เอกสารคำสอน

ชุดวิชา 93337 การปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์พืช
หน่วยที่ 6 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ ดร. ธำรงเจต พัฒมุข

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์
มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
ต.บางพูด อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี
โทรศัพท์ 025048046 – 48
แฟกซ์ 025033578

คำนำ

ชุดวิชา 93337 การปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์พืช เป็นชุดวิชาในหมวดวิชาเฉพาะเลือกสำหรับนักศึกษาในหลักสูตรเกษตรศาสตรบัณฑิต แขนงวิชาการจัดการการเกษตร หลักสูตรปรับปรุง พ.ศ. 2559 สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์ ชุดวิชการปรับปรุงพันธุ์พืชและการขยายพันธุ์พืช เป็นชุดวิชาให้มุ่งเน้นให้ศึกษาเกี่ยวกับ ทฤษฎีและวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืช รวมทั้งหลักการและวิธีการขยายพันธุ์ โดยชุดวิชาที่ประกอบด้วยเนื้อหา 15 หน่วย ซึ่งเนื้อหาใน หน่วยที่ 6 การการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ แบ่งออกเป็น 3 ตอน ประกอบไปด้วยเนื้อหาเกี่ยวกับความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ความหมาย ความสำคัญ และเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรม ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรม วิธีการย้ายยีนในการตัดต่อยีนในพันธุวิศวกรรม สถานการณ์ ข้อกังวลและความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรม การใช้เทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการสร้างพืชแฮพพลอยด์ การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการรวมโพรโทพลาสต์การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช และการปรับแต่งจีโนม ดังนั้นเนื้อหาในหน่วยที่ 6 การการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพจึงเหมาะสำหรับ นักเรียน นักศึกษา และประชาชนทั่วไปที่สนใจทางด้านการปรับปรุงพันณธุ์พืชโดยนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาใช้

สารบัญ

คำนำ 2
สารบัญ 3
รายละเอียดชุดวิชา 4
แผนผังแนวคิดหน่วยที่ 6 5
แผนการสอนประจำหน่วย 6
แบบประเมินผลตนเองก่อนเรียนหน่วยที่ 6 9
ตอนที่ 6.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ 11
ตอนที่ 6.2 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรม 18
ตอนที่ 6.3 การใช้เทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืช 26
แนวตอบกิจกรรมหน่วยที่ 6 31
แบบประเมินผลตนเองหลังเรียนหน่วยที่ 6 34
เฉลยแบบประเมินผลตนเองหน่วยที่ 6 35
บรรณานุกรม 36

รายละเอียดชุดวิชา

ชุดวิชา 93337 การปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์พืช
(Crop improvement and plant propagation)

คำอธิบายชุดวิชา

ความสำคัญและประเภทของพันธุ์พืช คุณสมบัติของพันธุ์ดี วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืช การเลือกใช้พันธุ์ให้เหมาะสม การเก็บรักษาดพันธุ์ดี วิธรการขยายพันธุ์ เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ เทคโนโลยีชีวภาพและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การนำความรู้ด้านการปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์ไปใช้ในการประกอบอาชีพในเชิงธุรกิจ

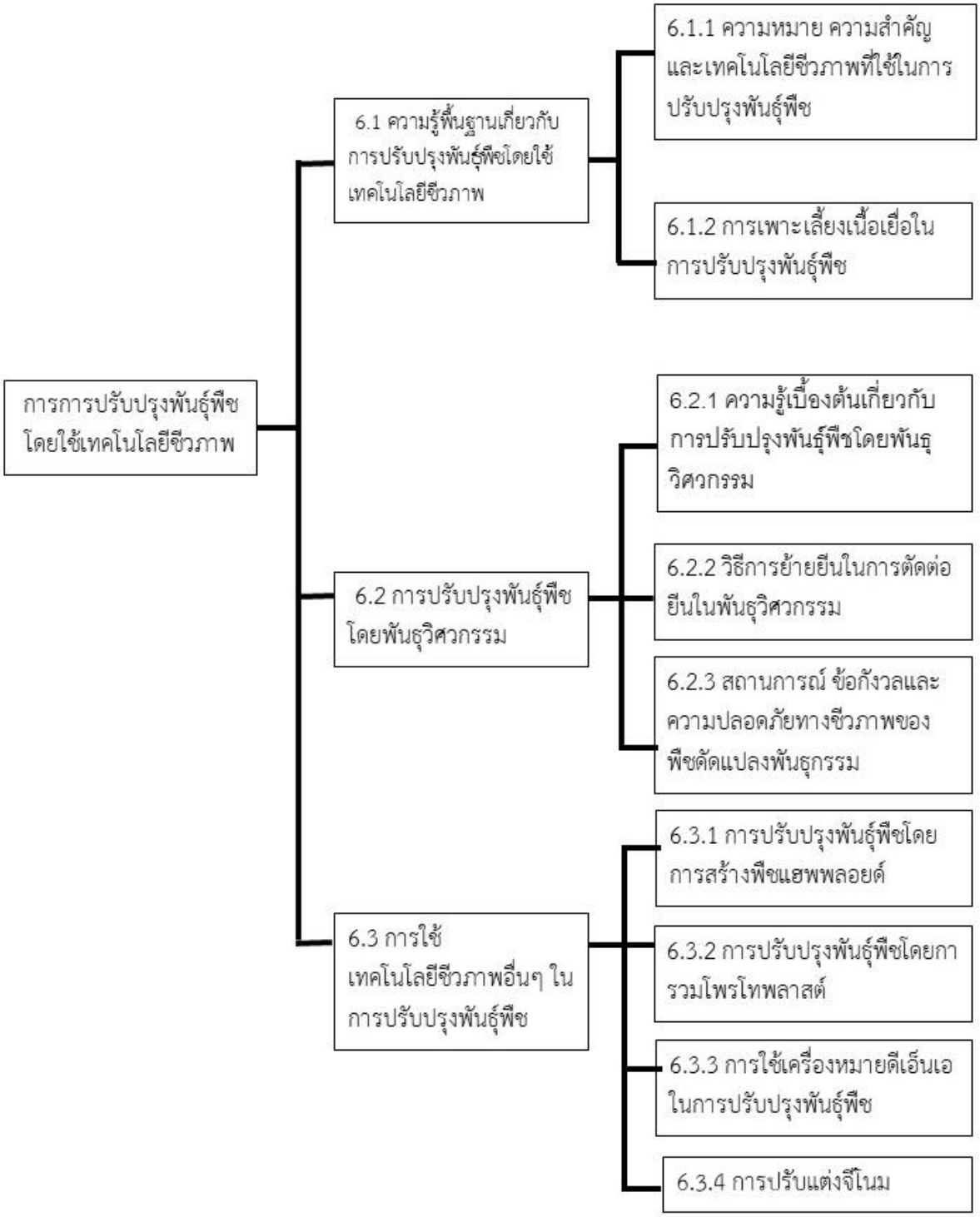
วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการและวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชและการขยายพันธุ์พืช
2. เพื่อให้สามารถเลือกใช้พันธุ์ดีที่เหมาะสม กับพื้นที่และความต้องการของตลาด และเก็บรักษาพันธุ์ได้
3. เพื่อให้สามารถนำความรู้ไปประกอบอาชีพในเชิงธุรกิจ

รายชื่อหน่วยการสอน

หน่วยที่ 1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืช
หน่วยที่ 2 พื้นฐานพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้แองกับการปรับปรุงพันธุ์พืช
หน่วยที่ 3 การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมตัวเอง
หน่วยที่ 4 การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมข้าม
หน่วยที่ 5 การปรับปรุงพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ
หน่วยที่ 6 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ
หน่วยที่ 7 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการก่อกลายพันธุ์
หน่วยที่ 8 บทเบื้องต้นเกี่ยวกับการขยายพันธุ์พืช
หน่วยที่ 9 การขยายพันธุ์พืชแบบอาศัยเพศ
หน่วยที่ 10 การขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ
หน่วยที่ 11 การขยายพันธุ์พืชโดยการตอนกิ่งและตัดชำ
หน่วยที่ 12 การขยายพันธุ์พืชโดยการติดตา ต่อกิ่ง และทาบกิ่ง
หน่วยที่ 13 การขยายพันธุ์พืชโดยการแบ่งและการแยก
หน่วยที่ 14 การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
หน่วยที่ 15 ธุรกิจที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธ์พืชและการขชยายพันธุ์พืช

