diperoleh dari Prof. Toshiaki Umezawa (RISH-Universitas Kyoto, Jepang) merupakan vektor biner yang telah disisipi gen MYB, faktor transkripsi yang berperan dalam biosintesis lignin dan dikendalikan oleh promoter konstitutif CaMV35S. Vektor tersebut mengandung gen penyeleksi *hygromycin phosphotransferase (hpt)* dan *kanamycin*. Kedua vektor dan plasmid kosong pC130, masing-masing, diintroduksi ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 menggunakan Gene Pulser Xcell[™] Electroporation System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Sebanyak 100 ng DNA plasmid dipipet ke dalam 20 µL sel elektrokompeten *Agrobacterium tumefaciens* (Lin et al. 1995). Masing-masing suspensi sel tersebut dimasukkan ke dalam kuvet (Gene Pulser Cuvette, 0.1 cm, Bio-Rad) untuk dilakukan elektroporasi dan dipindahkan ke dalam 1 mL media YM cair dan diinkubasi selama 3 jam (30°C, 250 rpm). Masing-masing suspensi sel disebar di atas permukaan media agar YM yang mengandung kanamycin (50 mg/L) dan rifampicin (20 mg/L), lalu diinkubasi selama 48 jam (30°C). Satu koloni bakteri tersebut diambil dan ditumbuhkan pada media LB padat mengandung rifampisin 20 mg/L dan kanamisin 50 mg/L selama tiga hari (30°C). Hasil dari kultur tersebut disuspensikan dalam media Asam Amino (AAM) cair yang telah dimodifikasi (Hiei et al. 1994) dengan penambahan 100 µM Asetosiringon dan dishaker sampai OD₆₀₀ = 1 untuk dijadikan larutan kokultivasi.

Transformasi

Metode transformasi yang digunakan sesuai dengan Hiei et al. (1994) dengan modifikasi. Alih-alih direndam dalam larutan kokultivasi, potongan kalus ditetesi dengan ±5µl larutan kokultivasi, dan ditumbuhkan pada media kokultivasi padat selama tiga hari pada 28°C dalam kondisi gelap. Setelahnya, kalus dipindahkan ke media seleksi yang mengandung 100 mg/L cefotaxim dan 50 mg/L higromisin selama empat sampai lima minggu dengan penggantian media baru setiap dua minggu. Hasil proliferasi kalus yang muncul dipindahkan ke media regenerasi (LS) yang mengandung 100 mg/L cefotaxim dan 40 mg/L higromisin sampai membentuk tunas (bintik hijau) untuk selanjutnya dipindah ke media 0.5 MS yang mengandung 100 mg/L cefotaxim dan 30 mg/L higromisin. Tanaman hasil transformasi yang telah kuat perakarannya diaklimatisasi di Rumah Kaca Transgenik dengan ditumbuhkan secara individual pada pot diameter 10cm dengan media tanah dan pupuk kandang (1:1) yang telah disterilkan. Setelah dua minggu, tanaman transforman dipindahkan ke ember berdiameter 30 cm dengan media tanah dan pupuk kandang (1:1) untuk dipelihara lebih lanjut. Pada tiap tahap transformasi dihitung jumlah kalus atau eksplan penyintas untuk penghitungan efisiensi transformasi.

Analisis integrasi gen

Total DNA genom padi diekstraksi dari organ daun berdasarkan metode CTAB yang telah dimodifikasi (Doyle dan Doyle 1987) dan dilarutkan dalam TE RNase. Amplifikasi gen hpt dilakukan dengan T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) menggunakan DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Program PCR yang digunakan diawali dengan denaturasi awal (95°C, 2 menit). Diikuti siklus PCR sebanyak 35 kali yang terdiri dari denaturasi (95°C, 30 detik), *annealing* (60°C, 30 detik) dan *extension* (72°C, 1 menit), diakhiri dengan *final extension* (72°C, 7 menit). Setiap reaksi terdiri dari 4,77 µL Dream Taq Green PCR Master Mix 2X, 10 pg-1 µg DNA genom padi dan 0,48 mM masing-masing primer dalam 12,5 µL volume total reaksi. Urutan basa primer yang digunakan untuk primer forward hpt-F 5'-GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG-3' dan untuk primer reverse hpt-R 5'-GCATCTCCC GCCGTGCAC-3'.

