

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการถ่ายยีน *mrjp2* เข้าสู่ข้าว เพื่อเพิ่มกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ด โดยสร้างพลาสมิด pBU3 (*Gt1::mrjp2::Tnos*) สำหรับถ่ายยีนในข้าว และได้ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรมด้วย จากการทดลองสามารถสรุปผลการทดลองได้ ดังนี้

1. ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าว

1.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของข้าวในอาหารสูตร N6D ที่มีปริมาณโพสเฟอรัส 2.88 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าข้าวพันธุ์ Kitaake สามารถเกิดแคลลัสได้สูงกว่าข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง ส่วนแคลลัสของข้าวทั้งสองพันธุ์มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยให้แคลลัสที่มีลักษณะที่ดีเหมือนกัน คือ มีสีเหลืองอ่อน กลม แน่น

1.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002) พบว่า วิธีการถ่ายยีนของ Endo et al. (2002) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนมากกว่าวิธีของ Toki (1997) เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดตายสูงกว่า และยังพบอีกว่า เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองมีค่าสูงกว่าข้าวพันธุ์ Kitaake แต่อย่างไรก็ตาม แคลลัสที่รอดของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้

2. การตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน

2.1 การถ่ายพลาสมิด pBU3 ให้กับข้าวพันธุ์ Kitaake พบว่า ได้ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งหมด 20 ต้น และเมื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* โดยวิธี GUS assay พบว่า ต้นข้าว BU3 เกิดสีฟ้า 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า สามารถถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวได้

2.2 เมื่อนำใบของต้นข้าว BU3 ที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* มาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* พบว่า ต้นข้าวทั้งหมดที่นำมาทดสอบโดยวิธีพีซีอาร์มีการแทรกของยีน *mrjp2* ในจีโนมของข้าว

2.3 เมื่อนำต้นข้าวรุ่น T_1 ของต้น BU3 มาทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม พบว่า อัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS- มีอัตราส่วน 3:1 แสดงว่า การถ่ายทอดของยีนจากต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมไปยังรุ่นต่อไปเป็นไปตามกฎของเมนเดล นอกจากนี้ยังพบว่า มีการถ่ายทอด

ของยีนไปยังรุ่นถัดไปได้ถึงต้นข้าวรุ่น T_3 และ T_4 แสดงว่า การถ่ายทอดยีนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม เป็นไปอย่างคงตัวหรือมีความเสถียร (stable inheritance)

2.4 เมื่อวิเคราะห์ต้นข้าวด้วยเทคนิค Southern blotting โดยใช้ probe ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีน *mrjp2* ที่ติดฉลากด้วย DIG พบว่า มีการแทรกของยีน *mrjp2* ในจีโนมของข้าว ดัดแปลงพันธุกรรมที่นำมาทดสอบโดยมียีนแทรกที่บริเวณ 1 ตำแหน่ง (a single insertion site)

3. การแสดงออกของยีน *mrjp2* ในเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

เมื่อนำอาร์เอ็นเอจากเมล็ดข้าวอ่อนรุ่น T_2 และ T_3 ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม มา ตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* พบว่า มีการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดจากเมล็ดข้าวแก่ด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้ แอนติบอดี Anti-His พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน GUS ซึ่งมี His tag อยู่ด้านปลาย carboxyl แต่ ไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ได้ อาจเนื่องจากการแสดงออกของโปรตีน MRJP2 น้อยมาก หรือโปรตีนมีการสลาย (degraded) ในเมล็ดข้าวแก่ และการใช้ Anti-His ตรวจสอบ His tag ของโปรตีน MRJP2 ทำให้มีความจำเพาะต่อ MRJP2 น้อย และมีความไวในการตรวจสอบต่ำ

อย่างไรก็ตามเมื่อนำเมล็ดอ่อนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blotting พบว่า สามารถตรวจสอบโปรตีนขนาดประมาณ 50 kD ซึ่งมีการแสดงออกสูงมากใน เมล็ดอ่อนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสูงกว่าเมล็ดข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งคาดว่าจะเป็นโปรตีน MRJP2 ที่มีการแสดงออกในเมล็ดอ่อนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

ข้อเสนอแนะ

1. การใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน MRJP2 คือ Anti-MRJP2 อาจจะทำให้ ตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *mrjp2* ได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากมีความจำเพาะกับโปรตีน MRJP2 มากกว่าการใช้ Anti-His ซึ่งจะทำให้เพิ่มความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบโปรตีน MRJP2 ได้ดีขึ้น

2. แคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองหลังผ่านขั้นตอนการถ่ายยีนไม่สามารถพัฒนาไป เป็นต้นอ่อนได้ ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของฮอร์โมนในกลุ่มของออกซิน และไซโตไคนินที่ใช้

ไม่เหมาะสม ดังนั้น ต้องมีการศึกษาการชักนำให้แคลสเกิดเป็นต้นให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยเฉพาะการหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลสที่ผ่านการถ่ายยีนแล้วเจริญเป็นต้นให้ได้ โดยอาจทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของฮอร์โมนพืช และอาจทดลองเปลี่ยนฮอร์โมนพืชเป็นชนิดอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

- กรมการค้าภายใน. 2552. ยุทธศาสตร์ข้าวไทย ปี 2550-2554. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.dit.go.thcontentdetail.asptypeid=16&catid=104&ID=1539.pdf> (23 มีนาคม 2552).
- กษิตติ ดิษฐบรรจง. 2544. การสร้างสิ่งมีชีวิตที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม. เทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. น. 6-13. ใน. เทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และนิวเคลียร์เทคนิค กรมวิชาการเกษตร.
- เกศสุคนธ์ มณีวรรณ, สุนันทิพย์ บุนนาค และ อนวัช สุวรรณกุล. 2548. การส่งถ่ายยีนโคทิเนสเข้าสู่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1. น.375 - 381. ใน เอกสารการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14. กรุงเทพฯ: สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย.
- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์, บุรณศักดิ์ เชื้อทอง และ นลินี รุ่งเรืองศรี. 2548. การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย. น.55-56. ใน รายงานประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ทรงเชาว์ อินสัมพันธ์. 2545. ข้าว (*Oryza sativa* L.). น.2-26. ใน. เอกสารประกอบการสอน วิชาพืชไร่สำคัญของประเทศไทย. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- บุญหงษ์ จงคิด. 2547. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 182 น.
- บุรณศักดิ์ เชื้อทอง, ณิชมน ธรรมรักษ์, ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์, แสงทอง พงษ์เจริญกิต, วราภรณ์ แสงทอง และ นลินี รุ่งเรืองศรี. 2549. ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง. น.363-370. ใน. รายงานประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 7. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ประภา ศรีพิจิตร และ พรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม. 2537. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพพะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์.) 28 : 27 – 37.

พรทิพย์ ถิ่นจวงจันทร์. 2539. การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคให้กับข้าวไทยบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 86 น.

มรกต ตันติเจริญ และ ศิริพร จำรัสเลิศลักษณ์. ม.ป.ป. เทคโนโลยีชีวภาพกับการพัฒนาสายพันธุ์ข้าว. ปทุมธานี: ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 10 น.

มูลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. 2549. จุดกำเนิดและประวัติข้าวไทย. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice1.htm (23 มีนาคม 2552).

ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์กุล, สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล และอมรา ทองปาน. 2543. การแสดงออกของยีน Chymotrypsin inhibitor ของถั่วพูในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. น.252-256. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์แห่ง ครั้งที่ 11. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่. 2547. เอกสารแนะนำพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตอง. น.1-2. ใน. เอกสารเผยแพร่. เชียงใหม่: ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ สันป่าตอง.

