



เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การประเมินความปลอดภัย การตรวจสอบ และกำกับดูแล

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 2565

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การประเมิน ความปลอดภัย การตรวจสอบ และการกำกับดูแล

ข้อมูลทางบรรณานุกรม

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร. เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การประเมินความปลอดภัย
การตรวจสอบ และการกำกับดูแล. E-book (online). กรุงเทพฯ: 2565. 115 หน้า.

ที่ปรึกษา	นางปิยรัตน์	ธรรมกิจวัฒน์	ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะผู้จัดทำ	น.ส. รุ่งนภา	พิทักษ์ตันสกุล	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
	นายพงศกร	สรวิทยากุล	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
	น.ส.ปิยนุช	ศรชัย	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
	น.ส.ฐิติรัตน์	อัครมงคลศิริ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
	นายวิระศักดิ์	พิทักษ์ศฤงคาร	นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ
	น.ส.ศุภรัตน์	ศรีทะวงษ์	นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ

เผยแพร่ครั้งแรก	: กันยายน 2565
แหล่งเผยแพร่	: E-book (online) : กรมวิชาการเกษตร (คลังเอกสารความรู้) Website https://www.doa.go.th/share/ : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (การจัดการความรู้: KM Learning) Website https://www.doa.go.th/biotech/
จัดทำและเผยแพร่	: กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ถนนพหลโยธิน 50 แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2579-1533-5 โทรสาร 0-2579-1533

คำนำ

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ (Modern biotechnology) เริ่มเป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวางไปทั่วโลก เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทั้งด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตร เช่น วัคซีนโควิด-19 ชนิดสารพันธุกรรม (mRNA vaccine) จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถผลิตเอนไซม์เชิงอุตสาหกรรม พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่เพิ่มผลผลิต ทนทานต่อโรค และแมลง เป็นต้น โดยเป็นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีตามการเปลี่ยนแปลงของโลก เพื่อให้สอดคล้องกับการสร้างเสริมสุขภาพที่แข็งแรง และมีความมั่นคงทางอาหาร (Food security) ให้ทุกคนสามารถเข้าถึงอาหารที่เพียงพอ ปลอดภัย มีคุณค่าทางโภชนาการ และมีเสถียรภาพ

การจัดทำหนังสือ “เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การประเมินความปลอดภัย การตรวจสอบ และการกำกับดูแล” เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการความรู้ (Knowledge management) โดยได้มีการรวบรวมองค์ความรู้และประสบการณ์ในการปฏิบัติงาน มาเรียบเรียงเป็นเอกสารวิชาการ เพื่อเป็นแหล่งความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรสมัยใหม่ให้แก่บุคลากรในหน่วยงานและผู้ที่เกี่ยวข้อง โดยได้กล่าวถึงหลักการของเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรในเรื่องพืชดัดแปลงพันธุกรรม เทคโนโลยีการแก้ไขจีโนม และแสดงให้เห็นถึงสถานะภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมทั่วโลก พร้อมทั้งได้อธิบายว่าเราสามารถตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ได้อย่างไร นอกจากนี้ยังได้ทราบถึงการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพก่อนที่พืชดัดแปลงพันธุกรรมจะถูกนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

โดยการจัดทำนี้ได้รับความร่วมมือจากบุคลากรกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ในการจัดทำเรียบเรียงจนเอกสารคู่มือนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี อย่างไรก็ตามหากมีข้อเสนอแนะ ทางคณะทำงานฯ ยินดีน้อมรับเพื่อนำไปปรับปรุงผลงานในครั้งต่อไปให้ดียิ่งขึ้น