แผนผังแนวคิด หน่วยที่ 6 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ



แผนการสอนประจำหน่วย

ชุดวิชา การปรับปรุงพันธุ์พืชและการขยายพันธุ์พืช

หน่วยที่ 6 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

ตอนที่

6.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

6.2 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรม

6.3 การใช้เทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

แนวคิด

1. เทคโนโลยีชีวภาพ หมายถึง เทคโนโลยีที่นำความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต หรือส่วนต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ผลผลิต รวมถึงอนุพันธ์ของสิ่งมีชีวิต เทคโนโลยีชีวภาพมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์หลายด้าน โดยเฉพาะด้านการเกษตรที่นำเอาเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการผลิตพืชและการปรับปรุงพันธุ์พืช เทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์พืชคือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
2. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรมเป็นกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยนำยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งถ่ายฝากเข้าไปในพืช เพื่อจุดประสงค์ที่จะปรับปรุงพันธุ์พืชให้ดีขึ้น กระบวนการดังกล่าวไม่ได้เกิดขึ้นตามธรรมชาติ พืชที่ถูกปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีนี้เรียกว่า พืชดัดแปรพันธุกรรม โดยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืชมีขั้นตอนดังนี้คือ 1) คัดเลือกยีนควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม 2) เพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการหรือตัดด้วยเอนไซน์ตัดจำเพาะ 3) สร้างกรดนิวคลีอิกลูกผสม 4) ย้ายยีนเข้าสู่พืช ซึ่งทำได้ 2 วิธีคือ การย้ายยีนโดยใช้พาหะ เช่น อะโกรแบคทีเรียม และการย้ายยีนโดยตรง เช่น การใช้เครื่องยิงอนุภาค 5) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อและคัดเลือกต้นที่เจริญจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน และ 6) ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้นพืชที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว อย่างไรก็ตาม วิธีการย้ายยีนในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช ถึงแม้จะมีการวิจัยเกี่ยวกับพืชดัดแปรพันธุกรรมออกมามากมาย ความปลอดภัยทางชีวภาพก็เป็นส่วนที่สำคัญ เนื่องจากความปลอดภัยต่อสุขภาพมนุษย์และต่อความหลากหลายทางชีวภาพอันอาจเกิดในการวิจัยและพัฒนา การเคลื่อนย้าย การจัดการ และการใช้ประโยชน์สิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงพันธุ์ โดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม สำหรับพืชที่ได้รับการดัดแปรพันธุกรรม ก่อนปลูกเป็นการค้าหรือปลดปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมต้องผ่านการทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพ
3. พืชแฮพลอยด์ คือ พืชที่มีโครโมโซมเพียงหนึ่งชุด การปรับปรุงพันธุ์พืชมีการใช้ประโยชน์จากพืชแฮพลอยด์หลายด้าน เช่น ใช้คัดเลือกลักษณะที่ต้องการ คัดเลือกลักษณะการกลายพันธุ์ ที่สำคัญคือการสร้างพืชสายพันธุ์แท้จากพืชแฮพลอยด์เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้สายพันธุ์แท้ในระยะเวลาที่เร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมตัวเองหลาย ๆ รุ่น การรวมโพรโทพลาสต์คือ การนำโพรโทพลาสต์ของพืชต่างชนิดหรือจีโนไทป์ มาทำให้เกิดการหลอมรวมกันเพื่อถ่ายทอดยีนในนิวเคลียสและ/หรือไซโตพลาสซึม สร้างลูกผสมที่มีพันธุกรรมที่แตกต่างออกไป หรือเรียกว่า somatic hybridization โดยทั่วไปมักใช้เพื่อการผสมข้ามสายพันธุ์ ชนิด หรือสกุลซึ่งมักประสบปัญหาความเข้ากันไม่ได้ของการผสมโดยอาศัยเพศ เครื่องหมายโมเลกุลหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอ หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซม ซึ่งสามารถบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์หรือความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต และเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดหนึ่ง สามารถแบ่งได้ 2

ประเภท ได้แก่ hybridization-based marker และ PCR-based marker ส่วนการปรับแต่งจีโนมเป็นเทคโนโลยีที่มีการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่งจำเพาะของสิ่งมีชีวิตให้คงอยู่อย่างถาวร ด้วยการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ ณ จุดที่มีลำดับเบสเป้าหมายแยกออกจากกัน เรียกว่า double-stranded brake (DSB)

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาหน่วยที่ 6 จบแล้ว นักศึกษาสามารถ

1. อธิบายความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพได้
2. อธิบายการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชได้
3. อธิบายการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ได้
4. อธิบายการใช้เทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้

กิจกรรมระหว่างเรียน

1. ทำแบบประเมินผลตนเองก่อนเรียนหน่วยที่ 6
2. ศึกษาเอกสารการสอนตอนที่ 6.1-6.3
3. ปฏิบัติกิจกรรมตามที่ได้รับมอบหมายในเอกสารการสอนแต่ละตอน
4. ฟังรายการวิทยุกระจายเสียงและวีซีดีประกอบชุดวิชา (ถ้ามี)
5. ชมรายการวิทยุโทรทัศน์ (ถ้ามี)
6. เข้ารับบริการการสอนเสริม (ถ้ามี)
7. ทำกิจกรรมประจำชุดวิชา (ถ้ามี)
8. ทำแบบประเมินผลตนเองหลังเรียนหน่วยที่ 6

สื่อการสอน

1. เอกสารการสอน
2. แบบฝึกปฏิบัติ
3. กิจกรรมประจำชุดวิชา (ถ้ามี)
4. รายการวิทยุกระจายเสียงและวีซีดีประกอบชุดวิชา (ถ้ามี)
5. รายการวิทยุโทรทัศน์ (ถ้ามี)
6. การสอนเสริม (ถ้ามี)

การประเมินผล

1. ประเมินผลจากแบบประเมินผลตนเองก่อนเรียนและหลังเรียน
2. ประเมินผลจากการทำกิจกรรมและแนวตอบท้ายเรื่อง
3. ประเมินผลจากกิจกรรมประจำชุดวิชา (ถ้ามี)
4. ประเมินผลจากการสอบไล่ประจำภาคการศึกษา

เมื่ออ่านแผนการสอนแล้ว ขอให้ทำแบบประเมินผลตนเองก่อนเรียน

หน่วยที่ 6 ในแบบฝึกปฏิบัติ แล้วจึงศึกษาเอกสารการสอนต่อไป

แบบประเมินผลตนเองก่อนเรียนหน่วยที่ 6

วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินความรู้เดิมของนักศึกษาเกี่ยวกับเรื่อง “การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ”

คำแนะนำ ขอให้นักศึกษาอ่านคำถามแล้วเขียนวงกลมล้อมรอบข้อคำตอบที่ถูกต้องที่สุด

---

1. เทคโนโลยีชีวภาพคืออะไร
   - ก. การนำความรู้ด้านชีวภาพมาประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ตามต้องการ
   - ข. การนำความรู้ด้านชีววิทยามาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ประโยชน์ตามต้องการ
   - ค. การนำความรู้ด้านวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต หรือส่วนต่าง ๆ เพื่อใช้ประโยชน์ตามต้องการ
   - ง. การนำความรู้เรื่องจุลินทรีย์มาหมักให้เกิดประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ประโยชน์ตามต้องการ
   - จ. การนำความรู้ด้านต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ประโยชน์ตามต้องการ
2. ข้อใดเป็นการใช้ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงพันธุ์พืช
   - ก. การขยายพันธุ์พืช
   - ข. การผลิตสารชีวภาพ
   - ค. การรวมโพรโตพลาสต์
   - ง. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์
   - จ. ถูกทุกข้อ
3. พืชดัดแปรพันธุกรรมคืออะไร
   - ก. พืชที่ผ่านการฉายรังสีเพื่อให้พันธุกรรมเปลี่ยนแปลง
   - ข. พืชที่ผ่านการดัดแปลงวิธีการปลูกจนได้ผลผลิตที่ดี
   - ค. พืชที่ผ่านกระบวนการเพิ่มจำนวนโครโมโซม
   - ง. พืชที่ผ่านกระบวนการการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมโดยการตัดต่อและปลูกถ่ายยีน
   - จ. ถูกทุกข้อ
4. การย้ายยีนในการตัดต่อยีนในพันธุวิศวกรรมใช้อะไรเป็นพาหะในการนำยีนเข้าสู่ต้นพืช
   - ก. เชื้อรา
   - ข. เชื้อไวรัส
   - ค. เชื้ออีโคไล
   - ง. อะโกรแบคทีเรียม
   - จ. บาซิลลัส
5. ประเทศที่มีการปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมมากที่สุดคือประเทศใด
   - ก. จีน
   - ข. สหรัฐอเมริกา
   - ค. บราซิล
   - ง. ญี่ปุ่น
   - จ. อินเดีย
6. ประเทศไทยอนุญาตให้มีการนำเข้าพืชดัดแปรพันธุกรรมชนิดใด
   - ก. ถั่วเหลือง
   - ข. ข้าวโพด
   - ค. มันฝรั่ง
   - ง. ข้าว
   - จ. มะเขือเทศ
7. พืชแฮพลอยด์คืออะไร
   - ก. พืชที่มีโครโมโซมภายในเซลล์เพียงชุดเดียว
   - ข. พืชที่มีโครโมโซมในเซลล์ 2 ชุด
   - ค. พืชที่ดัดแปรโครโมโซมแล้ว
   - ง. พืชที่มีขนาดเล็กกว่าปกติแต่ให้ผลผลิตได้
   - จ. ไม่มีข้อใดถูก
8. การรวมเซลล์ไร้ผนังมีข้อจำกัดอย่างไร
   - ก. ผู้ทำต้องมีความชำนาญ
   - ข. อุปกรณ์ที่ใช้มีความเฉพาะ
   - ค. ต้องใช้พืชที่มีลักษณะแตกต่างกันมาก ๆ
   - ง. การรวมกันของเซลล์ไร้ผนังบางครั้งไม่ประสบความสำเร็จ
   - จ. ต้นทุนการรวมเซลล์ไร้ผนังค่อนข้างสูง
9. ข้อใดคือเครื่องหมายดีเอ็นเอ
   - ก. เครื่องหมายอาร์เอพีดี
   - ข. เครื่องหมายเอเอฟแอลพี
   - ค. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์
   - ง. ไฮบริไดเซชั่น เบส มาร์คเกอร์
   - จ. ถูกทุกข้อ
10. เครื่องหมายดีเอ็นเอมีประโยชน์อย่างไร
   - ก. คัดเลือกพืชโดยไม่ต้องทำลายต้นพืช
   - ข. คัดเลือกพืชหลายลักษณะพร้อมกันได้
   - ค. ใช้บอกความใกล้ชิดของพันธุกรรม
   - ง. ข้อ ก. และ ข. ถูก
   - จ. ข้อ ก. ข. และ ค. ถูก

