ปัจจุบัน RNAi เป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการศึกษาหน้าที่ของยีนในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อดัดแปลงพลาสมิดให้บรรจุลำดับเบสซ้ำแบบย้อนกลับ (Inverted repeat sequences) ที่สามารถกระตุ้นกระบวนการ RNAi โดยไปยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดเกลือในข้าว ผู้วิจัยได้เลือกซีดีเอ็นเอของโคลนที่ตอบสนองต่อความเครียดเกลือที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ จำนวน 4 โคลน มาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับซีดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับซีดีเอ็นเอของโคลน 89, 162, 380.3 และ 380.5 มีลำดับเบสคล้ายกับฐานข้อมูลรหัส gi 88842633, NM 001065599.1, AP008207.1, และยีน OS01g0846800 ตามลำดับซึ่งกระจายตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 1, 3 และ 7 ผลการวิเคราะห์และทำนายหน้าที่จากลำดับซีดีเอ็นเอ พบว่าโคลน 89, 162 และ 380.5 ล้วนมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองต่อความเค็ม ยกเว้นโคลน 380.3 ซึ่งเป็น hypothetical protein และยังไม่มีข้อมูลของการศึกษาเลย ผู้วิจัยได้เลือกโคลน 162 และ 380.3 เพื่อศึกษาต่อ แต่เนื่องจากลำดับเบสของโคลนทั้งสองไม่สมบูรณ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำเอาข้อมูลลำดับซีดีเอ็นเอรหัส NM 001065599.1 และ CT834846.1 เพื่อเป็นตัวแทนของลำดับซีดีเอ็นเอโคลน 162 และโคลน 380.3 ตามลำดับ ก่อนทำการออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะโดยกำหนดผลผลิตขนาด 356 คู่เบสและ 310 คู่เบส ตามลำดับ

การตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของโคลน 162 และโคลน 380.3 โดยเทคนิค RT-PCR พบว่า ไพรเมอร์ของโคลน 380.3 สามารถยืนยันความแตกต่างของระดับ การแสดงออกของยีนในต้นข้าวที่ได้รับเกลือและไม่ได้รับเกลือได้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบรูปแบบ การแสดงออกของโคลน 162 ได้

เพื่อที่จะศึกษาหน้าที่ของโคลนทั้งสองต่อกลไกการทนเค็มในข้าวโดยเทคนิค RNAi จำเป็นต้องดัดแปลงพลาสมิดให้อยู่ในรูป RNAi vector ก่อน โดยเริ่มจากการโคลนชิ้นส่วนซีดีเอ็นเอของโคลนทั้งสองที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา RT-PCR เข้าสู่พลาสมิด pENTR-TOPO/D ทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อด้วยปฏิกิริยาการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า สามารถโคลนได้เฉพาะชิ้นส่วนซีดีเอ็นเอของโคลน 380.3 โดยได้ขนาดถูกต้องและมีลำดับเบสครบสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนซีดีเอ็นเอของโคลน 380.3 ในพลาสมิด pENTR-TOPO/D เข้าสู่พลาสมิด pANDA เพื่อสร้างลำดับเบสซ้ำแบบย้อนกลับ ก่อนที่จะส่งถ่ายเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 โดยวิธี Electroporation ยืนยันผลการส่งถ่ายโดยใช้อาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและตรวจสอบขนาดและทิศทางการแทรกตัวของชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ทำการส่งถ่ายยีนรูปแบบ RNAi เข้าสู่แคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธี Agrobacterium-mediated transformation คัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร N6 ดัดแปลงที่มีการเติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบแคลลัสที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกจำนวน 54 แคลลัส คิดเป็นร้อยละ 19.01 ยืนยันว่ามีแคลลัสที่รับเอา T-DNA จากพลาสมิด pANDA ดัดแปลงซึ่งมียีน *hpt* เข้าสู่แคลลัสดังกล่าว และมีแคลลัสบางชิ้นที่สามารถชักนำให้เกิดยอดและจุดสีเขียวแสดงให้เห็นการพัฒนาเกิดเป็นยอด

การตรวจสอบการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสข้าวโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะต่อบริเวณที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณที่สนใจขนาด 310 คู่เบส บริเวณ GUS linker ขนาด 636 คู่เบส และเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ผสมระหว่างบริเวณที่สนใจและไพรเมอร์ของบริเวณ GUS linker จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1228 คู่เบส และ 1134 คู่เบส เป็นผลผลิตดีเอ็นเอที่มีรูปแบบเดียวกันกับผลผลิตที่ได้จากการตรวจสอบกับพลาสมิด pANDA ดัดแปลงที่สกัดได้จากเชื้ออะโกร-แบคทีเรียม ซึ่งยืนยันการส่งถ่ายลำดับเบสซ้ำแบบย้อนกลับของโคลน 380.3 เข้าสู่แคลลัสข้าวได้ครบถ้วนและไม่มีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างยีนใหม่