สภาหอการค้าแห่งประเทศไทย. 2552. ปริมาณการส่งออกข้าวของไทย ปี 2548-2551. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา [http://www.dft.moc.go.th/level4Frame.asp?sPage=the_files/\\$8/level4/Yc46.htm&level4=223](http://www.dft.moc.go.th/level4Frame.asp?sPage=the_files/$8/level4/Yc46.htm&level4=223) (23 มีนาคม 2552).

อรรควุฒิ ทศน์สองชั้น. 2526. เรื่องของข้าว. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 312น.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 336 น.

อัมมาร สยามวาลา และ วิโรจน์ สยามวาลา. 2533. ประมวลความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศไทย. 436 น.

Aldemita, R.R. and T. K. Hodges. 1996. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. **Planta** 199: 612-617.

Al-Forkan, M., J.B. Power. and M.R. Davey. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of Bangladeshi indica rices. **Cellular & Mol. Bio. Letters** 13: 577 – 582.

- Cao, M.X., J.Q. Huang. and J.A. Lu. 2004. Engineering higher yield and herbicide resistance in rice by *Agrobacterium*-mediated multiple gene transformation. **Crop Science** 44: 2206 – 2213.
- Chan, M.T., H.H. Chang. and S.M. Yu. 1993. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. **Plant Molecular Biology** 22: 491-509.
- Cheng, X., R. Sardana. and I. Altosaar. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. **Proc. Natl. Acad. Sci** 95: 2767-2772.
- Dong, J.J., W.M. Teng. and Hall T.C. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of an elite cultivar of Texas rice. pp.143-151. In. **Rice genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium 16-20 Oct 1995**. Manila (Philippines): International Rice Research Institute.
- Duangporn, S., K. Sirawut. and S. Siriporn. 2003. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*). **Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 36(6): 572-579.
- Endo, S., K. Sugita¹. and H. Ebinuma¹. 2002. Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the *ipt*-type MAT vector system. **The Plant Journal** 30(1): 115-122.
- Fang, Y. and R.I. Pennell. 2005. Method and materials for improving plant drought tolerance. **International Patent no.WO2005/105836 A2**. 10 November 2005.
- Goto, F., T. Yoshihara. and F. Takaiwa. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. **Nat. Biotechnol** 17: 282–286.
- Haseloff, J., K.R. Siemering. and S. Hodge. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green. fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94(6): 2122-2127.

- Hiei, Y., S. Ohta. and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant J** 6: 271-282.
- Hiei, Y., T. Komari. and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Mol. Bio** 35: 205-218.
- Huw, D.J., D. Angela. and W. Huixia. 2005. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. **Plant Methods** 1:5.
- Hwang, S.K. and Y.M. Kim. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes **J. Biochem. Mo. Biol** 33(6): 537-546.
- Imjongjirak, C., S. Klinbunga. and S. Sittipraneed. 2005. Cloning expression and genomic organization of genes encoding major royal jelly protein 1 and 2 of the honey bee (*Apis cerana*). **Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 38(1): 49 – 57.
- Judova, J., R.S. Utka. and J. Simuth. 2004. Transformation of tobacco plants with cDNA encoding honey bee royal jelly MRJP1. **Biologia Plantarum** 48(2): 185 – 191.
- Kan, W. 2009. Growth chamber care for transgenic rice plants of Japonica cv. 'Nipponbare' or 'Kitaake' – soilless mix. **[Online]**. Available <http://www.agron.iastate.edu/ptf/Protocol/Rice%20GC%20soilless%20mix%20protocol.pdf> (23 March 2009).
- Kohno, K., I. Okamoto. and M. Kurimoto. 2004. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. **BioSci BioTechnol BioChem** 68(1):138-45.
- Kimura, Y., T. Takaku. and H. Okuda. 2003. Antitumor and antimetastatic actions by royal jelly in Lewis lung carcinoma-bearing mice. **Journal of Traditional Medicines** 20(5): 195-200.

- Lazzeri, P.A. and P.R. Shewry. 1993. Biotechnology of cereals. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** 11: 79-145.
- Lundberg, K.S., D.D. Shoemaker. and E.J. Mathur. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. **Gene** 108: 1-6.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15: 473-497.
- Okita, T.W., Y.S. Hwang. and H.B. Krishnan. 1989. Structure and expression the rice glutelin multigene family. **The journal of Biological Chemistry** 264(21): 12573-12581.
- Peng, L.A., L.L. Lyznik. and T.K. Hodges. 1990. Co-transformation of indica rice protoplasts with *gus A* and *neo* genes. **Plant cell reports** 9: 168-172.
- Saharan, V., R.C. Yadav. and B.P. Chapagain. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice(*Oryza sativa* L.). **African journal of biotechnology** 3(5): 256-259.
- Schmitzova, J., J. Kludiny. and J. Simuth. 1998. A family of major royal jelly proteins of the honey bee *Apis mellifera* L. **Cell Mol. Life. Sci.** 54: 1020-1030.
- Smith, R.H. and E.E. Hood. 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. **Crop Science** 35: 301 - 309.
- Takenaka, T. and Y. Takenaka. 1996. Royal jelly from *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. **Biosci. Biotech. Biochem** 60: 518-520.
- Taniguchi, Y., K. Kohno. and M. Kurimoto. 2003. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. **International Immunopharmacology** 3(9): 1313-24.
- Thadavong, S., P. Sripichitt. and P. Jompuk. 2002. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of glutinous rice (*Oryza sativa* L.) cultivar TDK1. **Kasetsart J.(Nat.Sci.)** 36: 334-344.

- Toki, S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. **Plant Molecular Biology** 15(1): 16-21.
- Toki, S., N. Hara. and H. Tanaka. 2006. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **The Plant Journal** 47: 969–976.
- Toki, S., S. Takamatsu. and H. Uchimiya. 1992. Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. **Plant Physiol** 100: 1503-1507.
- Ye, X., S. Al-Babili. and I. Potrykus. 2000. Engineering provitamin A (b-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science** 287: 303-305.
- Walter, M., C. Chaban. and J. Kudla. 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. **Plant Journal** 40(3): 428-438.
- Yamagata H. and Tanaka K. 1985. The site of synthesis and accumulation of rice storage protein. **Plant & Cell Physiology** 27(1): 135 – 145.
- Zupan, J.R. and P. Zambryski. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiol** 107: 1041-1047.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. **Chotipa Sakulsingharoj**, Siriporn Sittipraneed and Thomas W. Okita. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice with *mrjp2* cDNA from *Apis cerana*. The meeting of the Thailand Research Fund and The Commission of Higher Education. 13-15 October 2005 Regent hotel, Cha am, Petchburi, Thailand.
ผลงานวิจัยที่ได้รับเกียรติบัตรเสนอผลงานวิจัยดีเยี่ยมแบบโปสเตอร์ในการประชุม
นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. 13-15 ตุลาคม 2548
2. **Chotipa Sakulsingharoj**, Buranasak Cheuthong, Nitchamon Thamaragsa, Saengtong Pongjaroenkit, Siriporn Sittipraneed and Thomas W. Okita. 2005. Expression of *mrjp2* gene from Thai honeybee in rice seeds for enhanced essential amino acid content. The 5th International Rice Genetics Symposium (RG5) and 3rd International Rice Functional Genomics Symposium. The EDSA Shangri-la hotel, Manila, Philippines, 20-23 November 2005.
3. บุณตศักดิ์ เชื้อทอง ณิชมน ธรรมรักษ์ ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ แสงทอง พงษ์เจริญกิต วราภรณ์ แสงทอง และณลินี รุ่งเรืองศรี. 2549. ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 7 25-26 พฤษภาคม 2549 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. หน้า 363-370.
4. Buranasak Chuethong, Nitchamon Thamaragsa, **Chotipa Sakulsingharoj**, Saengtong Pongjaroenkit, Varaporn Sangtong, Siriporn Sittipraneed and Thomas W. Okita. 2007. Rice Transformation of Major Royal Jelly Protein Gene Using *Agrobacterium tumefaciens*. Proceedings, The 2nd International Conference on Rice for the Future. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. 5-9 November, 2007.
5. **Chotipa Sakulsingharoj**, Buranasak Chueathong, Warunee Hermharn, Nitchamon Thamaragsa, Saengtong Pongjaroenkit, Siriporn Sittipraneed and Thomas W. Okita. Transformation and Expression of Major Royal Jelly Protein (*mrjp2*) Gene in Rice for Increased Seed Protein Quality
In preparation.

