مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۳، ۱۳۸۹ (۵۸۲-۵۷۷)

ارزیابی ژن *cry1Ab* در نسل‌های مختلف در حال تفکیک برنج

غفار کیانی[1]*، قربانعلی نعمت زاده[2]، بهزاد قره یاضی[3] و مجید ستاری[4]
۱، ۲، استادیار و استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و محققین پژوهشکده برنج و مرکبات ساری، ۳، محقق پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج، ۴، محقق موسسه تحقیقات برنج کشور، آمل
(تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۲۵ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۲/۱۲)

چکیده

با استفاده از مهندسی ژنتیک، ژن‌هائی از نوعی باکتری خاکزی بنام *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) به برنج انتقال داده شده است که مقاومت به آفات را در پی دارد. موفقیت بکارگیری مهندسی ژنتیک در برنامه‌های اصلاحی کلاسیک به انتقال پایدار ژن انتقالی در ارقام تراریخت بستگی دارد. در این مطالعه سه جمعیت درحال تفکیک F_2 از تلاقی هر یک از لاین‌های تراریخت برنج به نام‌های طارم مولائی، ندا و نعمت با رقم سنگ طارم تولید و الگوی تفرق ژن *cry1Ab* در این جمعیت‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از ارزیابی‌های فنوتیپی در مزرعه و آنالیز ژنوتیپی با استفاده از PCR در آزمایشگاه در جمعیت‌های مختلف F_2، نسبت تفرق تک ژنی را برای *cry1Ab* نشان داد. این نتیجه نشان می‌دهد که یک نسخه از ژن *cry1Ab* در ژنوم لاین‌های تراریخت طارم مولائی، ندا و نعمت وارد شده است. این وضعیت، الگوی تفرق قابل پیش‌بینی ژن *cry1Ab* را در گیاهان تراریخت بازگو می‌کند. به علاوه، اطلاعات بدست آمده از این تحقیق مؤید این است که ادغام ژن *cry1Ab* در ژنوم لاین‌های تراریخت مورد مطالعه بصورت پایدار بوده است و بطور موفق به نسل‌های بعدی انتقال می‌یابد. بنابراین از این لاین‌های تراریخت، جهت اصلاح ارقام برای تحمل به کرم ساقه‌خوار در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات می‌توان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: برنج، *cry1Ab*، الگوی تفرق، مقاومت به آفات.

مقدمه

توارث‌پذیری پایدار ژن انتقالی در ارقام تراریخت نقش مهمی را در موفقیت بکارگیری مهندسی ژنتیک در برنامه‌های اصلاحی کلاسیک دارد (Wu et al., 2002). پیشرفت‌های اخیر در زمینه مهندسی ژنتیک، امکان انتقال ژن از گونه‌های غیرخویشاوند به گونه‌های زراعی گیاهان را میسر ساخته است. وقتی که ژنی از منابع مختلف به گیاهی وارد شود می‌توان از آن ژن، در برنامه‌های اصلاحی کلاسیک اصلاح نباتات بهره‌برداری نمود. این کار بخصوص در کشورهای درحال توسعه که ممکن است تکنولوژی‌های نوین همیشه در دسترس نباشد، بسیار مفید باشد. یکی از ژن‌های انتقالی به برنج ژن *cry* می‌باشد که خاستگاه باکتریائی (*Bacillus thuringiensis*) داشته و مقاومت بالائی را به آفات در پی دارد. پروتئین‌های کریستالی که بوسیله این ژن تولید می‌شود خاصیت حشره‌کشی داشته و برای حشرات خانواده بالپولکداران، دوبالان و سخت‌بالان بسیار سمی می‌باشد (Hofte & Whiteley, 1989).