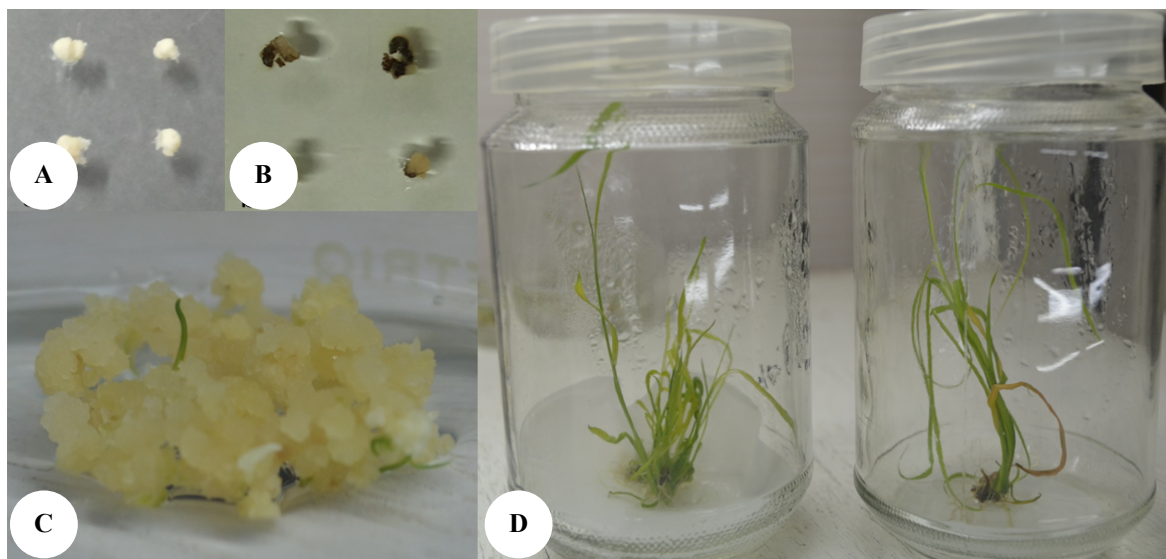
HASIL DAN PEMBAHASAN

Efisiensi transformasi

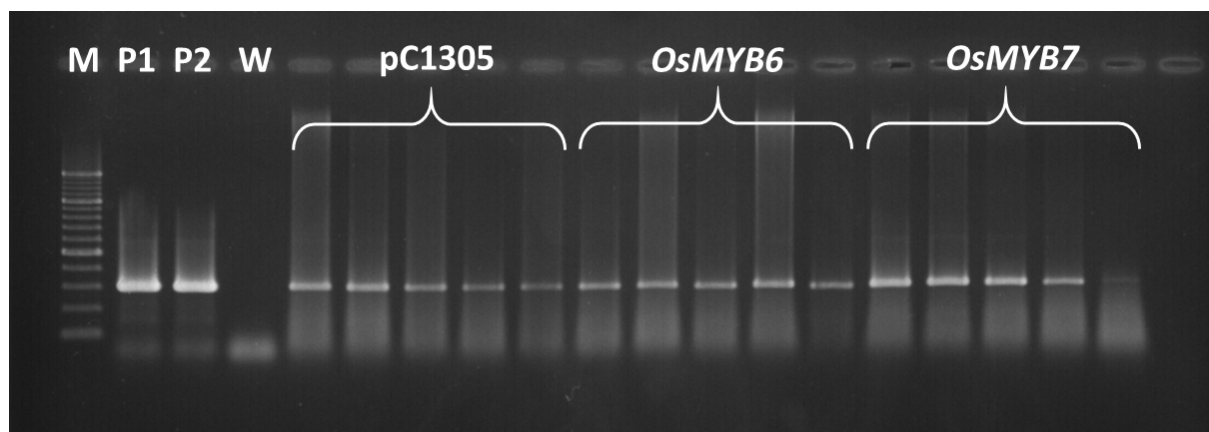
Pada penelitian ini kokultivasi semua konstruksi plasmid dilakukan secara bersamaan, walaupun pertumbuhan selanjutnya tidak persis sama, namun masih dalam rangkaian waktu yang mirip. Setelah kokultivasi, kalus yang mampu berproliferasi pada media seleksi yang mengandung higromisin, diperkirakan adalah kalus-kalus yang berhasil ditransformasi. Pada Tabel 1, dapat dilihat bahwa kalus yang ditransformasi dengan faktor transkripsi *OsMYB6* menghasilkan lima kalus yang dapat berproliferasi pada media seleksi, dan semua hasil proliferasi tersebut dapat beregenerasi menghasilkan plantlet untuk selanjutnya diaklimatisasi. Dari hasil tersebut, efisiensi transformasi faktor transkripsi *OsMYB6*

adalah sebesar lima persen. Sedangkan pada faktor transkripsi *OsMYB7*, setelah kokultivasi didapatkan 16 kalus yang mampu berproliferasi pada media seleksi. Namun hanya 14 kalus yang mampu beregenerasi dan diaklimatisasi, sehingga efisiensi transformasi dari faktor transkripsi *OsMYB7* adalah sepuluh persen. Efisiensi transformasi faktor transkripsi *OsMYB7* tersebut adalah efisiensi transformasi yang paling besar, apabila dibandingkan dengan transformasi faktor transkripsi *OsMYB6* dan kontrol pC1305.