ภาคผนวก



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) กระทรวงศึกษาธิการ
COMMISSION ON HIGHER EDUCATION



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
THE THAILAND RESEARCH FUND

เกียรติบัตรเสนอผลงานวิจัยดีเด่นแบบโปสเตอร์ เพื่อแสดงว่า

ดร.ช่อทิพา สกุดสิงหาโรจน์

เป็นผู้เสนอผลงานวิจัยดีเด่น

ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่..พ.บ.เมธีวิจัยอาวุโส สกว.

ระหว่างวันที่ ๑๓ - ๑๕ ตุลาคม ๒๕๔๘

ของมหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำคุณประโยชน์ในด้านการสร้างสรรค์ปัญญา

เพื่อพัฒนาประเทศสืบต่อไปชั่วกาลนาน

Signature

ศาสตราจารย์พิเศษ ดร. ภาวิฑ์ ทองโรจน์
เลขาธิการคณะกรรมการการอุดมศึกษา

Signature

ศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวัติ บุญ-หลง
ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ABSTRACTS



International Rice Genetics Symposium

A platform for exploring developments in rice
genetics and their applications



and 3rd International Rice Functional Genomics Symposium

19-23 November 2005

Edsa Shangri-La Hotel,
Manila, Philippines

IRRI

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE

P372

Expression of *mrjp2* gene from Thai honeybee in rice seeds for enhanced essential amino acid content

Chotipa Sakulsingharoj¹, Buranasak Cheuthong², Nitchamon Thamaragsa³, Saengtong Pongjaroenkit⁴, Siriporn Sittipraneed⁵, Thomas W. Okita⁶
 Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sunsai, Chiang Mai 50290, Thailand

The nutritional content of rice is deficient in several amino acids essential for human growth and development. To increase the protein quality of this cereal, a gene encoding a 'major royal jelly protein' (MRJP) isolated from Thai honeybee *Apis cerana* was transformed into rice. The MRJP was selected as it is of high protein value, its composition consists of an exceptional content (45-49 %) of essential amino acids. Both japonica and indica rice varieties were transformed with the *mrjp2* cDNA under the control of the endosperm-specific glutelin Gt1 promoter and 3' nos terminator. Hygromycin-resistant calli were obtained for both japonica and indica rice lines and showed GUS expression. PCR analysis of leaf genomic DNA from regenerated plants using *mrjp2* gene specific primers showed the expected amplified product of about 500 bp in many transgenic plants. Developing seeds of PCR-positive lines showed the expression of *mrjp2* transcripts by RT-PCR and protein by immunoblotting. Studies to determine the intracellular location of MRJP mRNA and protein in the cell and the amino acid composition of seeds from selected homozygous lines are currently underway. These results as well as future plans to obtain high protein rice will be discussed.

P373

Pea albumin 1b (PA1b), an entomotoxic cysteine-rich peptide, protects transgenic rice seeds against the stored-product pest *Sitophilus oryzae*

Julie Petit¹, Gabrielle Duport², Yvan Rahbé², Emmanuel Guiderdoni¹, J.C. Breitter¹
¹CIRAD-AMIS, UMR PIA, TA 40/03, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France, ²UMR INRA-INSA de Lyon BF2I (Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions), Bat. Louis-Pasteur, 20 av. A. Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France

Pea albumin 1b (PA1b), a plant entomotoxin isolated from *Pisum sativum* (Delobel et al., 1998), was used to generate transgenic rice lines resistant to the stored-product insect pest *Sitophilus oryzae*. PA1b is the result of the post-transcriptional cleavage of the albumin polypeptide PA1 which also leads to the release of a second peptide, PA1a (53 amino acids). PA1b is a cysteine-rich peptide of 37 amino acids belonging to the cystine-knot family (Jouvencal et al., 2003). In pea, different nucleotide sequences (Louis et al., 2004) and protein extracts (Taylor et al., 2004) corresponding to PA1b have been isolated underlying the multigenic character of this new family of plant entomotoxin. Two isoforms of *pa1* gene (AJ574794 and AJ574795), placed under the control of the maize ubiquitin promoter, were introduced in rice (cv. Zhong Zuo 321) by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (Sallaud et al., 2003) and studied separately. 24 T0 events of each isoform were regenerated and characterized by RT-PCR and Southern blot. T1 and T2 seeds were analyzed by Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) and by in situ western hybridization (Qu et al., 2003). The latter technique allowed to localize PA1b accumulation in embryo and aleurone layer. Resistance of T2 elite lines was tested in bioassay by feeding 20 rice weevil adults with 5 transgenic seeds. Maximum of mortality was raised by line 30.16 after 5 days (AJ574795) and by line 55.19 after 4 days (AJ574794) of bioassay. Resistance of T3 seeds will be examined in selected homozygous T2 lines.



Expression of *mrjp2* gene from Thai honeybee in rice seeds for enhanced essential amino acid content

Chotipa Sakulsingharoj^a, Buranasak Cheuthong^a, Nitchamon Thamaragsa^a, Saengtong Pongjaroenkit^a, Siriporn Sittipraneed^b and Thomas W. Okita^c

^a Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sunai, Chiang Mai, 50290, Thailand.

^b Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

^c Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA, 99164-66340 USA.

Abstract

The nutritional content of rice is deficient in several amino acids essential for human growth and development. To increase the protein quality of this cereal, a gene encoding a 'major royal jelly protein' (MRJP) isolated from Thai honeybee *Apis cerana* was transformed into rice. The MRJP was selected as it is of high protein value as its composition consists of an exceptional content (45 - 49 %) of essential amino acids. Both *japonica* and *indica* rice varieties were transformed with the *mrjp2* cDNA under the control of the endosperm - specific glutelin *Gt1* promoter and 3' *nos* terminator. Hygromycin - resistant calli were obtained for both *japonica* and *indica* rice lines and showed GUS expression. PCR analysis of leaf genomic DNA from regenerated plants using *mrjp2* gene specific primers showed the expected amplified product of about 500 bp in many transgenic plants. Developing seeds of PCR - positive lines showed the expression of *mrjp2* transcripts by RT - PCR. Studies to determine the intracellular location of MRJP mRNA and protein in the cell and the amino acid composition of seeds from selected homozygous lines are currently underway.

Objective

To transform rice with *mrjp2* cDNA from Thai honeybee (*Apis cerana*) for increased essential amino acid content in rice seeds.

Methods

Plasmid construction

mrjp2 cDNA isolated from Thai *Apis cerana* (Imjongirak *et al.*, 2005) was cloned into pYW502 to construct the T - DNA vector, pBU2, for rice transformation. The plasmid pBU2 contains the *mrjp2* cDNA under the control of *Gt1* promoter, endosperm - specific promoter and *nos* terminator.