* نویسنده مسئول: غفار کیانی تلفن: ۰۹۳۵-۱۸۱۸۴۶۲ E-mail: ghkiani@gmail.com

توارث‌پذیری ژن‌های انتقالی در گیاهان تراریخت برنج توسط تعدادی از محققین مورد مطالعه قرار گرفته است. برای مثال، Gahakwa et al. (2000) توارث‌پذیری ژن‌های با خاصیت حشره‌کشی و نشانگرهای آنها را در زمینه‌های مختلف ژنتیکی مورد مطالعه قرار دادند. آنها انتقال موفق تمامی ژن‌های انتقالی را در طی دو نسل به صورت مندلی گزارش نمودند. این موضوع نشان دهنده ادغام تک نسخه‌ای این ژن‌های انتقالی در ژنوم برنج می‌باشد. مطالعات Wang et al. (2002) و Wu et al. (2002) نشان داد که تفکیک ژن *cry1Ab*، در تلاقی‌های از نوع ژاپونیکا × ژاپونیکا به صورت نسبت مندلی ۳:۱ می‌باشد. اما آنها در تلاقی‌های ایندیکا × ژاپونیکا انحراف از نسبت مندلی ۳:۱ را گزارش نمودند.

به خاطر ماهیت پیچیده و تصادفی ادغام ژن‌های بیگانه در ژنوم میزبان، توارث‌پذیری ژن‌های بیگانه در گیاهان تراریخت ممکن است الگوهای پیچیده‌ای را به نمایش بگذارد. در اکثر موارد، ادغام یک نسخه از ژن بیگانه در ژنوم میزبان منجر به نسبت تفکیک ۳:۱ در جامعه خودگشنی شده (Datta et al., 1990; Peng et al., 1992) و نسبت ۱:۱ در جامعه تلاقی برگشتی می‌شود (Peng et al., 1992; Hiei et al., 1994).

وقتی که توارث‌پذیری ژن *cry1Ab* در نتاج در طول نسل‌های زایشی پایدار بماند و درجات بالائی از مقاومت به آفات برنج را نیز بدنبال داشته باشد، برنج تراریخت به عنوان ژرم پلاسم مقاومت به حشرات در برنامه‌های اصلاحی کلاسیک می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین، استفاده اصلاحی برنج تراریخت بوسیله انجام تلاقی و تلاقی برگشتی با لاین‌های ایندیکا و ژاپونیکا می‌تواند انجام و ارقام جدید مقاوم به حشرات با خصوصیات مفید زراعی تولید شوند.

مطالعات در زمینه توارث‌پذیری ژن *cry1Ab* در تلاقی بین ارقام تراریخت با ارقام غیرتراریخت از جنبه‌های مختلف نظیر مدیریت تلفیقی آفات و استفاده پایدار از ژن *cry1Ab* در برنج دارای اهمیت می‌باشد. بدین جهت مطالعه الگوی توارث‌پذیری ژن *cry1Ab* در سه لاین تراریخت در شرایط مزرعه و نیز در سطح مولکولی هدف این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل سه لاین تراریخت برنج به نام‌های طارم مولائی، ندا و نعمت و همچنین یک رقم محلی غیرتراریخت به نام سنگ طارم می‌باشد (جدول۱). طارم مولائی اولین رقم تراریخت واجد ژن *cry1Ab* می‌باشد که ۱۳ سال پیش توسط Ghareyazie et al. (1997) اصلاح گردیده است. لاین های تراریخت ندا و نعمت از طریق تلاقی برگشتی با همین رقم در مرکز تحقیقات بین المللی برنج (IRRI) در کشور فیلیپین تولید شده‌اند. سنگ طارم رقم محلی با کیفیت بالا بوده و در سطح وسیعی در مناطق برنجکاری ایران کشت می‌گردد.

در سال زراعی ۱۳۸۵، تلاقی‌ها بین لاین‌های تراریخت به عنوان والدین پدری با سنگ طارم به عنوان والد مادری انجام گرفت. بذور F_1 حاصل در سال بعد (۱۳۸۶) برای بدست آوردن بذور F_2 کشت شدند. در سال سوم (۱۳۸۷)، جوامع مختلف F_2 کشت و ارزیابی‌های مزرعه‌ای و مولکولی بر روی تک بوته‌های این جوامع صورت گرفت. عملیات زراعی متداول در قطعه زمین آزمایشی ایزوله شده در طول فصل رشد بعمل آمد با این تفاوت که از هیچ گونه سمی بر علیه آفات و بیماری‌ها استفاده نگردید.