ตอนที่ 6.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

โปรดอ่านหัวเรื่อง แนวคิด และวัตถุประสงค์ของตอนที่ 6.1 แล้วจึงศึกษารายละเอียดต่อไป

หัวเรื่อง

เรื่องที่ 6.1.1 ความหมาย ความสำคัญ และเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

เรื่องที่ 6.1.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงพันธุ์พืช

แนวคิด

1. เทคโนโลยีชีวภาพ หมายถึง เทคโนโลยีที่นำความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต หรือส่วนต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ผลผลิต รวมถึงอนุพันธ์ของสิ่งมีชีวิต เทคโนโลยีชีวภาพมีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันหลายด้าน คือ ด้านอาหารและอุตสาหกรรม ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านการแพทย์ และด้านการเกษตร เทคโนโลยีชีวภาพมีส่วนช่วยในงานปรับปรุงพันธุ์พืชหลายอย่าง ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พันธุวิศวกรรม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ และการปรับแต่งจีโนม
2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ดังนี้ การเก็บรักษาและแลกเปลี่ยนพันธุกรรมพืชระหว่างประเทศ การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ การคัดเลือกพืชที่มีลักษณะทนทานต่อสภาพแวดล้อม การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร การรวมโปรโตพลาสต์ และการสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาตอนที่ 6.1 จบแล้ว นักศึกษาสามารถ

1. อธิบายความหมาย และความสำคัญของเทคโนโลยีชีวภาพได้
2. อธิบายเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้
3. อธิบายการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์พืชได้

ตอนที่ 6.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

1. ความหมายของเทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) หมายถึง เทคโนโลยีที่นำความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต หรือส่วนต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ผลผลิต รวมถึงอนุพันธ์ของสิ่งมีชีวิต เช่น เอนไซม์ โปรตีน มาพัฒนาปรับปรุงเพื่อใช้ประโยชน์ตามที่ต้องการ เช่น ด้านการเกษตร อาหาร สิ่งแวดล้อม และทางการแพทย์ เป็นต้น

2. ความสำคัญของเทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพมีความสำคัญต่อชีวิตประจำวันหลายด้าน ดังนี้

2.1 ด้านอาหารและอุตสาหกรรมอาหาร อาหารที่ใช้รับประทานกันอยู่ทุกวันนี้มีหลายชนิดเป็นผลิตภัณฑ์จากเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ขนมปัง ซีอิ๊ว แหนม ผลไม้ดอง เป็นต้น

2.2 ด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเทคโนโลยีชีวภาพมีความเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ และจุลินทรีย์มีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายในระบบนิเวศน์ ดังนั้นจึงช่วยในเรื่องการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ และปลดปล่อยธาตุอาหารแก่พืชได้ อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายขยะและกำจัดน้ำเสียได้ด้วยเนื่องจากมีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถบำบัดน้ำเสียได้

2.3 ด้านการแพทย์ เทคโนโลยีชีวภาพช่วยในเรื่องของการรักษา และป้องกันโรคต่าง ๆ ได้ เช่น ใช้ผลิตวัคซีนป้องกันโรค การใช้เทคโนโลยีในการตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมหรือโรคทางพันธุกรรมต่าง ๆ ได้โดยใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอเข้ามาช่วย

2.4 ด้านการเกษตร เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามามีบทบาทด้านการเกษตร เช่น การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และที่สำคัญมีบทบาทมากในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ การตัดต่อยีน มีหลายประเทศที่ยินยอมให้เกษตรกรในประเทศปลูกพืชที่ได้จากการดัดแปรพันธุกรรม เช่น สหรัฐอเมริกา อินเดีย บราซิล เป็นต้น

3. เทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

เทคโนโลยีชีวภาพมีส่วนช่วยในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ดังนี้

3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นการนำพืชไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีส่วนช่วยในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็วและปราศจากโรค ในการปรับปรุงพันธุ์พืชการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยในเรื่องของการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของลูกผสมข้ามชนิดได้ ซึ่งปกติการผสมข้ามชนิดพืชมักไม่ติดเมล็ด จึงต้องนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างพืชสายพันธุ์แท้โดยการนำละอองเกสรของพืชมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้กับละอองเกสรโดยใช้สารเคมี เช่น โคลชิซิน

3.2 พันธุวิศวกรรม เป็นการนำความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์มาใช้ในการนำยีนหรือหน่วยพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ที่ต้องการไปไว้ในพืชเป้าหมายที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ต้องการ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีวิตามินเอสูง การปรับปรุงพันธุ์มะละกอให้มีความต้านทานต่อโรคใบจุดวงแหวน เป็นต้น

3.3 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มีบทบาทในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชในเรื่องของการจัดกลุ่ม จำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกันมากจนยากที่จะจำแนกออกจากกันได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของพืชได้อย่างถูกต้อง จึงนำมาใช้ในงานจำแนกพันธุ์พืช หาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกัน สร้างแผนที่ทางพันธุกรรม และการหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืชได้ด้วยในกรณีที่มีการปรับปรุงพันธุ์พืชได้สายพันธุ์ใหม่ขึ้น

3.4 การปรับแต่งจีโนม (genome editing) คือ การปรับเปลี่ยนและแก้ไขรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตให้มีความจำเพาะและแม่นยำ เพื่อแก้ไขให้ได้ยีนที่มีลักษณะตามต้องการ

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงพันธุ์พืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีชีวภาพประเภทหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่

4.1 การเก็บรักษาพันธุกรรมพืช

4.2 การแลกเปลี่ยนพันธุกรรมพืชระหว่างประเทศ

4.3 การสร้างความแปรปรวนในพืช

4.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

4.5 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ

4.6. การคัดเลือกพืชที่มีลักษณะทนทานต่อสภาพแวดล้อม

4.7 การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและละอองเกสรพืช

4.8 การรวมโปรโตพลาสต์

4.9. การสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม

กิจกรรม 6.1.1

1. จงอธิบายความหมายของเทคโนโลยีชีวภาพ
2. เทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืชมีอะไรบ้าง
3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างไรบ้าง

บันทึกตอบกิจกรรม 6.1.1

_____

_____

_____

_____

_____

ตอนที่ 6.2 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรม

โปรดอ่านหัวเรื่อง แนวคิด และวัตถุประสงค์ของตอนที่ 6.2 แล้วจึงศึกษารายละเอียดต่อไป

หัวเรื่อง

เรื่องที่ 6.2.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรม

เรื่องที่ 6.2.2 วิธีการย้ายยีนในการตัดต่อยีนในพันธุวิศวกรรม

เรื่องที่ 6.2.3 สถานการณ์ ข้อกังวลและความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปรพันธุกรรม

แนวคิด

1. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรมเป็นกระบวนการนำยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งถ่ายฝากเข้าไปในพืช เพื่อจุดประสงค์ที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ให้ดีขึ้น กระบวนการดังกล่าวไม่ได้เกิดขึ้นตามธรรมชาติ พืชที่ได้เรียกว่า พืชดัดแปรพันธุกรรม เช่น มะละกอพันธุ์ต้านทานโรคไวรัสใบจุดวงแหวน ได้จากการถ่ายยีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส ฝ้ายบีทีต้านทานหนอนเจาะสมอฝ้ายได้จากการถ่ายยีนจากเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส ทูริงเยนซีส เป็นต้น กระบวนการทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืชมีขั้นตอนดังนี้คือ 1) คัดเลือกยีนควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม 2) เพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการหรือตัดด้วยเอนไซน์ตัดจำเพาะ 3) สร้างกรดนิวคลีอิกลูกผสม 4) ย้ายยีนเข้าสู่พืช 5) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อและคัดเลือกต้นที่เจริญจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน และ 6) ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้นพืชที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว
2. วิธีการย้ายยีนในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชแบ่งได้ 2 วิธีคือ 1) การย้ายยีนโดยใช้พาหะ เช่น อะโกรแบคทีเรียม และ 2) การย้ายยีนโดยตรง เช่น การใช้เครื่องยิงอนุภาคทั้ง 2 วิธีนี้เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมในเซลล์พืช จากนั้นจึงเพาะเลี้ยง ชักนำและพัฒนาเซลล์พืชที่มียีนเพิ่มเข้ามาในโครโมโซมเดิมให้เจริญเป็นพืชต้นใหม่ ซึ่งจะทำให้พืชที่เพาะเลี้ยงได้มีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนไป
3. ความปลอดภัยทางชีวภาพ หมายถึง ความปลอดภัยต่อสุขภาพมนุษย์และต่อความหลากหลายทางชีวภาพอันอาจเกิดในการวิจัยและพัฒนา การเคลื่อนย้าย การจัดการ และการใช้ประโยชน์สิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงพันธุ์ โดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม สำหรับพืชที่ได้รับการดัดแปรพันธุกรรมก่อนปลูก เป็นการค้าหรือปลดปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมต้องผ่านการทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพ ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าพืชดัดแปรพันธุกรรมนั้น มีความปลอดภัยต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงและข้อกังวลของพืชดัดแปรพันธุกรรม ได้แก่ แหล่งของยีน ส่วนประกอบของยีน