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

กันยายน 2565

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ง-ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ช-ฉ
บทที่ 1 เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่: พืชดัดแปลงพันธุกรรม	1
1. พันธุวิศวกรรมและพืชดัดแปลงพันธุกรรม	3
1.1 การพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรม	3
2. คุณลักษณะที่ได้รับส่งถ่ายยีน เพื่อสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม	7
2.1 ความต้านทานแมลงและศัตรูพืช	7
2.2 เทคโนโลยีความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช: ไกลโฟเซต และ กลูโฟซิเนต	9
2.3 เทคโนโลยีการทำให้สุกช้า	11
3. ศักยภาพการใช้ประโยชน์จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม	13
เอกสารอ้างอิง	14
บทที่ 2 เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่: พืชปรับแต่งจีโนม	15
1. บทนำ	16
2. เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม (Genome editing)	17
2.1 รูปแบบการปรับแต่งยีนเป้าหมายและการควบคุมกำกับดูแล	18
3. กลไกการทำงานของระบบ ZFNs	19
3.1 การประยุกต์ใช้ ระบบ ZFNs ในการปรับปรุงพันธุ์พืช	20
4. กลไกการทำงานของระบบ TALENs	21
4.1 การประยุกต์ใช้ระบบ TALENs ในการปรับปรุงพันธุ์พืช	22
5. กลไกการทำงานของระบบ CRISPR-Cas9	24
5.1 การประยุกต์ใช้ระบบ CRISPR-Cas9 ในการปรับปรุงพันธุ์พืช	26
6. การขนส่งถ่ายยีนในระบบการแก้ไขจีโนมเข้าสู่เซลล์พืช	29
เอกสารอ้างอิง	29
บทที่ 3 สถานภาพของพืชที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่	32
1. พืชดัดแปลงพันธุกรรม	32
2. คุณลักษณะของพืชดัดแปลงพันธุกรรมสำหรับทางการค้า	33
3. การปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมทั่วโลก	35
3.1 พืชดัดแปลงพันธุกรรมในแอฟริกา	43
3.2 พืชดัดแปลงพันธุกรรมในเอเชีย-แปซิฟิก	45
3.3 พืชดัดแปลงพันธุกรรมในแคนาดาและสหรัฐอเมริกา	48

3.4	พืชดัดแปลงพันธุกรรมในยุโรป	49
3.5	พืชดัดแปลงพันธุกรรมในละตินอเมริกา	51
	เอกสารอ้างอิง	54
บทที่ 4	การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่	96
1.	การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในพืชดัดแปลงพันธุกรรม	57
1.1.	การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อม	57
1.2.	การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหาร	58
3.	องค์ประกอบสำหรับการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ	59
3.1	ระดับประเภทของการวิจัยและทดลองเกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่	59
3.2	ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ	61
3.3	ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของโรงงาน	62
4.	การประเมินความเสี่ยง (Risk assessment)	64
4.1.	การเสถียรของยีน และความเสถียร	64
	ในการแสดงออกของยีนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม	
4.2	การถ่ายทอดยีน (Gene flow) ระหว่างพืชดัดแปลงพันธุกรรมสู่ระบบนิเวศ	64
4.3	ศึกษาผลกระทบของพืชดัดแปลงพันธุกรรมต่อระบบนิเวศ	66
5.	การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในพืชที่ได้รับการปรับแต่งจีโนม	67
6.	การกำกับดูแลพืชดัดแปลงพันธุกรรมในระดับสากลและในประเทศไทย	69
	เอกสารอ้างอิง	72
บทที่ 5	การตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025	76
1.	กฎระเบียบที่เกี่ยวข้องกับสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม	77
2.	หลักการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม	81
2.1	การตรวจหาโปรตีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรม	82
2.2	การตรวจหาดีเอ็นเอในพืชดัดแปลงพันธุกรรม	83
3.	ขั้นตอนการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม	84
3.1	การสุ่มตัวอย่าง	84
3.2	การเตรียมตัวอย่าง	86
3.3	การสกัดดีเอ็นเอ	88
3.4	การวัดและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ	91
3.5	การตรวจสอบยีนดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพ	95
3.6	การประกันคุณภาพในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม	104

6. การอ่านและตีความใบรายงานผลการทดสอบพืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม	109
เอกสารอ้างอิง	111

