ชื่อเรื่อง	การศึกษาการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งในข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake และข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6
ชื่อผู้เขียน	นางสาวณิชมน ธรรมรักษ์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ได้ศึกษาการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) จากผึ้งโพรง (*Apis cerana indica*) ของไทย ในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งในข้าว เพื่อพัฒนาข้าวดัดแปลงพันธุกรรมให้เป็นต้นแบบในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงคุณภาพของผลผลิต โดยได้สร้างพลาสมิด pNT5 ขนาด 14,633 คู่เบส ซึ่งมียีนชุด *mrjp2* ที่ควบคุมการทำงานโดย 35S dual enhancer promoter, TEV leader และ 35S terminator (E35S:: TEV leader:: *mrjp2*:: T35S) แทรกอยู่บริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ของพลาสมิด pCAMBIA1305.2 สำหรับใช้ถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งเข้าสู่ข้าว

การชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ดัดแปลง ซึ่งมีฮอร์โมน 2, 4 – D (2, 4 - Dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 4 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และที่มืด ตามลำดับ และสามารถชักนำให้เกิดต้นด้วยอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติมฮอร์โมน NAA และไคเนติน เข้มข้น 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้งได้ดัดแปลงระบบการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมของข้าวพันธุ์ Kitaake ซึ่งมีการศึกษาและใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 (pNT5) พบว่า สามารถถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้ แต่แคลลัสที่ได้รับยีนไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ได้ ส่วนแคลลัสของข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับยีนสามารถพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ โดยเกิดต้นข้าวร้อยละ 43.33 ซึ่งมียีนโปรตีนนมผึ้งแทรกอยู่ในจีโนม และได้ต้นข้าวที่มีการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้งในระดับ mRNA ร้อยละ 36.67 แต่ไม่สามารถตรวจการแสดงออกในระดับโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot ได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรม รุ่น T_0 กับข้าวปกติ พบว่า

ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดสูงกว่าข้าวปกติ แสดงว่า ระบบการถ่ายยีนของ Toki (1997) เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพต่อการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kitaake สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวชนิดจาปอนิกาได้ด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมต่อไปได้ แต่ไม่เหมาะสมกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ซึ่งเป็นข้าวชนิดอินดิกา

Title A study on transformation and expression of Major Royal Jelly Protein gene in *japonica* rice cv. Kitaake and *indica* rice cv. RD 6

Author Miss Nitchamon Thamaragsa

Degree of Master of Science in Biotechnology

Advisory Committee Chairperson Assistant Professor Dr.Chotipa Sakulsingharoj

ABSTRACT

Transformation and expression of major royal jelly protein (*mrjp2*) gene in glutinous rice (*Oryza sativa* sp.) cv. RD 6 were studied. The aim of this study was to transform a major royal jelly protein gene (*mrjp2*) into rice and to express this gene in transgenic rice for increased seed protein content and quality improvement. The plasmid using for plant transformation, pNT5 (14,633 bp), was constructed. The *mrjp2* gene cassette driven by 35S CaMV dual enhancer promoter was inserted into *Pst*I recognition site of a binary vector, pCAMBIA 1305.2.

Callus induction of *indica* Thai glutinous rice cv. RD 6 and *japonica* rice cv. Kitaake were studied using N6 medium supplemented with 4 and 2 mg/L 2, 4 – D, respectively. The calli of two varieties were induced under 16 h – light and dark conditions, respectively. Both of calli were regenerated on MS media supplemented with 1.0 mg/L NAA and 2.5 mg/L kinetin. Transformation of a major royal jelly protein (*mrjp2*) gene was modified from *Agrobacterium* – mediated transformation system of *japonica* rice (Kitaake) that has been established and widely used in several laboratories. The calli of two rice varieties were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 harboring the binary vector, pNT5. The results showed that the genes were successfully transformed into the calli of both rice varieties. However, the transformed RD 6 calli were unable to produce plantlets. The regeneration efficiency of the transformed Kitaake calli was 43.33 percentage of plants with stable integration of *mrjp2* gene in the plant genome. The 36.67 percent of transgenic rice plants showed the *mjrp2* expression at mRNA level. Expression of MRJP2 protein in selected transgenic lines, however, was not detected by Western blot technique using anti –

His antibody. Comparison of transgenic (T_0) and untransformed Kitaake rice plants was studied. The results indicated that all Kitaake rice plants showed no significant differences in morphology and growth while seed protein content of most transgenic rice was significantly higher than that of untransformed rice. Overall results indicated that the transformation system of Toki (1997) was effective for Kitaake rice transformation and suitable for *japonica* rice improvement using genetic engineering. But, this system was not suitable for RD 6 rice, *indica* rice.