ตำแหน่งที่ยีนเข้าไปแทรกตัวบนโครโมโซมพืช โดยจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพ และเศรษฐกิจ

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาตอนที่ 6.3 จบแล้ว นักศึกษาสามารถ

1. อธิบายเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรมได้
2. อธิบายวิธีการย้ายยีนในการตัดต่อยีนในพันธุวิศวกรรมได้
3. อธิบายสถานการณ์ ข้อกังวลและความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปรพันธุกรรมได้

ตอนที่ 6.2 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรม

1. พันธุวิศวกรรม

พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) หมายถึง เทคนิคหรือกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยนำดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดมาต่อเข้าด้วยกันเป็นดีเอ็นเอสายผสมที่ เรียกว่า รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลักษณะตามต้องการ หรือเพื่อผลิตโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เป็นผลิตผลจากยีนโดยที่กระบวนการดังกล่าวไม่ได้เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

2. พืชดัดแปรพันธุกรรม

พืชดัดแปรพันธุกรรม หมายถึง พืชที่ผ่านกระบวนการการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพคือมีการตัดต่อและปลูกถ่ายยีนหรือการย้ายยีน จากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปสู่สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง หรือระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน และยีนที่ถูกถ่ายทอดไปนั้นสามารถแสดงออกโดยการสร้างโปรตีนได้เช่นเดิม รวมทั้งมีความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมนั้นต่อไปยังรุ่นลูกเหมือนในพืชปกติได้ ดังนั้นการถ่ายยีนจึงทำให้สิ่งมีชีวิตที่ได้รับยีนนั้นเข้าไปสามารถแสดงลักษณะใหม่ที่ไม่เคยมีมาก่อนได้ ซึ่งเทคโนโลยีชีวภาพที่ประสบความสำเร็จในการนำมาใช้ในงานทางด้านปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น พืชที่ทนต่อสภาพดินฟ้าอากาศที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต พืชที่มีความสามารถต้านทานโรคและแมลงศัตรูพืชได้ พืชที่มีสารอาหารทางโภชนาการหรือสารชีวโมเลกุลบางชนิดที่เพิ่มขึ้น เช่น มีโปรตีน วิตามิน หรือไขมันเพิ่มขึ้น เป็นต้น

3. ลักษณะเด่นของพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้พันธุวิศวกรรม สามารถถ่ายยีนเดี่ยวที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการเข้าไปในต้นพืชที่ต้องการ และช่วยลดปัญหาการเข้าคู่กันไม่ได้ของยีน คือ

3.1 สามารถถ่ายยีนเดี่ยวที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการเข้าไปในต้นพืชที่ต้องการ

3.2 ช่วยลดปัญหาการเข้าคู่กันไม่ได้ของยีน

4. ความสำเร็จของการตัดต่อยีนในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ในที่นี้จะยกตัวอย่างความสำเร็จของการตัดต่อยีนเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานแมลง ต้านทานโรคพืช ต้านทานสารกำจัดวัชพืช เพิ่มคุณภาพผลผลิตทางการเกษตร และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างความสำเร็จของการตัดต่อยีนด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ลักษณะการปรับปรุงพันธุ์	พืช	ชื่อพันธุ์	ยีน/แหล่งที่มา	ฟีโนไทป์
1.การปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานแมลง	ข้าวโพด	พันธุ์ MON 810 MON 863	cry1Ab synthetic gene/ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*	ต้านทานหนอนเจาะฝักข้าวโพด
	ฝ้าย	พันธุ์ศรีสำโรง 60	cry1Ab synthetic gene/ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*	ต้านทานหนอนเจาะสมอฝ้าย
2. การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อต้านทานโรคพืช	มะละกอ	UH SunUp และ UH Rainbow	coat protein gene; CP gene/*Papaya ring spot virus*	ต้านทานโรคไวรัสใบจุดวงแหวนมะละกอ
3.การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช	ถั่วเหลือง	Roundup ready soybean	aro A gene/แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium*	ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท
4. การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มคุณภาพผลผลิตทางการเกษตร	มะเขือเทศ	Flavr Savr Tomato	antisense ACC synthase gene และ ACC oxidase gene/ มะเขือเทศ	ยืดอายุมะเขือเทศ ลดการสร้างเอทิลีน
	ดอกคาร์เนชั่น	FLORIGENE® Moonshade™	Flavonoid 3',5'-hydroxylase (blue gene)/ดอกพิทูเนีย	ดอกมีสีน้ำเงิน ม่วง

5.ศัพท์และเทคนิคในงานพันธุวิศวกรรม

5.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรียบางชนิดตามธรรมชาติ ทำหน้าที่ป้องกัน ตนเองจากการบุกรุกของดีเอ็นเอแปลกปลอมจากแบคทีเรียหรือไวรัสชนิดอื่นๆ โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดมีบริเวณลำดับเบสจดจำหรือจุดตัดจำเพาะที่แตกต่างกัน

5.2 ดีเอ็นเอพาหะ (vector) การสร้างดีเอ็นเอสายผสมหรือการโคลนยีน ต้องอาศัยดีเอ็นเอพาหะเป็นตัวรับชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณ และนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เป็นแบคทีเรีย ดีเอ็นเอพาหะมีหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้คือ พลาสมิด (plasmid) ซึ่งเป็นโครโมโซมพิเศษ พบในแบคทีเรียบางชนิดตามธรรมชาติ มีคุณสมบัติทำให้แบคทีเรียต้านทานสารปฏิชีวนะ ทนทานความร้อน ได้มีการดัดแปลงดีเอ็นเอของพลาสมิด โดยตัดส่วนที่ไม่สำคัญออก และเพิ่มเติมบางส่วนให้เหมาะต่อการเป็นดีเอ็นเอพาหะในการ

โคลนยีน เช่น โปรโมเตอร์ (promotor) เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน ยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือก ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ เป็นต้น

5.3 การโคลนยีน (gene cloning) คือ กระบวนการที่ทำให้เกิดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มียีนหรือดีเอ็นเอเหมือนกัน ซึ่งอาจเป็นยีนเดี่ยวหรือยีนหลายๆ ยีน โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนจำเพาะที่ต้องการศึกษาให้มีปริมาณมากขึ้น ทำได้ 2 วิธี คือ

5.3.1 นำดีเอ็นเอเป้าหมายมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะหรือเวกเตอร์

5.3.2 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

6. กระบวนการทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืช

กระบวนการทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืช มี 6 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

6.1 คัดเลือกยีนควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม ยีนควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมหรือยีนที่นำมาใช้ในกระบวนการส่งถ่ายยีน สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

6.1.1 ยีนเพื่อการเพิ่มผลผลิต เช่น ยีนต้านทานการเข้าทำลายของโรคและแมลง และยีนสร้างความทนทานต่อสภาพแวดล้อม

6.1.2 ยีนเพื่อการปรับปรุงคุณภาพของผลผลิต เช่น ยีนชะลอการสุกแก่ของผลไม้ และยีนเพิ่มปริมาณแป้งและน้ำตาล

6.2 เพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการหรือตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หลังจากที่ทราบยีนที่ต้องการแล้ว จะทำการเพิ่มประมาณยีนหรือดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) หรือสกัดแยกยีนดังกล่าวออกจากโครโมโซมโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถใช้เสมือนกรรไกรตัดดีเอ็นเอให้เป็นชิ้น ๆ ตรงตำแหน่งจำเพาะที่ต้องการได้

7.3 สร้างกรดนิวคลีอิกลูกผสม การนำยีนเข้าสู่พืชจะต้องมีการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจกับดีเอ็นเอพาหะ (vector) โดยสามารถเชื่อมสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้วมาต่อกับดีเอ็นเอพาหะ โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกสทำให้ได้ดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) หรือเรียกว่าพลาสมิด ซึ่งพลาสมิดที่ใช้เป็นพาหะเป็น Ti plasmid ซึ่งพบในอะโกรแบคทีเรียม (*Agrobacterium tumefaciens*)

7.4 ย้ายยีนเข้าสู่พืช กระบวนการย้ายยีนเข้าสู่พืชนั้นสามารถแบ่งได้ 2 วิธี ที่นิยมปฏิบัติคือ การย้ายยีนโดยอาศัยพาหะ และการย้ายยีนโดยตรง โดยมีรายละเอียดดังนี้

7.4.1 การย้ายยีนโดยอาศัยพาหะ เช่น ใช้อะโกรแบคทีเรียม (Agrobacterium mediated gene transfer) ซึ่งเป็นวิธีการส่งถ่ายยีนที่ต้องการ โดยส่งถ่ายเข้าไปในพาหะ ก่อนอาศัยกลไกของพาหะนำพายีนที่ต้องการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช

7.4.2 การย้ายยีนโดยตรง เป็นวิธีการส่งถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชเป้าหมายโดยตรง เช่น การส่งถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (biolistic technique) การถ่ายฝากยีนโดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (electroporation) การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีด (microinjection) เป็นต้น