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ลักษณะสำคัญทางการเกษตรที่ได้รับการปรับแต่งของพืชดัดแปลงพันธุกรรม	34
ตารางที่ 3.2 ประเทศที่ได้รับอนุมัติให้มีการนำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม มีทั้งหมด 541 events ทั้งหมด 45 ประเทศ	38
ตารางที่ 4.1 การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในพืชที่ได้รับการปรับแต่งจีโนม	67
ตารางที่ 4.2 อาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาจากเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม แต่ละประเภทมีเกณฑ์การประเมิน	68
ตารางที่ 5.1 สรุปการเตรียมตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์	86
ตารางที่ 5.2 แสดงสารเคมี และไพรเมอร์สำหรับการตรวจจำแนกยีน <i>Lectin</i> และ <i>Papain</i> ด้วยเทคนิค PCR	98
ตารางที่ 5.3 สภาวะการทำงานการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม สำหรับการตรวจจำแนกยีน <i>Lectin</i> ด้วยเทคนิค PCR	98
ตารางที่ 5.4 แสดงสารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา Real-time PCR โดยการตรวจยีน <i>CaMV35S promoter Nos terminator</i> และ <i>Endogenous gene</i> ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR	102
ตารางที่ 5.5 สภาวะการทำงานการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับการตรวจ ยีน <i>CaMV35S promoter, Nos terminator</i> และ <i>Endogenous gene</i> ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR	102
ตารางที่ 5.6 การเปรียบเทียบความแตกต่างของประเภทการวิเคราะห์	107

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1.1 การโคลนยีน (Gene cloning)	4
ภาพที่ 1.2 โครงสร้างยีนและองค์ประกอบของยีน ที่ใช้ในการพัฒนาข้าวสีทอง	5
ภาพที่ 1.3 วิธีการส่งถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมพืชโดยตรง ด้วยเครื่องยิงอนุภาค (Particle bombardment) โดยการใช้ gene gun และ การส่งถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
ภาพที่ 2.1 การปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม การปรับปรุงพันธุ์แบบการกระตุ้นการกลายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์แบบการฉายฝากยีน และการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการปรับแต่งจีโนม	17
ภาพที่ 2.2 รูปแบบการปรับแต่งยีนเป้าหมาย แบบ Site-directed nucleases1-3	18
ภาพที่ 2.3 กลไกการทำงานของระบบ ZFNs	19
ภาพที่ 2.4 การปรับแต่งยีน <i>ZmIPK1</i> ในข้าวโพดด้วย ZFNs	20
ภาพที่ 2.5 การเพิ่มยีน <i>AAD1</i> และ <i>PAT</i> ในข้าวโพดเพื่อให้เกิดลักษณะการต้านทานสารกำจัดวัชพืชด้วย ZFNs	21
ภาพที่ 2.6 กลไกการทำงานของระบบ TALENs	21
ภาพที่ 2.7 การปรับแต่งยีน <i>OsSWEET14</i> เพื่อให้ต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคในข้าวด้วยเทคนิค TALENs	22
ภาพที่ 2.8 การปรับแต่งยีน <i>FAD2-1A</i> และ <i>FAD2-1B</i> ในถั่วเหลืองด้วย TALENs	23
ภาพที่ 2.9 การปรับแต่งยีน <i>ANT1</i> ในมะเขือเทศให้ได้มะเขือเทศสีม่วงด้วยเทคนิค TALENs	24
ภาพที่ 2.10 กลไกและระบบการทำงานของ CRISPR-Cas9	25
ภาพที่ 2.11 การปรับแต่งยีนในข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วย CRISPR-Cas9	26
ภาพที่ 2.12 การปรับแต่งยีน <i>TaGW2</i> ในข้าวสาลีเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำหนักร่อกและโปรตีนด้วย CRISPR-Cas9	27
ภาพที่ 2.13 การปรับแต่งยีน <i>SP5G</i> ในมะเขือเทศควบคุมการออกดอกด้วย CRISPR-Cas9	27
ภาพที่ 2.14 การปรับแต่งยีนในการสร้างพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตด้วย CRISPR-Cas9	28
ภาพที่ 2.15 การปรับปรุงพันธุ์แตงกวาต้านทานต่อไวรัสด้วย CRISPR-Cas9	28
ภาพที่ 3.1 ประโยชน์ของพืชดัดแปลงพันธุกรรม ต่อภาคการเกษตรและสิ่งแวดล้อม	33
ภาพที่ 3.2 พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปลูกมากที่สุด 4 อันดับ	35
ภาพที่ 3.3 ประเทศที่มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมทั่วโลก มีทั้งหมด 32 พืช จำนวน 45 ประเทศ	36
ภาพที่ 4.1 กลไกการกำกับดูแลงานวิจัยทั้ง 4 ประเภท	61
ภาพที่ 4.2 ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ ระดับที่ 1 -4	62
ภาพที่ 5.1 แสดงหลักในการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรม	80