ارزیابی مقاومت مزرعه‌ای تک بوته‌ها بر علیه کرم ساقه‌خوار در جمعیت‌های مختلف F_2 براساس شناسائی گیاهان با علائم قلب مردگی و خوشه سفیدی استوار بود که به ترتیب علائم خسارت آفت کرم ساقه‌خوار در مرحله رویشی و زایشی می‌باشد. بدین ترتیب که در جمعیت‌های مختلف تک بوته‌ها بر اساس وجود یا عدم وجود این علائم به صورت چشمی ارزیابی شدند. تک بوته‌های فاقد هیچ کدام از این علائم به عنوان بوته‌های مقاوم و تک بوته‌هائی که واجد این علائم بودند به عنوان بوته‌های حساس شمارش شدند. برای تائید اینکه قلب مردگی و یا خوشه سفیدی در بوته‌های حساس ناشی از کرم ساقه‌خوار بوده است، ساقه های اینگونه بوته‌ها، برش داده شدند و حضور لارو آفت و یا کانال‌های حفر شده توسط لارو در داخل ساقه‌ها ارزیابی شدند (Shu et al., 2002).

جدول ۱- مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعه

رقم	روش اصلاحی	نوع رقم	وضعیت کیفیت دانه
طارم مولائی Bt	انتقال ژن با تفنگ ژنی	محلی	معطر
ندا Bt	تلاقی برگشتی با طارم مولائی Bt	پر محصول	غیر معطر
نعمت Bt	تلاقی برگشتی با طارم مولائی Bt	پر محصول	غیر معطر
سنگ طارم	انتخاب	محلی	معطر

DNA نمونه‌های برگی به روش Dellaporta et al. (1983) استخراج گردید. آنالیز PCR با استفاده از نشانگرهای *cry1Ab* و RG100 انجام شد (Ghareyazie et al., 1997). مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰x)، ۰/۳ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر از هر نشانگر، یک واحد آنزیم *Taq* پلیمراز و ۳ میکرولیتر DNA نمونه (۵۰ نانوگرم) بود. واکنش PCR با پروفیل حرارتی ۵ دقیقه برای ۹۴°C، ۴۰ چرخه از ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ °C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه و نهایتاً ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. فراورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۱/۵٪) تجزیه و تحلیل شدند. در آنالیز PCR، گیاهان مقاوم دو باند با وزن‌های ۱۲۰۰ و ۹۰۰ جفت بازی را تولید می‌نمایند که به ترتیب حاصل از تکثیر ژن *cry1Ab* و لوکوس RG100 می‌باشد و گیاهان حساس فقط باند ۹۰۰ جفت بازی را تولید می‌نمایند. برای مقایسه نسبت تفرق بدست آمده با تفرق مورد انتظار از آزمون χ^2 استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج ارزیابی‌های فنوتیپی در جوامع مختلف درحال تفکیک برای ژن *cry1Ab* در جدول ۲ نشان داده شده است. تک بوته‌ها در تمامی جوامع مورد مطالعه، از نظر مقاومت یا حساسیت براساس ویژگی های قلب مردگی و خوشه سفیدی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این علائم نشانه خسارت آفت کرم ساقه‌خوار به ترتیب در مرحله رویشی و زایشی می‌باشد. در تمامی تلاقی‌ها، به جز تلاقی سنگ طارم/ طارم مولائی- Bt، الگوی تفرق گیاهان مقاوم به گیاهان حساس از نسبت مورد انتظار ۱: ۳ تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد. این امر نشان‌دهنده این است که مقاومت به کرم ساقه‌خوار در برنج تراریخت بصورت یک ژن غالب کنترل می‌شود. این نتایج با نتایج Wu et al. (2002) و Wang et al. (2002) مطابقت دارد.