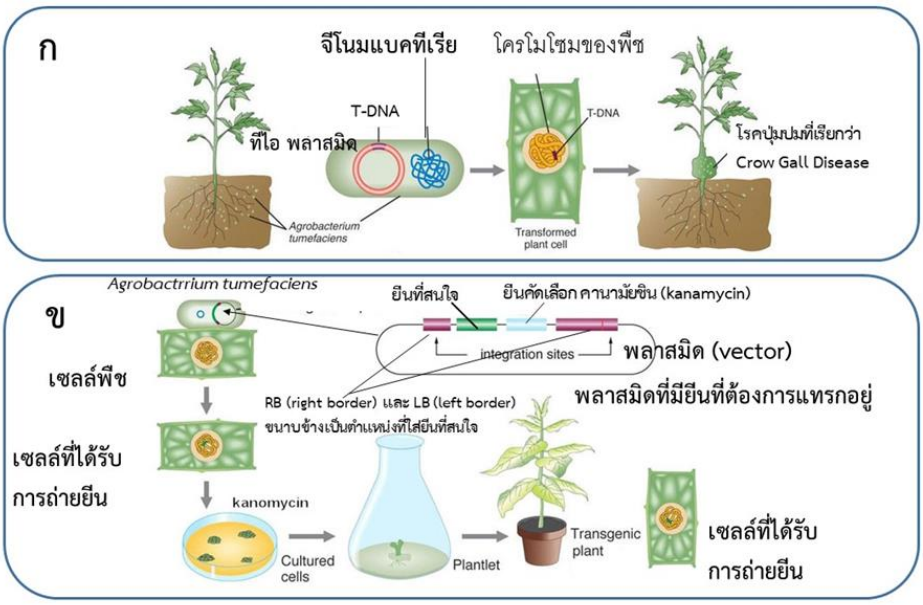
7.5 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อและคัดเลือกต้นที่เจริญจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน

7.6 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้นพืชที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว

8. วิธีการย้ายยีนในการตัดต่อยีนในพันธุวิศวกรรม

วิธีการย้ายยีนในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถแบ่งได้ 2 วิธีคือ 1) การย้ายยีนโดยใช้พาหะหรือการย้ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม และ 2) การย้ายยีนโดยตรง เช่นการใช้เครื่องยิงอนุภาค โดยมีรายละเอียดดังนี้

8.1. การย้ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม อะโกรแบคทีเรียมเป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิด aerobic bacteria ที่อาศัยอยู่ในดิน เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่ก่อให้เกิดการส่งถ่ายยีนตามธรรมชาติหรือก่อให้เกิดพันธุวิศวกรรมตามธรรมชาติ โดยอะโกรแบคทีเรียมที่นิยมนำมาใช้ในการถ่ายยีนคือ *Agrobactrrium tumefaciens* มีพลาสมิด เรียกว่า ทีไอพลาสมิด (Tumor Inducing Plasmid, Ti-Plasmid) ซึ่งสามารถบุกรุกเข้าสู่พืชได้ในบริเวณที่มีบาดแผล แล้วทำให้เกิดโรคปุ่มปมที่เรียกว่า Crow Gall Disease เนื่องจากมีการสร้างสารโอไพน์ (Opine) (เช่น Octopine และ Nopaline) ขึ้นโดยยีนที่อยู่บนทีไอพลาสมิด ทีไอพลาสมิดมีขนาดประมาณ 140-235 กิโลเบส (kb) ซึ่งในส่วนของทีไอพลาสมิดจะมีส่วนของ T-DNA (Transfer DNA) ขนาด 20 กิโลเบส ที่สามารถถ่ายทอดหรือแทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์พืชเจ้าบ้านได้ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงนำกระบวนการนี้มาประยุกต์ โดยใช้ตัดต่อยีนที่สนใจและสอดแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชเป้าหมายผ่าน T-DNA



ภาพที่ 1 การย้ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม (ก) การถ่ายยีนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในธรรมชาติ (ข) การถ่ายยีนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมเพื่อสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม

8.2 การย้ายยีนด้วยเทคนิคการยิงอนุภาค

การใช้เทคนิคการยิงอนุภาค Particle bombardment (Biolistic; Particle gun) คือเทคนิคการยิงอนุภาคดีเอ็นเอ อาจมีชื่อเรียกหลายแบบ เช่น ไมโครโพรเจคไทล์บอมบาร์ดเมนท์ (microprojectile bombardment) พาติเติลกัน (particle gun) ไบโอลิสติกเทคนิค (biolistic technique) ซึ่งจะใช้พื้นฐานเหมือนกันคือยีนที่ต้องการสอดแทรกเข้าเซลล์นั้นจะนำมาเคลือบไว้บนอนุภาคโลหะขนาดเล็ก เช่น อนุภาคทองคำ หรืออนุภาคทังสเตน ขนาดประมาณ 1-4 ไมครอน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวนำยีนเข้าสู่เซลล์ โดยใช้แรงผลักดันจากแหล่งต่างๆ เช่น แรงขับจากดินปืน แรงขับจากกระแสไฟฟ้า หรือแรงดันของก๊าซ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวผลักดันอนุภาคโลหะเข้าสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย ผ่านผนังเยื่อหุ้มเซลล์ ภายใต้สภาวะสุญญากาศ และเกิดการเชื่อมต่อระหว่างยีนที่ต้องการกับโครโมโซมของเซลล์เป้าหมาย โดยที่เซลล์นั้นไม่ได้รับอันตราย ซึ่งการถ่ายยีนจะเกิดขึ้นเมื่ออนุภาคโลหะมีแรงขับเคลื่อนที่ทำให้เกิดความเร็วประมาณ 300-600 เมตร/วินาที และสามารถผ่านทะลุผนังเซลล์พืชเข้าไปได้

9. สถานการณ์พืชดัดแปรพันธุกรรม

ในที่นี้จะกล่าวถึงสถานการณ์พืชดัดแปรพันธุกรรมในระดับโลก และในประเทศไทย ดังต่อไปนี้

9.1 สถานการณ์พืชดัดแปรพันธุกรรมโลก พื้นที่ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมของประเทศอุตสาหกรรมและประเทศกำลังพัฒนามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ตั้งแต่มีการปลูกเชิงพาณิชย์เมื่อปี พ.ศ. 2539 จากจุดเริ่มต้นในประเทศสหรัฐอเมริกา องค์กรไอซ่า (ISAAA) รายงานว่า ในช่วงปี พ.ศ. 2559-2560 มี 26 ประเทศที่ปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรม หรือเรียกว่าพืชไบโอเทค เป็นการค้า โดยประเทศที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด คือ สหรัฐอเมริกา รองลงมาได้แก่ บราซิล อาร์เจนตินา แคนาดา และอินเดีย ส่วนพืชดัดแปรพันธุกรรมที่ปลูกมาก ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด คาโนลา และฝ้าย นอกจากนี้ยังมีอีก 32 ประเทศที่อนุญาตให้นำเข้าพืชดัดแปรพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นอาหารและอาหารสัตว์

9.2 สถานการณ์พืชดัดแปรพันธุกรรมในประเทศไทย ประเทศไทยเริ่มมีกฎระเบียบควบคุมพืชดัดแปรพันธุกรรม เมื่อปีพ.ศ. 2537 โดยใช้พระราชบัญญัติกักกันพืช พ.ศ. 2507 ประกาศกำหนดพืชดัดแปรพันธุกรรม 40 ชนิด เป็นพืชต้องห้าม ห้ามนำเข้า ยกเว้นเพื่อการศึกษาและวิจัย โดยต้องขออนุญาตจากกรมวิชาการเกษตร และต่อมาได้มีประกาศเพิ่มเติมอีก 2 ฉบับ คือ ใน พ.ศ. 2543 ประกาศยกเว้นข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมที่นำมาใช้โดยตรงเป็นอาหารคนหรืออาหารสัตว์ หรือในกระบวนการแปรรูป (GMO-FFPs) และใน พ.ศ. 2546 ประกาศ ห้ามนำเข้าพืชจีเอ็มโอเพิ่มเติมอีก 49 ชนิด รวมทั้งหมดเป็น 89 ชนิด ซึ่งประกาศทั้ง 3 ฉบับ ยกเว้นอาหารสำเร็จรูปที่ผลิตจากพืชเหล่านี้ และไม่มีผลบังคับใช้กับการวิจัยและพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรมที่ดำเนินการอยู่ภายในประเทศ โดยไม่มีการนำเข้าจากต่างประเทศ

10. ความปลอดภัยทางชีวภาพ

ความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety) จึงหมายถึง ความปลอดภัยต่อสุขภาพมนุษย์และต่อความหลากหลายทางชีวภาพ อันอาจเกิดในการวิจัยและพัฒนา การเคลื่อนย้าย การจัดการ และการใช้ประโยชน์สิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมที่ได้รับการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม การจัดระดับความเสี่ยงของงานทดลองเพื่อการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ การวิจัยและทดลองที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม แบ่งตามระดับความเสี่ยง (risk) ได้ เป็น 4 ประเภท คือ

10.1 Bio-safety Level 1 (BLB 1) คือ การวิจัยและทดลองที่ไม่มีอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานทดลอง ชุมชน และสิ่งแวดล้อม

10.2 Biosafety Level 2 (BLB 2) คือ การวิจัยและการทดลองที่อาจเป็นอันตรายในระดับต่ำต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องทดลอง ชุมชน และสิ่งแวดล้อม

10.3 Biosafety Level 3 (BLB 3) คือ การวิจัยและการทดลองที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องทดลอง และอาจเป็นอันตราย ในระดับต่ำต่อชุมชนและสิ่งแวดล้อม หรือเสี่ยงกับการรักษาผู้ป่วยโดยการดัดแปรพันธุกรรม และงานที่อาจเป็นอันตรายในระดับที่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เรียก