ภาพที่ 5.2 การตรวจหาโปรตีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay ในรูปแบบต่าง ๆ	81
ภาพที่ 5.3 หลักการตรวจหาดีเอ็นเอในพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time PCR	83
ภาพที่ 5.4 แสดงขั้นตอนในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม	84
ภาพที่ 5.5 แสดงความแตกต่างของกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ	90
ภาพที่ 5.6 แสดงตัวอย่างผลทดสอบการปนื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาในการตรวจยีน <i>Lectin</i> ของวัสดุอ้างอิงรับรองถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ GTS 40-3-2 เมื่อสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Lysis buffer	92
ภาพที่ 5.7 ตัวอย่างการแทรกยีนดัดแปลงพันธุกรรมอย่างง่าย	95
ภาพที่ 5.8 กระบวนการตรวจยีนเชิงคุณภาพด้วยวิธี PCR และ agarose gel electrophoresis	97
ภาพที่ 5.9 แสดงการตรวจยีน <i>Lectin</i> จากเมล็ดถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 50 ng/ μ l โดยวิธี PCR ด้วย Gel electrophoresis	99
ภาพที่ 5.10 หลักการทำงานของเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ Hydrolysis probe	101
ภาพที่ 5.11 ตัวอย่างและองค์ประกอบของใบรายงานผลการทดสอบพืช และสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม	109



บทที่ 1

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่: พืชดัดแปลงพันธุกรรม (GMOs)

เรียบเรียงโดย ศุภรัตน์ ศรีทะวงษ์

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร 2565

บทนำ สิ่งมีชีวิตทุกชนิดสามารถเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม (Genetic variation) เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ตามทางธรรมชาติ อย่างไรก็ตามวิวัฒนาการดังกล่าวต้องใช้เวลาหลายร้อยปีในการเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม ที่สามารถส่งผลให้เกิดลักษณะใหม่ จึงทำให้มนุษย์ได้เรียนรู้วิธีการปลูกและเพาะพันธุ์พืชเพื่อพัฒนาพืชผลให้มีลักษณะที่ต้องการโดยใช้วิธีการต่าง ๆ รวมถึงเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ (Modern biotechnology) หมายถึง กระบวนการใช้เทคนิคการดัดแปลงพันธุกรรม (In vitro) หรือในสภาพของห้องปฏิบัติการ รวมถึงการตัดต่อสารพันธุกรรม หรือการใช้สารพันธุกรรมลูกผสม หรือ การใส่กรดนิวคลีอิกเข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งข้ามขอบเขตของการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ และไม่ได้ใช้เทคนิคในการขยายพันธุ์หรือคัดเลือกพันธุ์แบบดั้งเดิม (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 2559)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) เป็นเทคโนโลยีที่ใช้ในการดัดแปลงพันธุกรรม หรือการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อนำสารพันธุกรรม (ยีน) ที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการถ่ายเข้าสู่เซลล์สิ่งมีชีวิตที่ต้องการดัดแปลงพันธุกรรม ในกรณีที่เป็นพืช เรียกว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรม (Plant Genetically Modified Organism) หรือพืชจีเอ็ม (GMOs) ซึ่งจะพุดถึงในรายละเอียดในลำดับต่อไป