Rice transformation

Mature seeds of *japonica* rice cv. Kitaake and *indica* rice cv. Niaw Sunpahtawng were dehulled, surface sterilized and then cultured on N6D medium for 4 weeks. The calli were subcultured onto fresh medium for 3 - 4 days. The calli were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 harboring the T - DNA based vector, pBU2 using the protocol modified from Toki (1997).

Molecular analysis

Leaf DNA from primary transgenic plants was extracted and subjected to PCR analysis using primers specific to *mrjp2* cDNA. Total RNA from transgenic developing seeds was extracted and subjected to one - step RT - PCR analysis using primers specific to *mrjp2* cDNA.

Results and Discussion

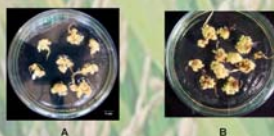


Figure 1. Calli were induced from mature seeds of *japonica* rice, Kitaake (A) and *indica* rice, Niaw Sunpahtawng (B) after culture on N6D medium for 4 weeks.



Figure 2. Hygromycin resistant calli of Kitaake and Niaw Sunpahtawng showed GUS positive, indicating that the calli were transformed.



Figure 3. Leaf segments of some regenerated transformed plants was analyzed by GUS assay, showing GUS expression.

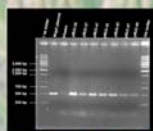


Figure 4. PCR analysis of genomic DNA from primary transgenic plants for *mrjp2* gene. Genomic DNA from control Kitaake and several independent transgenic lines was analyzed using PCR to determine the presence of the *mrjp2* gene. The positive control was plasmid DNA containing *mrjp2* cDNA. All transgenic plants tested showed the expected 500 bp PCR products, indicating the presence of *mrjp2* gene in their genome.

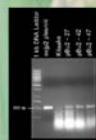


Figure 5. RT - PCR analysis of T_1 developing seeds for *mrjp2* transcripts. Total RNA from control Kitaake and transgenic rice seeds was analyzed using RT - PCR for expression of *mrjp2* transcripts. The result showed that the transgenic rice seeds contained *mrjp2* transcripts.

Table 1. Segregation of *mrjp2* gene in T_1 progeny. Leaf genomic DNA of T_1 progeny was analyzed by PCR using specific primers for *mrjp2* gene. The selected lines (27 and 42) analyzed showed a ratio of 3 positive : 1 negative, suggesting the *mrjp2* gene was inserted at a single locus in the rice genome.

Lines#	<i>mrjp2</i> positive	<i>mrjp2</i> negative	Chi square
27	17	3	1.070
42	14	6	0.267

Conclusions

1. Transformation of rice with *mrjp2* cDNA was successful.
2. Transgenic rice plants expressed *mrjp2* transcripts in developing seeds.
3. T_1 progeny of transgenic lines were segregated as Mendelian pattern of 3: 1 ratio.

References

- Imjongirak, C., Klinbunga, S. and Sittipraneed, S. 2005. Cloning expression and genomic organization of genes encoding major royal jelly protein 1 and 2 of the honey bee (*Apis cerana*). *J. Biochem. Mol. Biol.*, 38 (1), 49-57.
- Rashid H., Yokoi S., Toriyama K. and Hinata K. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. *Plant Cell Report.* 15:727-730.
- Toki S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Molecular Biology Reporter.* 15(1):16-21.

Acknowledgements

This study was supported by the grant from the Thailand Research Fund and the National Research Council of Thailand.

ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง

Transformation Efficiency of Glutinous Rice cv. Niaw Sanpahtawng

บุรณศักดิ์ เชื้อทอง¹ ณิชมน ธรรมรักษ์¹ ช่อทิพา สกกุลสิงหาโรจน์² แสงทอง พงษ์เจริญกิต²

วราภรณ์ แสงทอง² และนลินี รุ่งเรืองศรี²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์เหนียวสันป่าตองในรายงานวิจัยที่ผ่านมามีประสิทธิภาพต่ำ และยังไม่สามารถได้ต้นข้าวเหนียวดัดแปลงพันธุกรรม ในงานวิจัยนี้ จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีน โดยศึกษาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัส พบว่า ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้ ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวเหนียวโดยเชื้ออโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ AGL1 ที่มี binary vector pCAMBIA1303 โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากการถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 พบว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มแคลลัสในสารละลายอโกรแบคทีเรีย คือ 15 นาที โดยให้แคลลัสที่ด้านยาไฮโกรมัยซินสูงถึง 54.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าในรายงานที่ผ่านมาประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ด้านยาไฮโกรมัยซิน มีการแสดงออกของยีน *gusA* และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ จากการวิเคราะห์ต้นข้าวในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้โพรบมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าว และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA* และ *hptII* พบว่า มีการแทรกของยีนในจีโนมของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถสร้างต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม และสามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตองด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมในอนาคตได้

Abstract

Transformation efficiency of glutinous rice cv. Niaw Sanpahtawng has remained low and transgenic plants have not yet been obtained. The objective of this research was to study the effects of certain factors on rice transformation to improve transformation efficiency. It was found that the antibiotic hygromycin concentration for selection of transformed Niaw Sanpahtawng calli was 50 mg/l which inhibited growth of untransformed calli about 92%. *Agrobacterium*-mediated transformation was performed using *A. tumefaciens* AGL1 harboring binary vector pCAMBIA1303 according to the modified method of transformation of RD 6. The infection time of 15 min produced the highest percentage (54.37%) of hygromycin-resistant calli that was about 35% higher than previously reported. PCR analysis of leaf genomic DNA from transformed plants was conducted using primers specific to *gusA* and *hptII* genes. The result indicated that the *hptII* and *gusA* genes were integrated into the rice genome. The first transgenic Niaw Sanpahtawng was grown in the greenhouse. Overall, this research provided the promising result for future improvement of Niaw Sanpahtawng rice variety by genetic engineering.

Key words: transformation, binary vector, PCR, transgenic plant

คำนำ

ข้าวเหนียวที่นิยมบริโภคเป็นอาหารหลักในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ โดยข้าวเหนียวพันธุ์เหนียวสันป่าตองเป็นข้าวเหนียวที่ปลูกมากเป็นอันดับสามของภาคเหนือ และเป็นข้าวที่มีลักษณะที่ดี คุณภาพการขัดสีดี ที่หุงต้มอ่อนนุ่ม น้ำหนักเมล็ดดี โดยให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่สูง จำหน่ายได้ราคา เกษตรกรจึงนิยมปลูกกันมาก แต่ข้าวเหนียวสันป่าตองเป็นข้าวไวต่อช่วงแสง ปลูกได้เฉพาะในฤดูนาปีเท่านั้น (สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง, 2547)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการคัดเลือกหลังการผสมข้ามพันธุ์แบบดั้งเดิม ใช้เวลานานหลายปี กว่า จะคัดเลือกได้พันธุ์ใหม่ที่ดีได้ การนำเอาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเป็นอีกวิธีหนึ่งเพื่อที่จะลดระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง และได้ลักษณะตามที่ต้องการโดยไม่เกิดการสูญเสียลักษณะที่ดีของแต่ละพันธุ์ไป ซึ่งเทคนิคพันธุวิศวกรรมที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ ได้แก่ การใช้เครื่องยิงอนุภาค และการถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอโกรแบคทีเรีย

