

รหัสโครงการ : MRG4780001

ชื่อโครงการ : การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวเพื่อเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ด

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

บทคัดย่อ

องค์ประกอบของเมล็ดข้าวขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้ง major royal jelly protein (*mrjp*) เข้าสู่ข้าว อาจทำให้เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการโดยการเพิ่มคุณภาพโปรตีนในเมล็ดข้าวได้ ยีน *mrjp* แยกได้จากผึ้งโพรงของไทย (*Apis cerana*) และมีรหัสสร้างโปรตีน MRJP ที่มีกรดอะมิโนจำเป็นสูงประมาณ 45-49 % งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย และศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) ในข้าว การถ่ายยีนในข้าวทำได้โดยใช้แคลลัสที่พัฒนาจากบริเวณ scutella ของเมล็ดแก่ ร่วมกับการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pBU3 (*Gt1:: mrjp2 ::Tnos*) ซึ่งมียีน *mrjp2* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *Gt1* (Glutelin 1) ทำให้มีการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake พบว่า ข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake สามารถเกิดแคลลัสได้ 44.23 และ 73.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีขนาดเฉลี่ย 1.08 และ 1.07 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยแคลลัสของข้าวทั้งสองพันธุ์มีลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน คือ มีสีเหลืองอ่อน กลม และแน่น เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002) พบว่า วิธีการถ่ายยีนของ Endo et al. (2002) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนมากกว่าวิธีของ Toki (1997) เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดตายสูงกว่า และยังพบอีกว่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองมีค่าสูงกว่าข้าวพันธุ์ Kitaake แต่แคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ เมื่อตัดชิ้นส่วนใบของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T₀ มาทดสอบด้วยวิธี GUS assay พบว่า มีการแสดงออกของยีน *gusA* และเมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าว BU3 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* พบว่า มีการแทรกตัวของยีน *mrjp2* ในจีโนมของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ เมื่อนำต้นข้าวรุ่น T₁ มาทดสอบการถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูก พบว่า อัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS- ของรุ่น T₁ มีอัตราส่วน 3:1 แสดงว่า การถ่ายทอดยีนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมเป็นไปตามกฎของเมนเดล และการถ่ายทอดยีนมีความเสถียรจนถึงรุ่น T₃ และ T₄ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Southern blotting โดยใช้ probe ของยีน *mrjp2* ที่ติดฉลากด้วย DIG พบว่า ต้นข้าวที่นำมาทดสอบมียีน *mrjp2* แทรกอยู่ในจีโนม 1 ตำแหน่ง (a single insertion site) เมื่อนำเมล็ดอ่อนของข้าวต้น BU3 มาสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบ

โดยเทคนิค RT-PCR พบว่า มีการแสดงออกของยีน *mrjp2* ที่ระดับ mRNA และจากการวิเคราะห์โปรตีน ในเมล็ดแก่ของข้าวด้วยเทคนิค Western blotting พบการแสดงออกของโปรตีน GUS แต่ไม่สามารถ ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ได้ อาจเนื่องจากการแสดงออกของโปรตีนน้อยมาก หรือ โปรตีน MRJP2 อาจสลายไปในเมล็ดแก่ของข้าว และการใช้แอนติบอดี Anti-His ทำให้การตรวจสอบ โปรตีน MRJP2 มีความจำเพาะต่อโปรตีนต่ำ และมีความไวในการตรวจสอบต่ำ แต่เมื่อนำเมล็ดอ่อนของ ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blotting พบว่า มีการแสดงออกของยีน *mrjp2* โดยพบโปรตีนขนาดประมาณ 50 kD ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไป ประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของโปรตีนต่อไป

คำหลัก : ข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake เชื้ออะโกรแบคทีเรีย การถ่ายยีนในข้าว ยีนโปรตีนนมผึ้ง

Project Code : MRG4780001

Project Title : Improvement of Thai glutinous rice to increase essential amino acid contents in rice seeds

Investigator : Asst.Prof.Dr. Chotipa Sakulsingharoj
Faculty of Science, Maejo University

Project period : 3 Years

Abstract

The nutritional content of rice is deficient in several amino acids essential for human growth and development. To increase the protein quality of rice, a gene encoding a 'major royal jelly protein' (*mrjp*) isolated from Thai honeybee *Apis cerena* was transformed into rice. The MRJP was selected because of its high nutritional value as its composition consists of 45-49 % essential amino acids. Transformation and expression of a major royal jelly protein (*mrjp2*) gene in rice cv. Niaw Sanpahtawng (*Oryza sativa* L. var *indica*) and Kitaake (*Oryza sativa* L. var *japonica*) were studied. Scutella-derived calli established from mature rice seeds were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 harboring pBU3 (*Gt1::mrjp2::Tnos*) plasmid containing *mrjp2* gene driven by the endosperm-specific *Gt1* (Glutelin 1) promoter. It was found that Niaw Sanpahtawng and Kitaake showed the maximum percentages of callus formation at 44.23 and 73.71%, respectively and the average size of callus of 1.08 and 1.07 cm, respectively. Both varieties produced globular, yellow, and compact calli which were actively dividing and suitable for transformation. The efficiency of transformation methods of Toki (1997) and Endo et al. (2002) was compared. It was found that a suitable transformation method for both rice varieties was that of Endo et al. (2002) which produced the highest percentage of surviving calli. The percentage of surviving calli of Niaw Sanpahtawng was higher than that of Kitaake but the hygromycin resistant calli were unable to regenerate. GUS activity was detected on leaf segments of T₀ transgenic plants, indicating the expression of *gusA* gene. PCR analysis of leaf genomic DNA of BU3 plants using *mrjp2* specific primers showed the expected PCR products, indicating the integration of *mrjp2* gene into transgenic plant genomes. In addition, segregation analysis of T₁ progeny showed that the phenotypic ratio GUS-positive : GUS-negative was 3:1, following Medelian rule. Stable inheritance of genes was observed in offsprings of T₃ and T₄ transgenic rice plants. Southern blotting analysis using DIG-labeled probe of *mrjp2* gene showed a single insertion site of *mrjp2* gene in genome of tested transgenic rice plants. Total RNA from milky stage seeds of BU3

transgenic plants was extracted and subjected to RT-PCR analysis. The results showed that the *mrjp2* gene was expressed at mRNA level. Expression of MRJP2 protein in mature seeds of transgenic rice by Western blotting analysis was investigated. It was found that the 70 kDa GUS protein was detected. However, MRJP2 protein was not detectable by Anti-His, probably due to low expression or degradation of this protein in mature rice seeds. The use of Anti-His antibody may result in low specificity and sensitivity for detection of MRJP2 protein. However, developing transgenic rice seeds expressed the protein of about 50 kD which was possibly MRJP2 protein. Overall results indicated that *mrjp2* gene was successfully transformed and expressed in rice seeds. This study will be useful for genetic improvement of rice for improved protein quality in the future.

Keywords : *indica* rice cv. Niaw Sanpahtawng, *japonica* rice cv. Kitaake, *Agrobacterium tumefaciens*, rice transformation, major royal jelly protein (*mrjp2*) gene