โดยสรุป ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการดัดแปลงพลาสมิดในรูปแบบ RNAi โดยการโคลนชิ้นส่วนของโคลน 380.3 ขนาด 310 คู่เบสเพื่อสร้างลำดับเบสซ้ำแบบย้อนกลับลงในพลาสมิด pANDA ได้และสามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอส่วนนี้เข้าสู่แคลลัสของข้าวและยืนยันการแทรกของลำดับเบสซ้ำแบบย้อนกลับในแคลลัสข้าวที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก การทดลองที่ควรจะทำในขั้นตอนต่อไปคือการตรวจสอบว่ามีการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยกลไก RNAi ในข้าวแปลงพันธุ์จริงและการทดสอบความสามารถในการทนเค็มระหว่างข้าวปกติและข้าวแปลงพันธุ์ RNAi เพื่อศึกษาว่าโคลน 380.3 มีผลต่อกลไกการทนเค็มในข้าว

RNAi is one of the most popular tools to study gene function in plants and animals in recent years. This study had a focus on using RNAi technology for functional analysis of salt-stress responsive genes to understand the mechanism of salt-stress tolerance in rice. Four salt-stress responsive cDNA clones from a previous report were selected and compared their sequences with the GenBank Database. Sequences of cDNA clone no. 89, 162, 380.3 and 380.5 showed highest nucleotide identity to rice sequences GenBank accession no. gi 88842633, NM 001065599.1, AP008207.1, and gene OS01g0846800 respectively, which distribute on chromosome 1, 3 and 7 of rice genome. Prediction and functional analysis with the BLAST program indicated that three of them had the functions related to salt-stress tolerance mechanism (Clone no. 89, 162 and 380.5) except clone no. 380.3 which is a hypothetical protein without any information. Two cDNA clones, 162 and 380.3, were selected for further functional study. Because of incomplete sequences of these two clones, cDNA sequences from the GenBank accession no. NM 001065599.1 and accession no. CT834846.1 represent for cDNA clone no. 162 and cDNA clone no. 380.3, respectively, were selected. Then primers specific to these clones were designed by Primer 3 program to obtain the PCR products of 356 bp and 310 bp in size of clone no. 162 and 380.3, respectively.

Gene expression patterns of clone no.162 and 380.3 at mRNA level were performed by RT-PCR technique. The result showed the clone no. 380.3 had higher level of expression in salt-treated rice seedlings than non-treated plants. However, the level of expression of clone no. 162 was not detected.

To determine the function of salt-stress responsive genes using RNAi technique, RNAi vector containing an Inverted Repeat (IR) sequence needed to be constructed. First, a cDNA fragment of each clones obtained by RT-PCR was cloned into pENTR-TOPO/D entry plasmid for amplification. A recombinant DNA plasmid was subsequently analyzed by restriction enzyme digestion and sequencing. The result showed that only a cDNA fragment of clone no.380.3 has been inserted in pENTR-TOPO/D with the right size and in the correct sequence. The LR recombination reaction was then performed for subcloning sequences of cDNA clone no. 380.3 into pANDA destination vector to obtain an IR sequence before electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404.

Agrobacterium-mediated transformation was carried out using 3 weeks-old rice calli incubated with *A. tumefaciens* strain LBA4404 harboring a modified pANDA plasmid. Transformed calli were selected on modify N6 medium supplemented with 30 mg/l hygromycin. We found the result showed that 54 calli were able to grow on selective medium, 19.01 percent, indicating that these calli have accepted T-DNA region of the modify pANDA plasmid containing the *hpt* gene. In addition, a few calli were able to be induced into green spots indicating shoot development.

Transformed calli were further analyzed for the presence of the IR sequence with specific primers by PCR reaction. The result from gel elctrophoresis showed a 310 bp DNA band of clone no. 380.3 and a 636 bp DNA band of GUS linker region. The presence of a 1228 bp DNA band and 1134 bp DNA band using primer combinations confirmed the existence of the IR sequence in rice callus genome. The results from PCR also indicated that no gene rearrangement in these transformed calli.

In conclusion, a RNAi vector of clone 380.3 was successfully made and transformed into rice calli. PCR reaction confirmed the existence of an IR sequence of this clone in rice calli that were able to grow on selective medium. The examination of gene silencing to confirm the occurrence of RNAi phenomenon in the transgenic plants and salt stress test between non-transgenic and RNAi plants needs to be determined in the future.