การถ่ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรีย เป็นวิธีการถ่ายยีนโดยใช้พาหะเป็นตัวกลางในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช ภายในแบคทีเรียมีดีเอ็นเอที่เป็นวงหรือพลาสมิด Ti (tumor inducing plasmid) เป็นตัวชักนำให้เกิดการส่งถ่ายยีน บน Ti plasmid ซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่เรียกว่า T-DNA จะถูกส่งจากแบคทีเรียเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์พืช แล้วรวมตัวเข้ากับโครโมโซมพืช (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2546)

การใช้อโกรแบคทีเรียมีข้อดี คือ ประหยัด เนื่องจากไม่ใช้เครื่องมือและวัสดุที่มีราคาแพง ทำให้สะดวกในการถ่ายยีน อีกทั้ง ดีเอ็นเอที่ถ่ายทอดเข้าไปมีการจัดเรียงตัวใหม่บ่อย และยีนที่ถ่ายเข้าไปนั้นสามารถถ่ายทอดส่งต่อไปได้อย่างเสถียร (Hiei *et al.*, 1997)

ความสำเร็จในการถ่ายยีนขึ้นกับปัจจัยสำคัญหลายประการ ได้แก่ การชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดี ประสิทธิภาพในการชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้น รวมถึงสภาวะในการถ่ายยีน (Hiei *et al.*, 1997) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัส และระยะเวลาของการบ่มแคลลัสกับเชื้ออโกรแบคทีเรีย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนของข้าวเหนียวสันป่าตอง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงแคลลัส

นำเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวสันป่าตองมาลอกเปลือกออก แล้วทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10% วางเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร N6D ที่มีปริมาณโพสลิ้น 2.88 ก./ล. และ 2,4-D 2 มก./ล. เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส หลังจากนั้น ทำการย้ายแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ ลงอาหารใหม่สูตร N6D เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเตรียมสำหรับทำการถ่ายยีน

การศึกษาปริมาณยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน

ย้ายแคลลัสที่เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ ลงบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ที่มียาปฏิชีวนะความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน คือ 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย

ทำการถ่ายยีนโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Pipatpanukul *et al.* (2004) โดยละลายเชื้ออโกรแบคทีเรียลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มก./ล. ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 - 0.5 แล้วเติม acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง นำแคลลัสที่เตรียมไว้แล้วบ่มร่วมกับสารละลายอโกรแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที แล้วย้ายแคลลัสวางบนอาหารแข็งสูตร 2N6 - AS เพื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเชื้ออโกรแบคทีเรียและแคลลัสนาน 3 วัน ในที่มีด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ล้างแคลลัส แล้วย้ายลงบนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสม แล้วย้ายแคลลัสที่ต้านทานยาไฮโกรมัยซินลงอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดต้น

การทดสอบการแสดงออกของยีน *gusA*

นำแคลลัสบางส่วนที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มียาไฮโกรมัยซิน และชิ้นส่วนใบของต้นข้าว มาทดสอบการถ่ายยีน โดยบ่มร่วมกับสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-24 ชั่วโมง แคลลัสที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* จะสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase แล้วเปลี่ยน X-gluc ให้ได้สารสีฟ้า

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำใบข้าวประมาณ 100 มิลลิกรัม มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Hwang and Kim (2000) โดยบดใบข้าวในไนโตรเจนเหลว จากนั้น เติมสารละลาย mCTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4 โมลาร์, Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA 50 มิลลิโมลาร์, PVP 1%, sodium metabisulfite 0.5%, β -mercaptoethanol 1%) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสไว้ แล้วเติมคลอโรฟอร์มเพื่อกำจัดโปรตีน จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นน้ำ แล้วเติม absolute ethanol เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในต้นข้าวโดยเทคนิคพีซีอาร์

ตรวจสอบข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเทคนิคพีซีอาร์ในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพริเมอร์ 25 พิโคโมล และ Taq DNA polymerase (Fermentas) 1.25 หน่วย โดยใช้ไพริเมอร์ 2 คู่ ดังนี้ คู่ที่ 1 คือ FgusA-1 (Biobasic) 5'-TGA AGA TGC GGA CTT ACG TG-3' และ RgusA-1 (Biobasic) 5'-GGC ACA GCA CAT CAA AGA GA-3' คู่ที่ 2 คือ FhptII (BSU) 5'-CTT GAC ATT GGG GAG TTT AGC GAG A-3' และ RhptII (BSU) 5'-ATC GGC GAG TAC TTC TAC ACA GCC A-3'

ไพริเมอร์คู่ที่ 1 จำเพาะต่อ ยีน *gusA* ไพริเมอร์คู่ที่ 2 จำเพาะต่อยีน *hptII* ซึ่งจะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ สภาวะของพีซีอาร์ เครื่อง PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) ที่ใช้ คือ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นเข้าสู่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Denaturation) 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Annealing) และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Extension) โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลของพีซีอาร์ โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัส

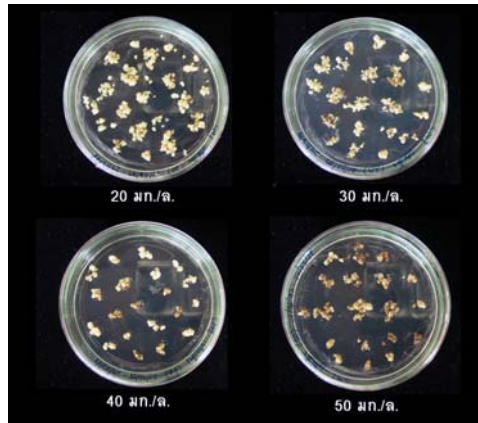
ในขั้นตอนการถ่ายยีน จะต้องทำการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีนออกจากแคลลัสที่ไม่ได้รับยีน โดยอาศัยคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะของแคลลัสที่ได้รับยีน ดังนั้น จึงได้ทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน

เมื่อย้ายแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาทดสอบหาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน โดยนำมาวางบนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. ทำให้แคลลัสที่ไม่ได้รับยีนไม่เจริญเติบโตถึง 92 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้คัดเลือกแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองที่ได้รับยีนและต้านทานต่อยาไฮโกรมัยซิน (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) แคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้ในระดับที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ซึ่งยาไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน คือ 15 มก./ล. (ช่อทิพา และคณะ, 2548ก) และ 30 มก./ล. (Sakulsingharoj *et al.*, 2004) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าข้าวแต่ละพันธุ์ทนต่อระดับยาต่าง ๆ กัน ในการศึกษาการถ่ายยีน ควรศึกษาความเหมาะสมของระดับยาปฏิชีวนะ ก่อนที่จะทำการถ่ายยีน

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของยาไฮโกรมัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง

ความเข้มข้นของยาไฮโกรมัยซิน (มก./ล.)	จำนวนแคลลัส เริ่มต้น	จำนวนแคลลัส ที่เจริญได้	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เจริญ ได้บนอาหารคัดเลือก ^{1/}
20	61	54	88.61 ^a
30	61	47	77.05 ^{ab}
40	59	41	69.49 ^b
50	48	4	8.33 ^c
F-test			**
CV(%)			10.30

^{1/}ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี DMRT)



ภาพที่ 1 ลักษณะแคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโครมัยซินต่างๆ กัน

