งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม และศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง major royal jelly protein *(mrjp2)* ในข้าว การถ่ายยีนในข้าวทำได้โดยใช้แคลลัสที่พัฒนามาจากบริเวณ scutella ร่วมกับการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pBU3 (*Gt1*:: *mrjp2* ::Tnos) และ pBU5 (*Gt1*::SP:: *mrjp2* ::Tnos) ซึ่งมียีน *mrjp2* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *Gt1* ทำให้มีการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะในเนื้อเยื่อเอนโดสเปิร์ม นอกจากนี้ พลาสมิด pBU5 มีบริเวณ signal peptide sequence อยู่ด้าน 5′ ของยีน *mrjp2* เพื่อทำให้โปรตีน MRJP2 ถูกขนส่งเข้าไปในเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม ซึ่งอาจช่วยเพิ่มการสะสมโปรตีน MRJP2 ในเมล็ดข้าวได้ จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake ในอาหารสูตร N6D ที่มีปริมาณโพรลีน 2.88 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake สามารถเกิดแคลลัสได้ 44.23 และ 73.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีขนาดเฉลี่ย 1.08 และ 1.07 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยแคลลัสของข้าวทั้งสองพันธุ์มีลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน คือมีสีเหลืองอ่อน กลม แน่น จากการศึกษาอิทธิพลของ acetosyringone พบว่า ความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ 100 ไมโครโมลาร์ เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดตายมากที่สุด (46.47 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ 41.17 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพันธุ์ Kitaake) เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายยีนระหว่างพลาสมิด pBU5 และ pCAMBIA 1301 พบว่า ข้าวพันธุ์ Kitaake มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนดีกว่าพันธุ์เหนียวสันป่าตอง เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดสูงกว่า (55.2 และ 56.66 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ พลาสมิด pBU5 และ pCAMBIA1301) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002) พบว่า วิธีการถ่ายยีนของ Endo et al. (2002) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนมากกว่าวิธีของ Toki (1997) เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดตายสูงกว่า และยังพบอีกว่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองมีค่าสูงกว่าข้าวพันธุ์ Kitaake แต่แคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ และเมื่อตัดชิ้นส่วนใบของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T_0 มาทดสอบด้วยวิธี GUS assay พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gusA* และเมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าว BU3 และ BU5 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *mrjp2* พบว่ามีการแทรกตัวของยีน *mrjp2* ในจีโนมของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ เมื่อนำต้นข้าวรุ่น T_1 ของต้น BU3 และ BU5 มาทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม พบว่าอัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+:GUS- ของรุ่น T_1 มีอัตราส่วน 3:1 และเมื่อนำเมล็ดอ่อนของต้น BU3 และ BU5 มาสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบโดยเทคนิค RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน *mrjp2* ที่ระดับ mRNA และจากการวิเคราะห์โปรตีน MRJP2 ด้วยเทคนิค Western blotting พบการแสดงออกของโปรตีน GUS แต่ไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ได้ อาจเนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีนน้อยมาก หรือโปรตีน MRJP2 อาจสลายไปในเมล็ดข้าว หรืออาจซ้อนทับกับแถบโปรตีน glutelin ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน MRJP2 ทำให้ตรวจไม่พบโปรตีน

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) and pBU5 (*Gt1*::SP::*mrjp2*::Tnos) plasmids containing *mrjp2* gene driven by the endosperm-specific *Gt1* promoter. The pBU5 plasmid also had a signal peptide sequence at 5′ end of *mrjp2* gene which is responsible for targeting MRJP2 protein into endoplasmic reticulum and then may help increasing MRJP2 protein in rice seeds. The calli of rice cv. Niaw Sanpahtawng and Kitaake were cultured on N6D medium supplemented with 2 mg/L 2,4-D and 2.88 g/L L-proline under dark conditions. 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 1.03 and 1.07 cm, respectively. Both varieties produced globular, yellow, and compact calli which were actively dividing and suitable for transformation. Study on effect of acetosyringone on transformation efficiency showed that the concentration at 100 μM was suitable for transformation of Niaw Sanpahtawng and Kitaake which produced high percentages of surviving calli (46.47% and 41.17%, respectively). The comparison of transformation efficiency between pBU5 and pCAMBIA1301 plasmids following a modified protocol of Toki (1997) was investigated. It was found that Kitaake produced a higher percentage of hygromycin resistant calli than Niaw Sanpahtawng (55.2% for pBU5, 56.66% for pCAMBIA 1301). 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 T_0 transgenic plants, indicating the expression of *gusA* gene. PCR analysis of leaf genomic DNA of BU3 and BU5 plants using *mrjp2* specific primers showed the expected products, indicating the integration of *mrjp2* gene into transgenic plant genomes. In addition, segregation analysis of T_1 progeny showed that the phenotypic ratio GUS-positive : GUS-negative was 3:1. Total RNA from milky stage seeds of BU3 and BU5 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 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 rice seeds. In addition, the presence of a 50 kDa glutelin band may obscure the detection of MRJP2 protein of the similar size.