10.4 Biosafety Level 4 (BLB 4) คือ งานวิจัยและการทดลองที่อาจมีอันตรายระดับสูงต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องทดลอง ชุมชน และสิ่งแวดล้อมเรียก ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 4

กิจกรรม 6.2.1

1. จงอธิบายความหมายของพันธุวิศวกรรม
2. กระบวนการทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืชมีกี่ขั้นตอนอะไรบ้าง

บันทึกตอบกิจกรรม 6.2.1

_____

_____

_____

_____

กิจกรรม 6.2.2

1. จงอธิบายขั้นตอนการย้ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

2. ยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก (selectable marker) ชนิดใดนิยมใช้ในการถ่ายยีน

3. ระดับความเสี่ยงของงานทดลองเพื่อการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพมีกี่ระดับ

บันทึกตอบกิจกรรม 6.2.2

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

ตอนที่ 6.3 การใช้เทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

โปรดอ่านหัวเรื่อง แนวคิด และวัตถุประสงค์ของตอนที่ 6.3 แล้วจึงศึกษารายละเอียดต่อไป

หัวเรื่อง

เรื่องที่ 6.3.1 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการสร้างพืชแฮพลอยด์

เรื่องที่ 6.3.2 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการรวมโพรโทพลาสต์

เรื่องที่ 6.3.3 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช

เรื่องที่ 6.3.4 การปรับแต่งจีโนม

แนวคิด

1. พืชแฮพลอยด์ คือ พืชที่มีโครโมโซมเพียงหนึ่งชุด ในการปรับปรุงพันธุ์พืชมีการใช้ประโยชน์จากพืชแฮพลอยด์หลายด้าน เช่น ใช้คัดเลือกลักษณะที่ต้องการ คัดเลือกลักษณะการกลายพันธุ์ ที่สำคัญคือการสร้างพืชสายพันธุ์แท้จากพืชแฮพลอยด์เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้สายพันธุ์แท้ในระยะเวลาที่เร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมตัวเองหลาย ๆ รุ่น
2. การรวมโพรโทพลาสต์ คือ การนำโพรโทพลาสต์ของพืชต่างชนิดหรือจีโนไทป์มาทำให้เกิดการหลอมรวมกัน เพื่อถ่ายทอดยีนในนิวเคลียสและ/หรือไซโตพลาสซึม สร้างลูกผสมที่มีพันธุกรรมที่แตกต่างออกไป หรือเรียกว่า somatic hybridization โดยทั่วไปมักใช้เพื่อการผสมข้ามสายพันธุ์ ชนิด หรือสกุลซึ่งมักประสบปัญหาความเข้ากันไม่ได้ของการผสมโดยอาศัยเพศ การรวมกันของโพรโทพลาสต์แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ 1) การรวมกันที่เกิดขึ้นเอง และ 2) การชักนำให้เกิดการรวมโพรโตพลาสต์
3. เครื่องหมายโมเลกุลหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอ หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซม ซึ่งสามารถบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์หรือความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต และเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดหนึ่ง สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท ได้แก่ 1) hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายที่ใช้ในระบบดั้งเดิม และ PCR-based marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่อาศัยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เครื่องหมายโมเลกุลนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์พืช การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การตรวจสอบการกลายพันธุ์ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ลูกผสมช่วงที่ 1 และการปรับปรุงพันธุ์
4. 4. การปรับแต่งจีโนม เป็นเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมโดยเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่งจำเพาะของสิ่งมีชีวิตให้คงอยู่อย่างถาวร ด้วยการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ ณ จุดที่มีลำดับเบสเป้าหมายแยกออกจากกัน เรียกว่า double-stranded brake (DSB) โดยใช้เอนไซม์ endonuclease ปกติแล้ว หากปรากฏการณ์ DSB เกิดขึ้นตามธรรมชาติและปล่อยทิ้งไว้จะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต จึงมีกลไกในการซ่อมแซม DSB เช่น Homologous

recombination-directed repair (HDR) ซึ่งนำเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปกติสอดแทรกเข้าไปทดแทนในบริเวณเป้าหมายของจีโนม ส่วน Non-homologus end joining (NHEJ) เป็นการทำให้ส่วนของดีเอนเอที่ผิดปกติหลุดออกไป และเชื่อมปลายโครโมโซมทั้ง 2 ข้างที่เหลืออยู่เข้าหากัน ทำให้ยีนที่ผิดปกติไม่สามารถแสดงออกได้อีกต่อไป

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาตอนที่ 6.3 จบแล้ว นักศึกษาสามารถ

1. อธิบายการสร้างพืชพันธุ์แท้จากแฮพลอยด์ได้
2. อธิบายการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการรวมโพรโทพลาสต์ได้
3. อธิบายการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้
4. อธิบายการปรับแต่งจีโนมได้

ตอนที่ 6.3 การใช้เทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

1. ความหมายของพืชแฮพลอยด์

พืชแฮพลอยด์ (haploid plant) หมายถึง พืชที่มีโครโมโซมภายในเซลล์เพียงชุดเดียว (n) ขณะที่พืชทั่วไปมีโครโมโซม 2 ชุด (2n) ดังนั้น พืชแฮพลอยด์จึงมีจำนวนโครโมโซมครึ่งหนึ่งของจำนวนโครโมโซมของพืชทั่วไป พืชแฮพลอยด์อาจพัฒนามาจากเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ หรือเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งได้แก่ ละอองเกสรเพศผู้ หรือจากไข่ พืชแฮพลอยด์ที่พบในธรรมชาติมีหลายชนิด เช่น ฝ้าย มะเขือเทศ มันฝรั่ง ถั่วเหลือง ยาสูบ ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ เป็นต้น

2. การใช้เทคโนโลยีดับเบิลแฮพลอยด์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีดับเบิลแฮพลอยด์ มีขั้นตอนดังภาพที่ 6.4 ดังนี้

2.1 สร้างพืชแฮพลอยด์ การสร้างพืชแฮพลอยด์มีวิธีย่อย ๆ หลายวิธี ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

2.1.1 สร้างในห้องปฏิบัติการ ทำโดยการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (ละอองเกสรเพศผู้ หรืออับละอองเกสรเพศผู้) หรือเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ไข่หรือรังไข่) ในห้องปฏิบัติการโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อเซลล์ดังกล่าวพัฒนาไปเป็นต้นพืชก็จะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว

2.1.2 สร้างในแปลงเพาะปลูก การสร้างพืชแฮพลอยด์โดยการผสมพันธุ์ในแปลงเพาะปลูก โดยอาจทำโดยการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิด (interspecific cross) การผสมโดยใช้เกสรเพศผู้ที่ถูกฉายรังสี (irradiated pollen) หรือ การผสมพันธุ์โดยใช้พันธุ์ชักนำให้เกิดแฮพลอยด์ (haploid inducer line) เป็นพ่อ

2.2 ชักนำให้พืชแฮพลอยด์กลายเป็นพืชดับเบิลแฮพลอยด์ โดยการให้สารโคลชิซินแก่พืช

2.3 คัดเลือกพันธุ์ โดยคัดเลือกพันธุ์ให้ได้พันธุ์ดี

3. การปรับปรุงพันธุ์พืชบางชนิดโดยการสร้างพืชแฮพลอยด์เพื่อชักนำให้เกิดพืชดับเบิลแฮพลอยด์

ในที่นี้จะกล่าวถึงการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการสร้างพืชแฮพลอยด์ด้วยวิธีต่างๆ 3 วิธี คือ

3.1 การเพาะเลี้ยงอับเกสรเพศผู้ หรือละอองเกสรเพศผู้

3.2 การใช้พันธุ์ชักนำให้เกิดแฮพลอยด์

3.3 การผสมข้ามชนิด

4. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการรวมโพรโทพลาสต์

โพรโตพลาสต์เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เซลล์ไร้ผนัง เป็นเซลล์พืชที่ปราศจากผนังเซลล์ (cell wall) เทคโนโลยีของการใช้เซลล์ไร้ผนังมีหลายวิธี เช่น การรวมเซลล์ต้นพืช (somatic hybridization) การรวมไซโตพลาสซึม (cybridization) และการย้ายยีนโดยตรง (gene transfer) ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของงานและพืชที่ต้องการพัฒนาพันธุ์ การย้ายยีนอาจทำได้โดยการรวมเซลล์ไร้ผนัง หรือการย้ายยีนโดยตรงผ่านเซลล์ไร้ผนัง

4.1. การรวมเซลล์ไร้ผนัง การรวมเซลล์ไร้ผนัง (protoplast fusion) คือ การสร้างลูกผสมโดยการผสมพันธุ์เกิดขึ้นในพืชที่อยู่ในชนิด (species) เดียวกันหรือใกล้เคียงกันเท่านั้น ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้มีข้อจำกัดอยู่มาก นอกจากนี้ยังมีปัญหาเกี่ยวกับการผสมไม่ติด (incompatibility) ในการผสมพันธุ์พืชอีกด้วย

4.2 ขั้นตอนการย้ายยีนโดยการรวมเซลล์ไร้ผนัง การย้ายยีนโดยการรวมเซลล์ไร้ผนังสามารถแยกเป็นขั้นตอนย่อยได้ดังนี้คือ 1) การแยกเซลล์ไร้ผนัง 2) การรวมเซลล์ไร้ผนัง และ 3) การคัดเลือกเซลล์ไร้ผนังลูกผสมและการเหนี่ยวนำให้เกิดต้นพืช

5. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่าง (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นหมายถึง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) หรือแบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ นั่นเอง สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่าง (polymorphism) ของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ Hybridization-based marker และ PCR-based marker

6. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช

6.1 การจำแนกสายพันธุ์พืช (varietal identification) หรือความบริสุทธิ์ของพันธุ์พืช

6.2การบอกระดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของแต่ละกลุ่มประชากรเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช (genetic diversity)

6.3 การสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic linkage map construction)

6.4การหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ (gene mapping) และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก (marker assisted selection หรือ MAS) เป็นต้น

7. **การปรับแต่งจีโนม**

เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมเป็นเทคโนโลยีในการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่งจำเพาะของสิ่งมีชีวิตให้คงอยู่อย่างถาวรด้วยการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ ณ จุดที่มีลำดับเบสเป้าหมายแยกออกจากกัน เรียกว่า Double-Stranded Brake: DSB โดยใช้เอนไซม์ Endonuclease โดยทั่วไปหากปรากฏการณ์ DSB เกิดขึ้นตามธรรมชาติและปล่อยทิ้งไว้จะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต จึงมีกลไกในการซ่อมแซม DSB เช่น

3.1 Homologous Recombination-Directed Repair หรือ Homology-Directed Repair: HDR ซึ่งนำเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปกติสอดแทรกเข้าไปทดแทนในบริเวณเป้าหมายของจีโนม

3.2 Non-Homologous End Joining: NHEJ เป็นการทำให้ส่วนของดีเอ็นเอที่ผิดปกติหลุดออกไป แล้วเชื่อมปลายโครโมโซมทั้ง 2 ข้างที่เหลืออยู่เข้าหากัน ทำให้ยีนที่ผิดปกติไม่สามารถแสดงออกได้อีกต่อไป เรียกว่า gene knockout

เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมที่ได้รับการพัฒนาในปัจจุบันส่วนใหญ่ใช้เอนไซม์ที่เรียกว่า programmable nuclease ซึ่งมีหลายชนิด เช่น meganuclease, zinc finger nuclease, TALEN, CRISPR เป็นต้น

กิจกรรม 6.3.1

1. พืชแฮพลอยด์มีความสำคัญอย่างไร
2. เทคนิคที่ช่วยในการรวมเซลล์ไร้ผนังมีอะไรบ้าง

บันทึกตอบกิจกรรม 6.3.1

_____

_____

_____

_____

_____

กิจกรรมที่ 6.3.2

1. จงอธิบายความหมายคำว่าเครื่องหมายโมเลกุลหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers)
2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (PCR-based marker) ที่นิยม ใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชได้แก่อะไรบ้าง
3. จงอธิบายเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม

บันทึกตอบกิจกรรม 6.3.2

_____

_____

_____

_____

_____

แนวตอบกิจกรรมหน่วยที่ 6 การการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

ตอนที่ 6.1 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

แนวตอบกิจกรรม 6 .1.1

1.เทคโนโลยีที่นำความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิต หรือส่วนต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ผลผลิต รวมถึงอนุพันธ์ของสิ่งมีชีวิต เช่น เอนไซม์ โปรตีน มาพัฒนาปรับปรุงเพื่อใช้ประโยชน์ตามที่ต้องการ เช่น ด้านการเกษตร อาหาร สิ่งแวดล้อม และทางการแพทย์ เป็นต้น

2. เทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ 1) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 2) พันธุวิศวกรรม 3) การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 4) การปรับแต่งจีโนม

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ดังนี้

1. การเก็บรักษาและแลกเปลี่ยนพันธุกรรมพืชระหว่างประเทศ
2. การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม
3. การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ
4. การคัดเลือกพืชที่มีลักษณะทนทานต่อสภาพแวดล้อม
5. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและละอองเกสรพืช
6. การรวมโปรโตพลาสต์
7. การสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม

6.2 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยพันธุวิศวกรรม

แนวตอบกิจกรรม 6.2.1

1. เทคนิคหรือกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยนำดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดมาต่อเข้าด้วยกันเป็นดีเอ็นเอสายผสมที่ เรียกว่า รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลักษณะตามต้องการ หรือเพื่อผลิตโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เป็นผลิตผลจากยีน โดยที่กระบวนการดังกล่าวไม่ได้เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

2. กระบวนการพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืชมี 6 ขั้นตอน 1) คัดเลือกยีนควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม 2) เพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการหรือตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3) สร้างกรดนิวคลีอิกลูกผสม 4) ย้ายยีนเข้าสู่พืช 5) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อและคัดเลือกต้นที่เจริญจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน 6) ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้นพืชที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว

แนวตอบกิจกรรม 6.2.2

1.ขั้นตอนการย้ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมประกอบไปด้วย 1) เตรียมชิ้นส่วนพืช 2) เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มียีนเป้าหมายต้องการถ่ายฝากเข้าสู่พืช 3) ย้ายชิ้นส่วนพืชวางบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรียม 4) ย้ายชิ้นส่วนพืชจากบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. ยีนต้านทานสารไอโกรมัยซิน (hygromycin: hpt II) ยีนเบตา-กลูคูโรนิเดส (β-glucuronidase: gus) คานามัยซิน (kanamycin)

3. ระดับความเสี่ยงของงานทดลองเพื่อการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพแบ่งได้เป็น 4 ระดับ ได้แก่

Bio-safety Level 1 (BLB 1)

Bio-safety Level 2 (BLB 2)

Bio-safety Level 3 (BLB 3)

Bio-safety Level 4 (BLB 4)

แนวตอบกิจกรรม 11.2.3

1.วิธีการขยายพันธุ์โดยอาศัยต้นตอมีข้อดี คือ ต้นส้มมีคุณสมบัติตรงตามพันธุ์ทุกประการ มีหนามน้อย สามารถให้ดอกออกผลเร็วประมาณ 3ปี ลักษระทรงพุ่มแผ่ทางด้านข้าง และทนต่อโรคทางระบบรากได้

2. การติดตาส้มโดยทั่วไปใช้วิธีติดตาแบบตัว-ที และตัว-ทีแบบหัวกลับ ซึ่งนิยมใช้วิธีหลังนี้ในฤดูฝน เพื่อป้องกันน้ำซึมเข้าบริเวณรอยแผล

ตอนที่ 6.3 การใช้เทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

แนวตอบกิจกรรม 6.3.1

1. พืชแฮพลอยด์มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ดังนี้

1.1 สร้างพืชสายพันธุ์แท้ วิธีการนี้จะทำให้นักปรับปรุงพันธุ์ได้สายพันธุ์แท้เร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์แท้แบบมาตรฐาน 2-3 เท่า

1.2 คัดเลือกลักษณะที่ต้องการ เนื่องจากแฮพลอยด์มีโครโมโซมชุดเดียวแต่ละตำแหน่งของยีนมีเพียง 1 อัลลีล ทำให้มีการแสดงออกของของลักษณะต่าง ๆ ทำให้สามารถประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชได้ และคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้

2. เทคนิคที่ช่วยในการรวมเซลล์ไร้ผนังมี 2 วิธีคือ 1) การรวมเซลล์ไร้ผนังโดยใช้สารเคมี เช่น แคลเซียมอิออนบับเฟอร์ที่มีความเป็นด่างสูง (high pH/Ca 2+) โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) (PEC) และ 2) การรวมเซลล์ไร้ผนังโดยใช้กระแสไฟฟ้า

แนวตอบกิจกรรม 6.3.2

1. เครื่องหมายโมเลกุลหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอ หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซม ซึ่งสามารถบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์หรือความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต และเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดหนึ่ง
2. 1) เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) 2) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) และ 3) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ เป็นต้น
3. เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมเป็นเทคโนโลยีในการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่งจำเพาะของสิ่งมีชีวิตให้คงอยู่อย่างถาวร ด้วยการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ ณ จุดที่มีลำดับเบสเป้าหมายแยกออกจากกัน

แบบประเมินผลตนเองหลังเรียน หน่วยที่ 6

วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินความก้าวหน้าในการเรียนรู้ของนักศึกษาเกี่ยวกับเรื่อง“การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ”