ระยะเวลาสำหรับการบ่มแคลลัสในสารละลายไฮโครมัยซิน

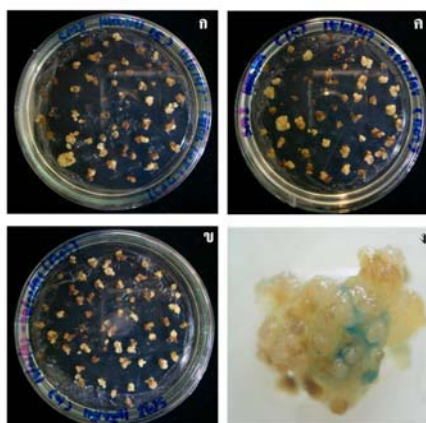
การถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยวิธีที่ดัดแปลงจากการถ่ายยีนในข้าวญี่ปุ่น (Toki, 1997) ซึ่งรายงานโดยช่อทิพา และคณะ (2548ข) มีประสิทธิภาพต่ำ และเมื่อตรวจต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน ไม่พบยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลในจีโนม จึงได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีน โดยวิธีที่ดัดแปลงจากการถ่ายยีนในข้าวเหนียว กข 6 (Pipatpanukul *et al.*, 2004; ช่อทิพา และคณะ, 2548ก) ซึ่งต่างจากเดิมที่สูตรอาหารและการเตรียมเชื้อไฮโครมัยซิน พบว่า ระยะเวลาที่ใช้บ่มแคลลัสร่วมกับเชื้อไฮโครมัยซินที่เหมาะสมที่สุด คือ 15 นาที เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านยาไฮโครมัยซินสูงถึง 54.37 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) ซึ่งสูงกว่าวิธีของช่อทิพา และคณะ (2548ข) ซึ่งให้แคลลัสที่ต้านยาไฮโครมัยซิน 40.38 เปอร์เซ็นต์

หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ได้สุ่มแคลลัสมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gusA* พบว่า แคลลัสสามารถเกิดสีฟ้า แสดงว่า แคลลัสได้รับยีนที่ถ่ายเข้าไป

ตารางที่ 2 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มแคลลัสร่วมกับสารละลายไฮโครมัยซิน (infection time) ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน

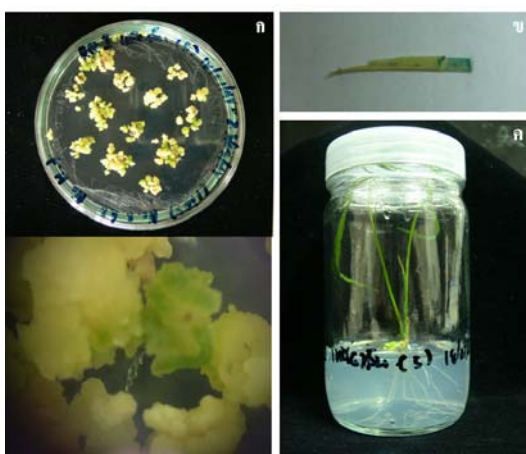
ระยะเวลาบ่ม (นาที)	จำนวนแคลลัส เริ่มต้น	จำนวนแคลลัสที่ ต้านยาไฮโครมัยซิน	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เจริญได้ บนอาหารคัดเลือก ^{1/}
5.00	47	12	25.53 ^b
10.00	52	26	50.00 ^a
15.00	46	25	54.37 ^a
F-test			**
CV(%)			4.78

^{1/}ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (เปรียบเทียบทางสถิติ ด้วยวิธี DMRT)



ภาพที่ 2 ลักษณะของแคลลัสบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากผ่านการถ่ายยีนที่ใช้ช่วงเวลา 5, 10 และ 15 นาที (ก, ข และ ค ตามลำดับ) แคลลัสที่ต้านทานยาไฮโกรมัยซินมีการแสดงออกของยีน *gusA* (ง)

เมื่อนำแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินมาชักนำให้เกิดต้น หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แคลลัสเกิดจุดเขียว และพัฒนาเป็นต้นข้าวได้ 3 ต้น (ภาพที่ 3 ก และ ค) เมื่อนำใบของต้นข้าวเหนียวสันป่าตองมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* พบว่า มีเพียง 1 ต้น ที่ใบข้าวเกิดสีฟ้า (ภาพที่ 3 ข) แสดงว่า มีการแสดงออกของยีน *gusA*

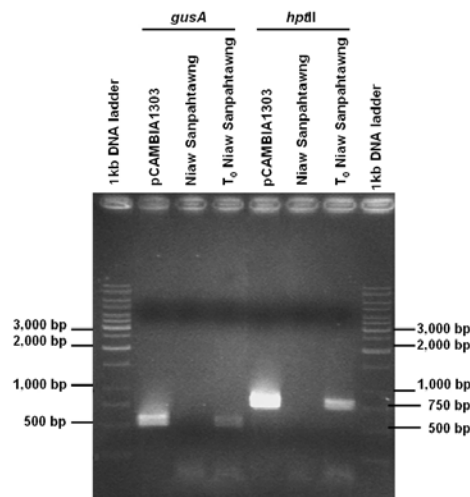


ภาพที่ 3 การพัฒนาเป็นต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม
 ก. ลักษณะแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินเจริญบนอาหารชักนำให้เกิดต้น
 ข. ใบข้าวเหนียวสันป่าตองที่มีการแสดงออกของยีน *gusA*
 ค. ต้นอ่อนที่เจริญบนอาหารมีการพัฒนารากและยอดที่สมบูรณ์

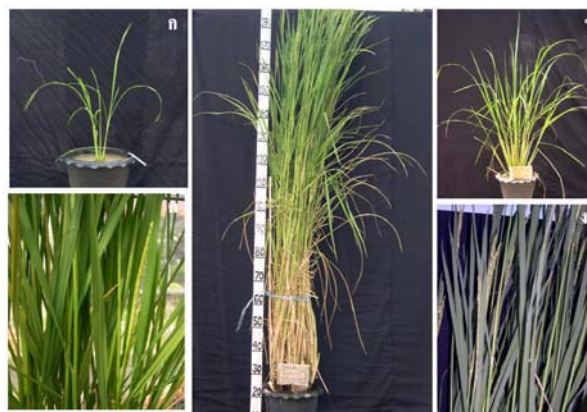
การแทรกของยีน *gusA* และ *hptII* ในจีโนมข้าว

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของข้าวเหนียวสันป่าตองมาตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA* และ *hptII* พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 500 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลผลิตพีซีอาร์ตามที่คาดหมายไว้ แสดงว่า มีการแทรกของยีน *gusA* และ *hptII* ในจีโนมของข้าวเหนียวสันป่าตอง (ภาพที่ 4)

ต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรมที่เจริญในโรงเรือน มีความสูงประมาณ 2 เมตร แต่เมล็ดที่เกิดขึ้นมีลักษณะลีบ ฝ่อ (ภาพที่ 5) ไม่สามารถนำไปทดสอบขั้นต่อไปได้ ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการส่งถ่ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียทำให้เกิดการแทรกของยีนในจีโนมพืชแบบสุ่ม ซึ่งอาจไปมีผลต่อการสร้างเมล็ดของข้าวเหนียว



ภาพที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบยีน *gusA* และ *hptII* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งคาดหวังแถบดีเอ็นเอที่ 500 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ โดย pCambia1303 ใช้เป็น positive control, Niaw Sanpahtawng เป็น negative control, T₀ Niaw Sanpahtawng เป็นตัวอย่างจากต้นข้าวเหนียวสันป่าตองที่มีการแสดงออกของยีน *gusA*



ภาพที่ 5 ลักษณะของต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม อายุ 1 เดือน (ก), 2 เดือน (ข), ตั้งท้อง (ค) และออกรวง (ง) ที่เจริญในโรงเรือน