Transformasi genetik pada tanaman telah sering dilaporkan (Hiei et al. 1994; Hiei dan Komari 2006, 2008; Toki 2006). Hiei et al. (1994 2008) dan Toki (2006) melaporkan kesuksesan melakukan transformasi genetik pada padi kultivar Nipponbare dengan efisiensi transformasi yang lebih tinggi (12-85%) dari pada yang dihasilkan pada penelitian ini. Namun pada penelitian Rahmawati et al. (2010) dan Enggarini et al. (2017) dilaporkan bahwa efisiensi transformasi pada padi kultivar Nipponbare juga berkisar pada sebelas persen. Transformasi padi Nipponbare dengan perantara *Agrobacterium rhizobium* mempunyai efisiensi transformasi sebesar 11,4% (Rahmawati et al. 2010) sedangkan transformasi padi dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* mempunyai efisiensi sebesar 11,9% (Enggarini et al. 2017). Sahoo et al. (2011), menyebutkan bahwa pemilihan benih dan lama penyimpanan media dengan hormon akan mempengaruhi efisiensi transformasi. Makin tua benih yang digunakan sebagai bahan induksi kalus, efisiensi transformasi akan semakin berkurang. Makin lama penyimpanan media dengan hormon, maka aktivitas hormon akan semakin menurun dan dapat mengakibatkan penurunan efisiensi. Pada penelitian ini, diperkirakan penggunaan benih yang sudah berumur lebih dari tiga tahun menyebabkan kualitas performa transformasi tidak dapat sebaik transformasi padi pada umumnya.



Gambar 1. Proses transformasi padi kultivar Nipponbare. A. Hasil induksi kalus yang siap ditransformasi, B. Proses seleksi kalus hasil kokultivasi pada media seleksi, C. Kalus proliferasi yang sedang beregenerasi, D. Plantlet yang siap diaklimatisasi.



Gambar 2. Elektroforegram hasil amplifikasi gen *hptII* pada total genom masing-masing tanaman transforman. Setiap sampel tanaman menunjukkan keberadaan pita gen *hptII* sebesar 300 bp. Keterangan: M: Marker 200 bp, P1: pGWB2-*OsMYB6*, P2: pGWB2-*OsMYB7*, W: air

Tabel 1. Rangkuman data hasil transformasi dan regenerasi padi kultivar Nipponbare dengan masing-masing faktor transkripsi

Plasmid/gen	Σ Kalus			Efisiensi	
	Infeksi (kokultivasi)	Tahan higromisin (%)	Regenerasi	Regenerasi (%)	Transformasi (%)
pGWB2- <i>OsMYB6</i>	100	5 (5)	5	100	5
pGWB2- <i>OsMYB7</i>	140	16 (11.4)	14	87.5	10
pC1305	110	11 (10)	5	45.5	4

Tabel 2. Hasil analisis integrasi gen

Plasmid/gen	Jumlah tanaman	Mengamplifikasi <i>hptII</i>
pGWB2- <i>OsMYB6</i>	5	5
pGWB2- <i>OsMYB7</i>	14	14
pC1305	5	5

Analisis integrasi gen dengan amplifikasi gen

Untuk mengetahui apakah faktor transkripsi yang ditransformasi telah terintegrasi ke dalam genom tanaman transforman, maka dilakukan amplifikasi gen penanda seleksi, yakni *hptII*, dari DNA total genom seluruh tanaman transforman yang telah dihasilkan. Pada gambar 2, dapat dilihat bahwa sampel tanaman transforman dapat mengamplifikasi gen *hptII* dengan panjang pita yang sama dengan hasil amplifikasi dari DNA plasmid pGWB2-*OsMYB6* dan pGWB2-*OsMYB7*. Sehingga dapat diartikan bahwa gen-gen yang ditransformasikan telah terintegrasi pada genom tanaman transforman.

Pada penelitian ini, walaupun efisiensi transformasi sangat kecil, namun tingkat regenerasi cukup tinggi. Dari hasil regenerasi tersebut, berdasarkan data dari Tabel 2 dapat dinyatakan bahwa tanaman yang beregenerasi adalah tanaman yang mengintegrasikan gen-gen yang ditransformasikan atau tanaman transforman. Dalam kegiatan transformasi sering ditemukan tanaman non

transforman yang lolos seleksi. Hal tersebut biasanya dikarenakan kurangnya kadar zat antibiotik pada media yang dikarenakan berkurangnya efektivitas zat antibiotik karena usia media atau memang kadar antibiotik yang ditambahkan pada media sangat sedikit.