คำแนะนำ ขอให้นักศึกษาอ่านคำถามแล้วเขียนวงกลมล้อมรอบข้อคำตอบที่ถูกต้องที่สุด

---

1. ข้อใดคือเทคโนโลยีชีวภาพที่มีการใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช
   ก. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการเพิ่มจำนวนต้นพืช
   ข. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจสอบความใกล้ชิดกันของพืช
   ค. การใช้เทคโนโลยีในการตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรม
   ง. การใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายปลดปล่อยธาตุอาหาร
   จ. ถูกทุกข้อ
2. การสร้างพืชแฮพลอยด์สามารถทำได้โดยวิธีใด
   ก. ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์
   ข. นำต้นพืชไปแช่สารโคลชิซีน
   ค. การเพาะเลี้ยงละอองเกสร
   ง. การนำละอองเกสรไปฉายรังสี
   จ. การรวมโพรโตพลาสต์
3. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรมมีข้อดีอย่างไร
   ก. ลดปัญหาการเข้าคู่กันไม่ได้ของยีน
   ข. ได้พืชที่มีลักษณะตามที่ต้องการ
   ค. พืชที่ได้มีความต้านทานต่อโรคและแมลง
   ง. ได้ผลผลิตมากกว่าพืชปกติถึงสามเท่า
   จ. ได้พืชที่มีลักษณะตามต้องการในระยะเวลาอันรวดเร็ว
4. การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายสำหรับการโคลนยีนสามารถทำได้อย่างไร
   ก. ปล่อยให้เซลล์เจริญในอาหารสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณ
   ข. ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์
   ค. ใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์
   ง. ย้ายยีนลงในพืชจำนวนหลายๆ ต้น
   จ. ถูกทุกข้อ
5. ข้อใดต่อไปนี้เป็นข้อกังวลของพืชดัดแปรพันธุกรรม
   ก. การดื้อยา
   ข. การปนเปื้อนของละอองเกสร
   ค. ความปลอดภัยของอาหาร
   ง. การเกิดภูมิแพ้
   จ. ถูกทุกข้อ
6. ข้อใด**ไม่**ถูกต้องเกี่ยวกับการนำเข้าพืชดัดแปรพันธุกรรมของประเทศไทย
   ก. สามารถนำเข้าเพื่อการศึกษาวิจัยได้
   ข. สามารถนำเข้าเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ได้
   ค. สามารถนำเข้าเพื่อใช้เป็นเครื่องนุ่งห่มได้
   ง. สามารถนำเข้าเพื่อปลูกเป็นการค้าได้
   จ. สามารถนำเข้าเพื่อใช้แปรรูปได้
7. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้พืชแฮพลอยด์มีข้อดีอย่างไร
   ก. พืชที่มีโครโมโซมภายในเซลล์เพียงชุดเดียว
   ข. พืชที่ได้มีความทนทานสูง
   ค. ได้พืชสายพันธุ์แท้ในระยะเวลาที่รวดเร็ว
   ง. ประหยัดงบประมาณในการผลิต
   จ. พืชที่ได้จะมีความแข็งแรงมากกว่าพืชปกติ
8. เซลล์ไร้ผนังคืออะไร
   ก. เซลล์ที่เหมาะกับการนำมาปรับปรุงพันธุ์พืช
   ข. เซลล์พืชที่ไม่มีผนังเซลล์
   ค. เซลล์แบคทีเรียที่นำมาใช้ถ่ายยีน
   ง. เซลล์สัตว์ที่นำมาใช้ทดลองถ่ายยีน
   จ. เซลล์พืชที่ผ่านการรวมกันของพืช 2 ชนิด
9. เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทใดที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ
   ก. อาร์เอพีดี
   ข. เอเอฟแอลพี
   ค. ไมโครแซทเทลไลท์
   ง. ไฮบริไดเซชั่น เบส มาร์คเกอร์
   จ. เทนเดมรีพีท
10. การปรับแต่งจีโนมคืออะไร
   ก. การถ่ายยีนวิธีหนึ่ง
   ข. การนำยีนที่ต้องการใส่ไปในพืชเป้าหมาย
   ค. การเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมที่ตำแหน่งจำเพาะ
   ง. การใช้เอนไซม์ย่อยรหัสพันธุกรรม
   จ. การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ดีขึ้นโดยการปรับชุดจีโนม

เฉลยแบบประเมินผลตนเองหน่วยที่ 6

ก่อนเรียน	หลังเรียน
1. ค	1. ข
2. ค	2. ค
3. ง	3. ก
4. ง	4. ข
5. ข	5. จ
6. ข	6. ง
7. ก	7. ค
8. ง	8. ข
9. จ	9. ข
10. จ	10. ค

บรรณานุกรม

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ (2557) พันธุวิศวกรรม: เทคโนโลยีของยีน กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 427 หน้า

ชยาพร วัฒนศิริ จารุวรรณ จาติเสถียร (2539) การใช้เซลล์พันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืช ใน *เอกสารการสอนชุดวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชและการขยายพันธุ์พืช หน่วยที่ 1-7* (น.303 - 367). นนทบุรี: สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

ชนากานต์ ลักษณะ (ม.ป.ป.) เทคโนโลยีชีวภาพกับการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยบูรพา. สืบค้นเมื่อ 19 มกราคม พ.ศ. 2563 จาก http://agri-tech.sakaeo.buu.ac.th/images/imagenews/Aril2559/เทคโนโลยชวภาพกบการเกบรกษาพนธกรรมพช.pdf

ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ (2552) สิ่งมีชีวติดัดแปลงพันธุกรรมและผลกระทบ สืบค้นเมื่อ 3 กันยายน พ.ศ. 2562 จาก http://www.e-manage.mju.ac.th/openFile.aspx?id=NTg5NDE=

บุญหงษ์ จงคิด (2548) หลักและเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, 186 หน้า

เทคโนโลยีการโคลนยีนพืช สืบค้นเมื่อ 3 กันยายน พ.ศ. 2562 จาก http://conf.agi.nu.ac.th/webnewasp/ereading/gene/gene.pdf

พิทักษ์ ใจคง (2553) การเกษตรเบื้องต้น (ภาคการปรับปรุงพันธุ์พืช) บทที่ 11 การส่งถ่ายยีนสู่พืชกับการปรับปรุงพันธุ์พืช มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ หน้า 313-360

นันท์ชนก วงษ์สมุทร์ (2561) พืชจีเอ็มโอ ต่างจาก พืช“ปรับแก้จีโนม” อย่างไรสืบค้นเมื่อ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2562 จากhttps://www.bbc.com/thai/thailand-45720570

เบญจวรรณ ฤกษเกษม (2548) พืชตัดแตงพันธุกรรม (จีเอ็มโอ) กับสิ่งแวดล้อม สถาบันวิจัยสังคม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 49 หน้า

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2543) พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 282 หน้า

สุรีพร เกตุงาม (2546) เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุพืช วารสารวิชาการ ม.อบ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปที่ 5 ฉบับที่ 2 หน้า 37-59

ศฎาวุฒิ กุลมณี, ประภา ศรีพิจิตต์, สุจินต์ เจนวีรวัฒน์, รัตติกาน เกิดผล และธานี ศรีวงศ์ชัย (2560). การพัฒนาสายพันธุ์แท้ข้าวโพดโดยวิธีดับเบิ้ลแฮพลอยด์จากประชากร S_0 และ S_1. ว.วิทย. กษ. 48(2):260-269.

ศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ (2561) พันธุวิศวกรรมขั้นสูง ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 247 หน้า

สุชาต อุดมโสภกิจ (2562) การปรับแต่งจีโนม (Genome editing) เพื่อการบำบัด สืบค้นเมื่อ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2562 จากhttps://www.tpa.or.th/publisher/pdfFileDownloadS/tn247_p10-14.pdf

สร้อยศิริ มุ่งพยาบาล (2555) ผลกระทบของเทคโนโลยีอาหารจีเอ็มโอ วิทยานิพนธ์ หลักสูตรศิบลปศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และอัจฉรา จดากร. (2559). หน่วยที่ 12 เทคโนโลยีชีวภาพและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใน *เอกสารการสอนชุดวิชาวิทยาศาสตร์เพื่อการผลิตพืช หน่วยที่ 8-15* (น. 12-1 -12-60). นนทบุรี: สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

หัทยา กาวีวงศ์ (2548) อณูพันธุศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 312 หน้า

Avichal blog. (2016). With the help of suitable examples describe how the gene transfer method and production of transgenic plant save help in increasing quality and yield in crop plant? Retrieved from http://gkgsboss.blogspot.com/2016/07/q-with-help-of-suitable-examples.html

Brown.,T. A. (2016) Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction, 7th Edition. Wiley-Blackwell, 376 pp

Barrangou, R. and Doudna., J.A., (2016). "Applications of CRISPR Technologies in Research and beyond." Nature Biotechnology 34(9): 933–41.

Depicker, A., De Loose, M. and Van Bockstaele, E. (1994). THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY IN PLANT BREEDING. Acta Hortic. 355, 195-208 DOI: 10.17660/ActaHortic.1994.355.21

George Acquaah (2012) Principles of Plant Genetics and Breeding. Second Edition, Wiley-Blackwell. USA 740 pp.

ISAAA. (2014) Agricultural biotechnology (a lot more than just GM Crops) Biotech information series: 1

ISAAA. (2017) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY.

George Acquaah. (2012). Principles of plant genetics and breeding. Wiley-Blackwell.

Gleba.,Y. Y., Sytnik., K. M., (1984) Protoplast Fusion: Genetic Engineering in Higher Plants (Monographs on Theoretical and Applied Genetics), Springer, Germany, 222 pp

Laurin M. Gilles, Jean-Pierre Martinant, Peter M. Rogowsky and Thomas Widiez. (2017). Quick Guide Haploid Induction Plants. Current Biology Magazine 27, R1089-R1107. October 23, 2017.

Masaki Yahata and Hisato Kunitake. (2019). Flowering and Fruiting Haploid and double haploid Pummelos *in Citus-Health and production technology*. In Citrus - Health Benefits and Production Technology.

Mathur,V., Javid, L., Kulshrestha, S., Mandal, A., and Amarender A. Reddy (2017) Chapter 2 World Cultivation of Genetically Modified Crops: Opportunities and Risks, World cultivation of genetically modified crop: opportunities and risks, Springer International Publishing, 45-87 p

Montree Kongdang. (2020). Double Haploid in Corn Breeding Program. Pacific Seeds (Thai) Ltd.