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง พบว่า ยาปฏิชีวนะไฮโครมัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน คือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มแคลลัสในสารละลายอโกรแบคทีเรียคือ 15 นาที โดยหลังการถ่ายยีน แคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกมีการพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ จากผลการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า มีการแทรกของยีนเครื่องหมาย และยีนรายงานผลในจีโนมข้าว แสดงให้เห็นว่า สามารถถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสและพัฒนาให้

เกิดต้นข้าวเหนียวดัดแปลงพันธุกรรมได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตองด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับความอนุเคราะห์เชื้ออโกรแบคทีเรียและ binary vector และ รศ.ประวีตร พุทธานนท์ ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ ณิชมน ธรรมรักษ์ พิชญภา มหาสุข แสงทอง พงษ์เจริญกิต และณลินี รุ่งเรืองศรี. 2548ก. การถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6 19-20 พฤษภาคม 2548 มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.
- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ บุณศศักดิ์ เชื้อทอง พรพนัช มีกุล วราภรณ์ แสงทอง และณลินี รุ่งเรืองศรี. 2548ข. การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6 19-20 พฤษภาคม 2548 มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.
- สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง. 2547. เอกสารแนะนำพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตอง. สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง, เชียงใหม่.
- มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2546. “การสร้างพืชพันธุวิศวกรรม (Genetically Engineered Crops)”. Hiei Y., T.Komari and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Bio. 35: 205-218.
- Hwang S.K. and Y.M. Kim. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. J. Biochem. Mo. Biol. 33(6): 537-546.
- Pipatpanukul T., S. Bunnag, P. Theerakulpisut and M. Kosittittrakul. 2004. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD 6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Songkhlanakarin J. Sci. Technol. 26(1): 1-13.
- Sakulsingharoj C., S.B. Choi, G.E. Edwards, J. Preiss and T.W. Okita. 2004. Engineering starch biosynthesis for increasing rice seed weight: The role of the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase. Plant Sci. 167: 1323-1333.
- Toki S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. Plant Mol. Bio. Reporter. 15(1): 16-21.
- <http://rice.kps.ku.ac.th/lesson/molecular/chapter8>

Life's Innovations
at their Best

bio
asia 2007

The 1st International Trade Exhibition
and Conference for Biotechnology

www.bioasia-2007.com

Proceedings Proceedings

**The 2nd International Conference
on Rice for the Future**

5-9 November 2007
Queen Sirikit National Convention Center
Bangkok, Thailand



Rice Transformation of Major Royal Jelly Protein Gene Using *Agrobacterium tumefaciens*

Buranasak Chuethong^a, Nitchamon Thamaragsa^a, Chotipa Sakulsingharoj^a, Saengtong Pongjaroenkit^a,
Varaporn Sangtong^a, Siriporn Sittipraneed^b and Thomas W. Okita^c

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sunsai, Chiang Mai, 50290, Thailand

^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

^cInstitute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA, 99164-66340 USA

Abstract

Transformation and expression of major royal jelly protein (*mrjp2*) gene in rice were studied. The *mrjp2* gene isolated from Thai honeybee (*Apis cerana*) encodes a protein with high essential amino acids required for human growth and development. Scutella-derived calli established from mature rice seeds were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 harboring pBU3 and pNT5 plasmids containing *mrjp2* gene driven by endosperm-specific *Gtl* promoter and 35S CaMV dual enhancer promoter, respectively. Hygromycin-resistant calli were obtained after secondary cycle of selection on selective medium and regenerated to plantlets. GUS activity was detected on leaf segments of T₀ transgenic plants. PCR analysis of leaf genomic DNA using *mrjp2* specific primers showed the expected products, indicating the integration of *mrjp2* gene in transgenic plant genomes. Then, total RNA from seeds and leaves of transgenic plants transformed with pBU3 and pNT5, respectively, were extracted for RT-PCR analysis. The results showed that the *mrjp2* gene was expressed at mRNA level. Expression of MRJP2 protein in selected transgenic lines has been being investigated.

Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is daily consumed by more than half of the world's population. Rice seeds are rich in carbohydrates but low in proteins (limiting in some essential amino acids), vitamins and minerals. Genetic engineering may be an alternative way to increase protein quality in rice seeds.

Major Royal Jelly Proteins (MRJPs) are abundant proteins in royal jelly (RJ) which plays a nutritional role in larval development of honey bee queen. Royal jelly is isolated from hypopharyngeal glands of nurse bees. MRJPs in royal jelly are divided into 5 families (MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 and MRJP5). The *mrjp1* and *mrjp2* cDNAs isolated from Thai honey bee (*Apis cerana*) were reported (Imjongjirak *et al.*, 2005). The MRJP1 and MRJP2 contain 45-49% essential amino acids. Judova *et al.* (2004) transformed *mrjp1* gene into tobacco and protein analysis of transgenic tobacco leaves showed expression of MRJP1.

The aim of this work was to transform the *mrjp2* gene into rice using endosperm specific *Gtl* promoter and 35S CaMV dual promoter. Furthermore, the expression of this gene in transgenic rice plants containing different promoters would be studied.

Materials and Methods

Mature seeds of *japonica* rice cultivar Kitaake were surface sterilized with 10 % sodium hypochlorite for 15 min, twice and then washed four times with sterile distilled water. The sterile seeds were then cultured on N6D medium (Toki, 1997) under dark conditions at 28 ± 2 °C for 4 weeks. The compact calli derived from scutellum tissues were used for *Agrobacterium*-mediated transformation following a modified protocol of Toki (1997). *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 harboring binary vectors, pBU3 (*Gtl::mrjp2::Tnos*) or pNT5 (35S CaMV dual::*mrjp2::Tnos*), was used for transformation. Both vectors contained the *hptII* gene

conferring hygromycin resistance, as a selectable marker gene and *gusA* gene coding for β -glucuronidase, as a reporter gene. The transformed calli were selected on N6D medium supplemented with hygromycin. Then, hygromycin – resistant calli were transferred to regeneration medium (modified MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 2.5 mg/L kinetin) and cultured under 16 h/day light conditions.

For *Gus* activity, leaf tissues collected from transformed rice plants were incubated with *GUS* solution containing X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronidase) at 37°C, as described by Jefferson *et al.* (1987). Leaf genomic DNA isolated from *Gus*-positive T_0 plants were subjected to PCR analysis. For RT-PCR, total RNA were isolated from seeds at milky stage and from leaves of transgenic rice plants transformed with pBU3 and pNT5 plasmids, respectively. Primer pairs specific for the *myd2* gene were used for both analyses.

Results and Discussion

In this study, Kitaake embryogenic calli (globular, yellow, and compact) were developed from scutellum region of seeds and used for transformation (Fig 1). The transformed calli with pBU3 and pNT5 plasmids that contain *hptII* and *gusA* genes were grown on selective medium supplemented with hygromycin and regenerated to plantlets. Then, the regenerated plants were transferred to soil and grown in the greenhouse. Hygromycin – resistant calli and transformed rice plants showed *GUS* expression when incubated with X-Gluc (Fig 2).

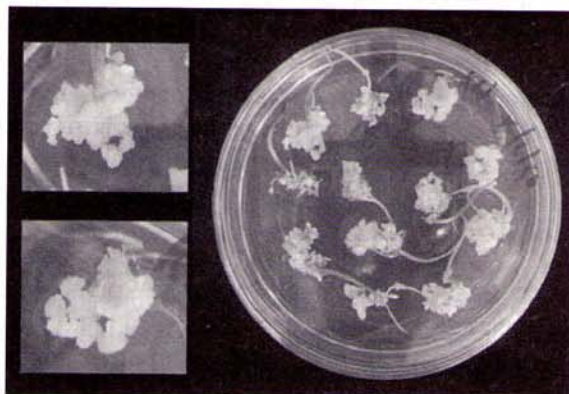


Figure 1 Kitaake calli that were used for *Agrobacterium* – mediated transformation.