برای مطالعه توارث‌پذیری ژن انتقالی به گیاهان تراریخت از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR نیز استفاده شد. بر این اساس توارث‌پذیری ژن *cry1Ab* در سطح مولکولی از طریق تجزیه PCR در تمامی جوامع در حال تفکیک F_2 مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمون از دو نشانگر یکی Bt و دیگری نشانگر RG100 استفاده گردید. نتایج آنالیز PCR با استفاده از دو نشانگر مورد استفاده به روشنی تائید کننده نتایج حاصل از ارزیابی های فنوتیپی بود و الگوی تفرق ۱: ۳ برای ژن *cry1Ab* در جوامع F_2 در سطح مولکولی نیز مشاهده گردید (جدول ۳). علاوه بر این، الگوی تفرق *cry1Ab* در جمعیت سنگ طارم × طارم مولائی تراریخت که در ارزیابی فنوتیپی از نسبت ۱: ۳ انحراف نشان داده بودند، در آنالیز PCR از همان نسبت ۱: ۳ پیروی نمود. علت اختلاف بین ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی در این نوع از تلاقی بخاطر برآورد بیش از حد واقع بوته‌های حساس در ارزیابی‌های مزرعه‌ای (یعنی حدود ۲ بوته مقاوم در مقابل ۱ بوته حساس) است که می‌تواند نتیجه کاهش تظاهر مقاومت در طارم مولائی تراریخت در مرحله زایشی باشد (Alinia et al., 2000). پیشبر مورد استفاده در رقم طارم مولائی تراریخت از نوع وابسته به بافت می‌باشد و تظاهر آن مربوط به بافت‌های سبز و رویشی است و در مرحله زایشی تظاهر این ژن رفته رفته کم می‌شود که البته این خود می‌تواند مزیت مهمی باشد زیرا مانع از تجمع فراورده این ژن در دانه می‌شود.

هنگامیکه یک ژن بیگانه وارد ژنوم گیاه میزبان شود، اغلب منجر به نسبت تفکیک ۱: ۳ در نتاج حاصل از خودگشنی (Nayak et al., 1997; Cheng et al., 1998; Datta et al., 1998; Chen et al., 2005; Ho et al.,

(2006) و یا در جمعیت F_2 (Wang et al., 2002) می‌شود. تحت شرایط خاصی، الگوی تفرق ژن انتقالی در گیاهان تراریخت می‌تواند از نسبت مورد انتظار مندلی انحراف پیدا کند (Datta et al., 1990; Goto et al., 1993; Peng et al., 1995; Husnain et al., 2002). مکانیسم‌های مختلفی توسط محققین برای علل این انحرافات پیشنهاد شده است که عبارتند از: زنده‌مانی کم دانه گرده دارای ژن انتقالی (Wu et al., 2002)، باروری کم تلاقی بین گونه‌ای (Wang et al., 2002)، خاموشی ژن انتقالی (Kohli et al., 1999) و انتخاب گامتی (Lyttle, 1991). در این آزمایش، انحراف از نسبت مورد انتظار ۱: ۳ در جوامع F_2 رخ نداد و نتایج PCR نیز بروشنی این نتیجه را تائید نمود. هرچند که، فقط در یک تلاقی انحراف از نسبت ۱: ۳ در ارزیابی فنوتیپی در مزرعه مشاهده گردید اما نتایج PCR در این نوع تلاقی نیز همان نسبت مورد انتظار ۱: ۳ را نشان داد.

با طور کلی نتایج حاصل از ارزیابی‌های فنوتیپی در مزرعه و آنالیز ژنوتیپی با استفاده از PCR در آزمایشگاه که به ترتیب از مطالعه ۶۰۱ و ۱۸۶ تک بوته در جمعیت‌های مختلف بدست آمده است، نسبت تفرق تک ژنی برای *cry1Ab* را نشان داد (جداول ۲ و ۳). این بدین معنی است که یک نسخه از ژن *cry1Ab* در ژنوم لاین‌های تراریخت طارم مولائی، ندا و نعمت وارد شده است. این وضعیت، الگوی تفرق قابل پیش‌بینی و عدم خاموشی ژن انتقالی را در گیاهان تراریخت بازگو می‌کند (Finnegan & McElroy, 1994).

به علاوه، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که زمینه‌های مختلف ژنتیکی، الگوی توارث‌پذیری ژن *cry1Ab* را در تلاقی‌های از نوع ایندیکا/ایندیکا تحت تاثیر قرار نمی‌دهد. همچنین، اطلاعات بدست آمده از این تحقیق مؤید این است که ادغام ژن *cry1Ab* در ژنوم لاین‌های تراریخت طارم مولائی، ندا و نعمت به صورت پایدار می‌باشد. از این لاین‌های تراریخت، جهت اصلاح ارقام برای تحمل به کرم ساقه‌خوار در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات می‌توان استفاده نمود.