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม (Genome editing) เป็นเทคนิคใหม่ที่น่าสนใจในการปรับแต่งยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจีโนมได้อย่างแม่นยำ โดยใช้เอนไซม์นิวคลีเอสที่ได้ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม ทำให้เกิดการเติม ตัด และเปลี่ยนลำดับเบสของยีนที่ต้องการในจีโนม ทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชทำได้รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น เรียกพืชที่ได้จากเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม ว่า พืชที่ได้จากการปรับแต่งจีโนม (Plant Genome Edited Organism) หรือ พืชจีอี (GE) ซึ่งจะกล่าวในบทถัดไป



1. พันธุวิศวกรรมและพืชดัดแปลงพันธุกรรม

(Genetic Engineering and GMO Crops)

ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรได้พัฒนาอย่างรวดเร็ว หนึ่งในเครื่องมือของเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร (Agricultural biotechnology) ที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) ได้แก่ เทคโนโลยีดีเอ็นเอลูกผสม (Recombinant DNA technology) มักใช้สลับกับคำศัพท์ต่าง ๆ เช่น เทคโนโลยียีน (Gene technology) การดัดแปลงพันธุกรรม (Genetic modification) หรือการจัดการยีน (Gene manipulation) เพื่ออธิบายกระบวนการแก้ไขหรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับเครื่องมือในห้องปฏิบัติการและเอนไซม์ที่จำเพาะสำหรับตัด (Deletion) แทรก (Insertion) ในการดัดแปลงชิ้นส่วนยีนที่สนใจตั้งแต่หนึ่งยีนขึ้นไป โดยการฝากถ่ายยีนระหว่างชนิดที่ยังไม่สามารถผสมข้ามได้ตามธรรมชาติ ทำให้พันธุวิศวกรรมมีความแตกต่างจากการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม (Conventional plant breeding)

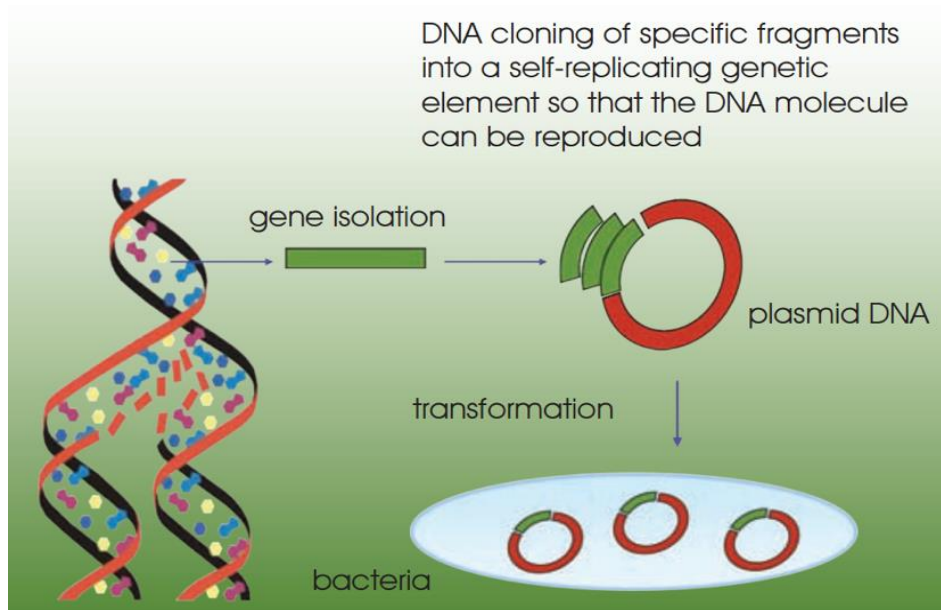
1.1 การพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Development of transgenic crops)

ขั้นตอนการพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรม มีขั้นตอนที่สำคัญ 5 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดกรดนิวคลีอิก (DNA/RNA) จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการ ซึ่งอาจเป็นไวรัส แบคทีเรีย หรือเซลล์พืช โดยทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) ด้วยสารดีเทอร์เจนต์ (Detergent) อาทิ Sodium dodecyl sulfate (SDS) การย่อยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ ด้วยโปรตีเอส (Protease) และ อาร์เอ็นเอส (RNase) ตามลำดับ จากนั้นตกตะกอนและล้างตะกอน (ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอ) ด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (Ethyl Alcohol Absolute) จากนั้นละลายดีเอ็นเอ ด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ หรือ TE buffer เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การโคลนยีน (Gene cloning) โดยทั่วไปมี 4 ขั้นตอน 1) การสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2) การเชื่อมกับเวกเตอร์ 3) การเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) และ 4) การ