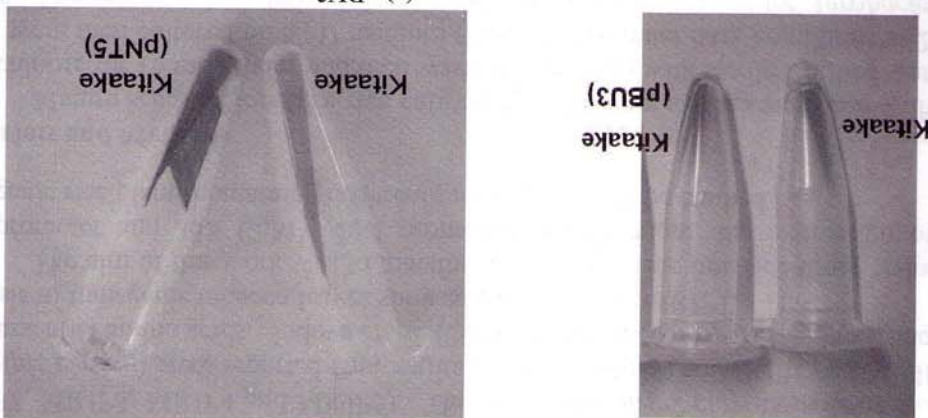


Figure 2 *GUS* expression of transgenic rice plants that were transformed with pBU3 (a) and pNT5 (b) plasmids.

Genomic DNA were extracted from leaves of transformed plants for PCR analysis. The PCR results showed the expected bands of *mrjp2* gene fragments (500 bp) (Fig 3). It indicated that we successfully transformed *mrjp2* gene into rice. The *mrjp2* gene was stably integrated into rice genome of pBU3 and pNT5 plants.

For RT-PCR analysis, the total RNA were extracted from developing seeds and leaves of pBU3 and pNT5 transformed plants, respectively. We found the 500 bp fragments amplified from the RT-PCR reactions. The controls were also performed using the total RNA for the PCR reactions which resulted in no amplified products (data not shown). These results indicated that the *mrjp2* gene was expressed at mRNA levels in transgenic rice plants (Fig 4).

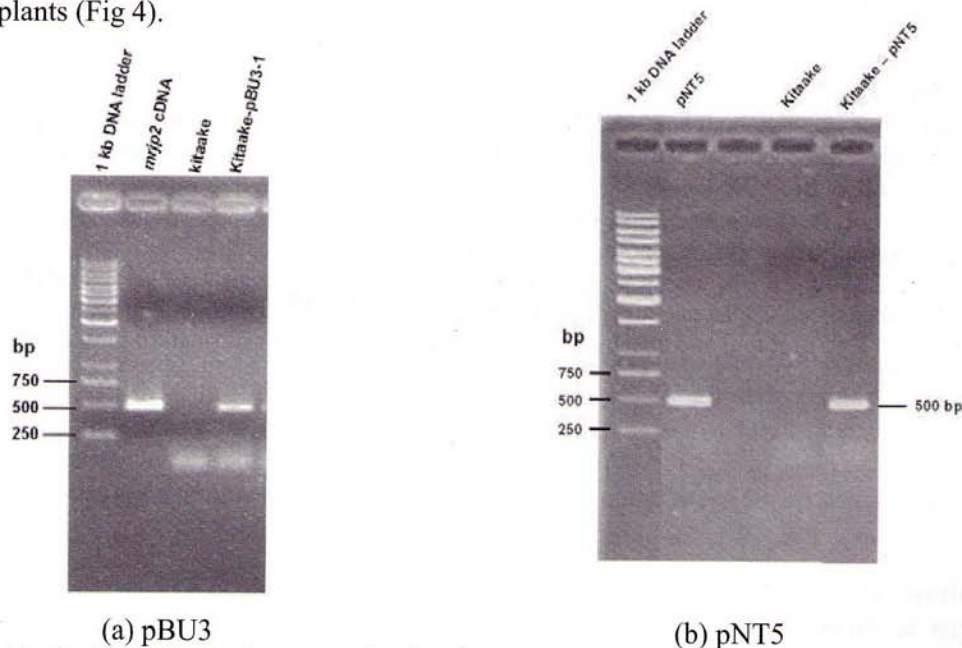


Figure 3. PCR analysis of *mrjp2* gene in transgenic rice plants that were transformed with pBU3 (a) and pNT5 (b).

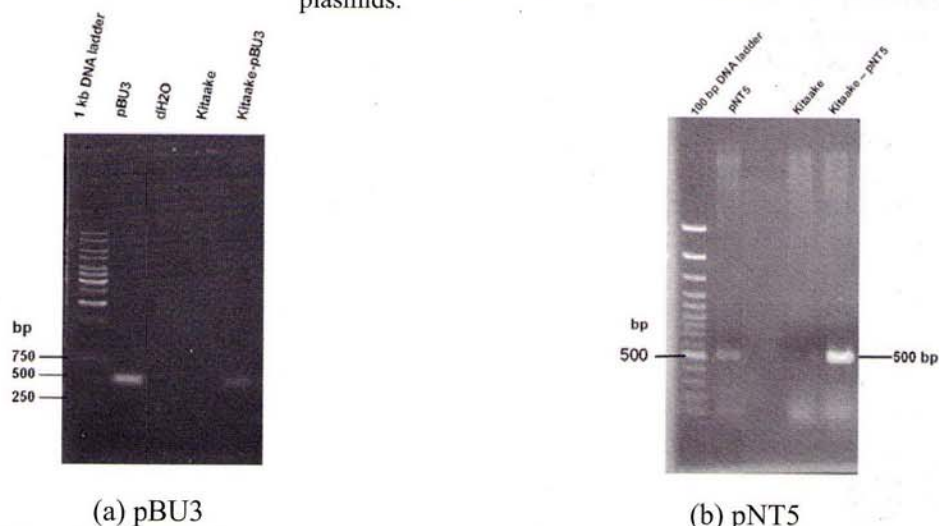
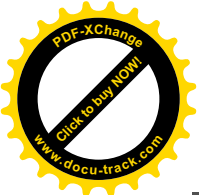


Figure 4. RT-PCR analysis of *mrjp2* gene expression in transgenic rice plants that were transformed with pBU3 (a) and pNT5 (b).



BioAsia2007

Conclusions

Transformed calli with pBU3 and pNT5 could be regenerated to transgenic rice plants. The *mrjp2* gene was inserted in the genome of transgenic rice. The *mrjp2* gene was expressed at mRNA levels under the control of endosperm specific *Gt1* promoter and 35S CaMV dual promoter in seeds and leaves of transgenic rice plants, respectively. A comparison of expression levels of MRJP2 proteins in transgenic plants containing these two different promoters has been being studied.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the National Research Council of Thailand, The Thailand Research Fund and Commission on Higher Education.

References

- Imjongjirak, C., Klinbunga, S. and Sittipraneed, S. (2005). Cloning, expression and genomic organization of genes encoding major royal jelly protein 1 and 2 of the honey bee (*Apis cerana*). J. Biochem. Molec. Biol. 38 (1): 49-57.
- 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.
- Júdova, J., Šutka, R., Klaudiny, J., Lišková D., Ow, D.W. and Šimúth J. (2004). Transformation of tobacco plants with cDNA encoding honeybee royal jelly MRJP1. *Biologia Plantarum*. 48 (2): 85-191.
- Toki, S. (1997). Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. Plant Mol. Biol. Rep. 15: 16-21.