جدول ۲- الگوی تفرق مقاومت به کرم ساقه‌خوار در جوامع مختلف در حال تفکیک F_2 بر اساس داده‌های حاصل از ارزیابی‌های مزرعه‌ای

تلاقی	تعداد گیاه مورد ارزیابی	تعداد گیاهان مقاوم	تعداد گیاهان حساس	گیاهان مقاوم: گیاهان حساس	$(\chi^2)^a$
سنگ طارم/ طارم مولائیBt	۲۰۰	۱۳۱	۶۹	۱: ۱/۹۰	۹/۶۲۷** (۱: ۳)
سنگ طارم/ نعمتBt	۲۰۹	۱۴۶	۶۳	۱: ۲/۳۲	۲/۹۴۹^{ns} (۱: ۳)
سنگ طارم/ نداBt	۱۹۲	۱۴۱	۵۱	۱: ۲/۷۶	۰/۲۵^{ns} (۱: ۳)

[a] مقادیر بحرانی χ^2 برای سطوح ۵ و ۱ درصد به ترتیب برابر ۳/۸۴ و ۶/۶۴ می‌باشد.

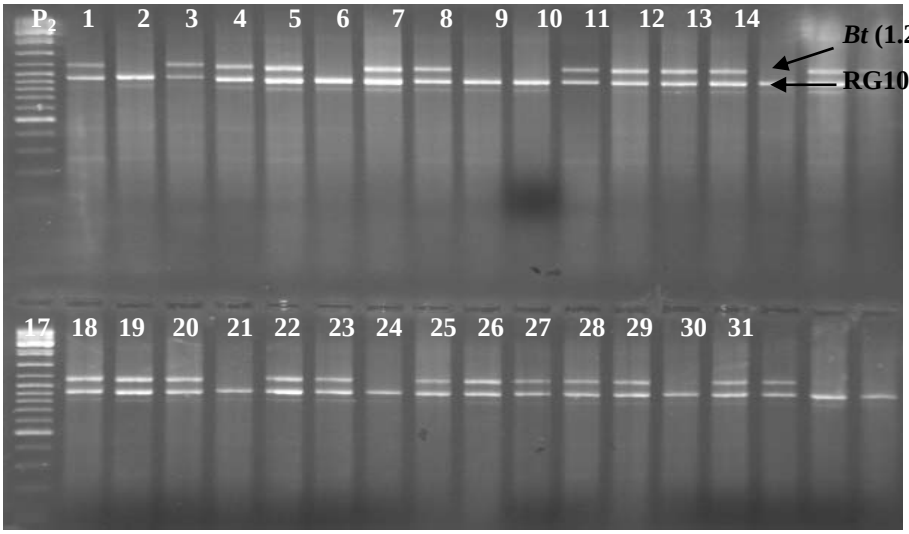
ns و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱ درصد برای انحراف از نسبت مورد انتظار ۱: ۳.

جدول ۳- الگوی تفرق مقاومت به کرم ساقه‌خوار در جوامع مختلف درحال تفکیک F_2 بر اساس داده‌های حاصل از تجزیه و تحلیل PCR

تلاقی	تعداد گیاه مورد ارزیابی	تعداد گیاه PCR^+	تعداد گیاه PCR^-	گیاهان PCR^+ : گیاهان PCR^-	$(\chi^2)^a$
سنگ طارم/ طارم مولائیBt	۶۴	۴۶	۱۸	۱: ۲/۵۶	۰/۱۶۷^{ns} (۱: ۳)
سنگ طارم/ نعمتBt	۵۸	۴۴	۱۴	۱: ۳/۱۴	۰/۰۱۱^{ns} (۱: ۳)
سنگ طارم/ نداBt	۶۴	۵۰	۱۴	۱: ۳/۵۷	۰/۱۶۷^{ns} (۱: ۳)

a مقادیر بحرانی $\chi 2$ برای سطوح ۵ و ۱ درصد به ترتیب برابر ۳/۸۴ و ۶/۶۴ می‌باشد.

ns: غیر معنی‌دار در سطح ۵ یا ۱ درصد برای انحراف از نسبت مورد انتظار ۱: ۳.



شکل ۱- آنالیز PCR با استفاده از نشانگرهای *cry1Ab* و RG100 در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی سنگ طارم × طارم مولائی تراریخت.
P_1: والد تراریخت، P_2: والد غیرتراریخت و شماره‌های ۱ تا ۳۲ تعدادی از تک بوته‌های جمعیت F_2 هستند.