Terintegrasinya gen-gen yang ditransformasikan pada semua sampel tanaman transforman dapat diartikan bahwa transformasi genetik faktor transkripsi *OsMYB6* dan *OsMYB7* serta pC1305 telah berhasil dilakukan. Selanjutnya, untuk mempelajari tentang tanaman transforman yang membawa konstruksi faktor transkripsi *OsMYB6* dan *OsMYB7*, perlu dilakukan analisis molekular, agronomi serta ekstraksi kandungan lignin pada tanaman transforman tersebut.

KESIMPULAN

Transformasi faktor faktor transkripsi *OsMYB6* dan *OsMYB7* serta pC1305 pada padi kultivar Nipponbare dengan perantara *Agrobacterium* telah berhasil dilakukan dengan efisiensi transformasi sebesar 5%, 11% dan 4% untuk faktor transkripsi *OsMYB6* dan *OsMYB7* serta pC1305. Keberhasilan transformasi ini dapat dilihat dengan dibuktikan dengan teramplifikasinya gen *hptII* pada setiap sampel tanaman transforman, yang berarti bahwa gen-gen yang ditransformasikan telah terintegrasi pada tanaman-tanaman transforman. Penelitian ini adalah penelitian awal untuk mempelajari manipulasi kadar lignin pada tanaman

padi. Pada saat ini telah didapatkan tanaman T₀ yang selanjutnya akan dianalisis pada tingkat molekular, agronomi dan kadar lignin secara lebih lanjut sebagai upaya untuk menganalisa strategi manipulasi kandungan lignin pada tanaman padi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Toshiaki Umezawa (RISH, Kyoto University, Jepang) yang telah menyediakan plasmid pGWB2-*OsMYB6* dan pGWB2-*OsMYB7* sebagai bahan penelitian, dan kepada Dadang Supriatna dan Budi Satrio Maulana yang telah membantu penelitian ini. Penelitian ini didanai oleh kegiatan SATREPS.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajpai P. 2017. Carbon Fibre from Lignin. Springer. Singapore.
- Calvo-Flores FG, Dobado JA, Isac-García J, Martín-Martínez FJ. 2015. Lignin and lignans as renewable raw materials: chemistry, technology and applications. John Wiley & Sons, United Kingdom.
- Doyle J, Doyle JL. 1987. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull* 19 (11): 11-15.
- Enngarini W, Polosoro A, Sustiprijatno S, Trijatmiko KR. 2017. The introduction of *CsNitr1-L* gene construction with *Ubiquitin* promoter using *Agrobacterium tumefaciens* and its molecular detection on rice cultivar Nipponbare. *J Biologi Indones* 13 (2): 261-270. [Indonesian]
- Faruk O, Sain M. 2015. Lignin in Polymer Composites. William Andrew, Canada
- Hiei Y, Komari T. 2006. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult* 85 (3): 271.
- Hiei Y, Komari T. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nat Protoc* 3 (5):824.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6 (2): 271-282.
- Hirano K, Kondo M, Aya K, Miyao A, Sato Y, Antonio BA, Namiki N, Nagamura Y, Matsuoka M. 2013. Identification of transcription factors involved in rice secondary cell wall formation. *Plant Cell Physiol* 54 (11): 1791-802.
- Koshiba T, Yamamoto N, Tobimatsu Y, Yamamura M, Suzuki S, Hattori T, Mukai M, Noda S, Shibata D, Sakamoto M, Umezawa T. 2017. MYB-mediated upregulation of lignin biosynthesis in *Oryza sativa* towards biomass refinery. *Plant Biotechnol J* 34 (1):7-15.
- Lin JJ, Assad-Garcia N, Kuo J. 1995. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Sci* 109 (2): 171-177.
- Mukherjee A, Mandal T, Ganguly A, Chatterjee PK. 2016. Lignin degradation in the production of bioethanol-a review. *Chem Biol Eng Rev* 3 (2): 86-96.
- Rahmawati S, Jefferson OA, Sopandie D, Suharsono S, Slamet-Loedin IH. 2010. Comparative analysis of rice transformation using *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Indon J Biotech* 15 (1): 37-45
- Rao X, Dixon RA. 2018. Current models for transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in grasses. *Front Plant Sci* 9: 399.
- Sahoo KK, Tripathi AK, Pareek A, Sopory SK, Singla-Pareek SL. 2011. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. *Plant Meth* 7 (1): 49.
- Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H. 2006. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J* 47 (6): 969-976.
- Yoon J, Choi H, An G. 2015. Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. *J Integr Plant Biol*. 57 (11): 902-912.
- Zhao Q, Dixon RA. 2011. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends Plant Sci*. 16 (4): 227-233.
- Zhong R, Ye ZH. 2009. Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signal Behav* 4 (11): 1028-1034.