REFERENCES

1. Alinia, F., Ghareyazie, B., Rubia, L., Bennett, J. & Cohen, M. B. (2000). Effect of plant age, larval age, and fertilizer treatment on resistance of *cry1Ab*-transformed aromatic rice to *lepidopterous* stem borers and foliage feeders. *Journal of Economic Entomology*, 93, 484–493.
2. Chen, H., Tang, W., Xu C.G., Li, X. H., Lin, Y. J. & Zhang, Q. F. (2005). Transgenic *indica* rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against *lepidopteran* rice pests. *Theoretical and Applied Genetics*, 111, 1330-1337.
3. Cheng, X., Sardana, R., Kaplan, H. & Altosaar, I. (1998). *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 95, 2767–2772.
4. Datta, K., Vasquez, A., Tu, J., Torrizo, L., Alam, M. F., Oliva, N., Abrigo, E., Khush, G. S. & Datta, S. K. (1998). Constitutive and tissue–specific differential expression of *cryIA(b)* gene in transgenic rice plants conferring enhanced resistance to insect pests. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 20–30.
5. Datta, S. K., Peterhaus, A., Datta, K. & Potrykus, I. (1990). Genetically engineered fertile *indica* rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology*, 8, 736-740.
6. Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreprationr: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
7. Finnegan, J. & McElroy, D. (1994). Transgene inactivation: Plants fight back! *Bio/Technology*, 12, 883-888.
8. Gahakwa, D., Maqbool, S. B., Fu, X., Sudhakar, D., Christou, P. & Kohli, A. (2000). Transgenic rice as a system to study the stability of transgene expression: multiple heterologous transgenes show similar behavior in diverse genetic backgrounds. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 388-399.
9. Ghareyazie, B., Alinia, F., Menguito, C. A., Rubia, L. G., de Palma, J. M., Liwanag, E. A., Cohen, M. B., Khush, G. S. & Bennett, J. (1997). Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene. *Molecular Breeding*, 3, 401-414.
10. Goto, F., Toki, S. & Uchiyama, H. (1993). Inheritance of a co-transferred foreign gene in the progenies of transgenic rice plants. *Transgenic Research*, 2, 300-3005.
11. 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 Journal*, 6, 271–282.
12. Ho, N. H., Baisakh, N., Oliva, N., Datta, K., Frutos, R. & Datta, S. K. (2006). Translational fusion hybrid *Bt* genes confer resistance against yellow stem borer in transgenic elite Vietnamese rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Crop Science*, 46(), 781-789.
13. Hofte, H. & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53, 242-255.
14. Husnain, T., Jan, A., Maqbool, S. B., Datta, S. K. & Riazuddin, S. (2002). Variability in expression of insecticidal *cry1Ab* gene in *indica* basmati rice. *Euphytica*, 128, 121-128.
15. Kohli, A., Gahakwa, D., Vain, P., Laurie, D. A. & Christou, P. (1999). Transgene expression in rice

engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, 208, 88-97.
16. Lyttle, T. W. (1991). Segregation distorters. *Annual Review of Genetics*, 25, 511–557.
17. Nayak, P., Basu, D., Das, S., Basu, A., Ghosh, D., Ramakrishnan, N. A., Ghosh, M. & Sen, S. K. (1997). Transgenic elite *indica* rice plants expressing *cryIAc* ∂-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 94, 2111–2116.
18. Peng, J., Wen, F., Lister, R. L. & Hodges, T. K. (1995). Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice. *Plant Molecular Biology*, 27, 91–104.
19. Peng, J., Kononowicz, H. & Hodges, T. K. (1992). Transgenic indica rice plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 83, 855−863.
20. Wang, Z., Shu, Q., Ye, G., Cui, H., Wu, D., Altossar, I. & Xia, Y. (2002). Genetic analysis of resistance of *Bt* rice to stripe stem borer (*Chilo suppressalis*). *Euphytica*, 123, 379-386.
21. Wu, G., Cui, H., Ye, G., Xia, Y., Sardana, R., Cheng, X., Li, Y., Altossar, I. & Shu, Q. (2002). Inheritance and expression of the *cry1Ab* gene in *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 727-734.