คัดเลือกยีนเป้าหมาย โดยเอนไซม์มิกสตีเอ็นเอจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) จากนั้นเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ จะได้ดีเอ็นเอสายผสม (Recombinant DNA หรือ rDNA) ซึ่งฝากถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยวิธีการทรานสฟอร์ม (Transformation) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการต่อไป (ภาพที่ 1.1)



ภาพที่ 1.1 ขั้นตอนการโคลนยีน (Gene cloning) (<https://www.isaaa.org/>)

ขั้นตอนที่ 3 การออกแบบยีน (Gene Designing) เมื่อยีนที่สนใจได้รับการโคลนแล้ว จากนั้นเชื่อมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ควบคุมการแสดงออกของยีนภายในเซลล์พืช จะควบคุมการทำงานของยีน ด้วยโปรโมเตอร์ (Promotor) และหยุดการทำงานของยีน ด้วยเทอร์มิเนเตอร์ (Terminator) การออกแบบยีนสามารถทำได้โดยแทนที่โปรโมเตอร์ที่มีอยู่แล้วด้วย โปรโมเตอร์ใหม่ซึ่งประกอบด้วยยีนคัดเลือก (Selectable marker gene) และยีนรายงานผล (Reporter gene) รวมทั้งยีนเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของยีน (Gene enhancer) (ภาพที่ 1.2)

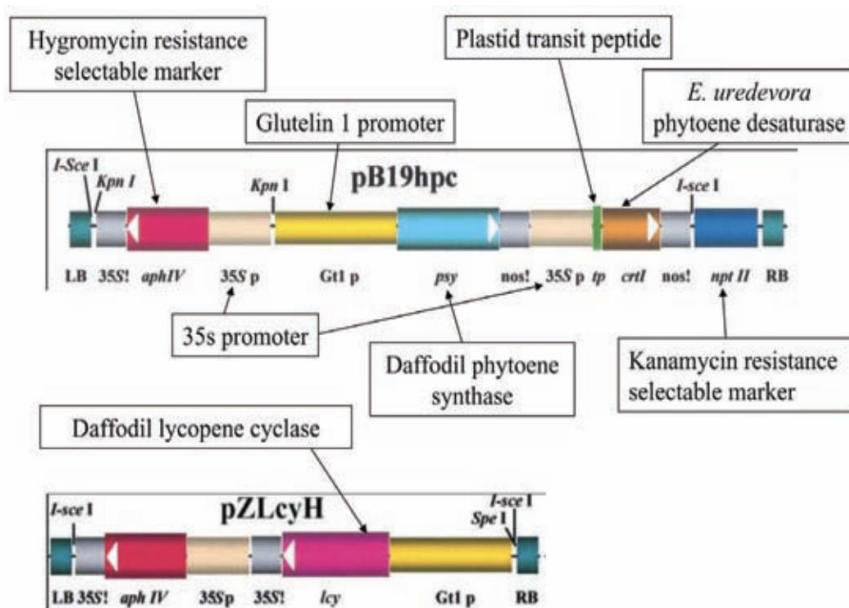
โปรโมเตอร์ ที่แตกต่างกันสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน เช่น โปรโมเตอร์ บางตัวทำให้ยีนที่ได้รับการฝากถ่ายแสดงออกตลอดเวลาในทุกระยะของพืช ในขณะที่ตัวอื่น ๆ จะแสดงออกได้เฉพาะบางช่วงของการเจริญเติบโตของพืช หรือมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อพืชบางชนิด

ยีนคัดเลือก ถูกเชื่อมกับยีนเป้าหมาย (Target genes) เพื่อช่วยต่อการตรวจสอบหรือตรวจติดตามเมื่อมีการส่งถ่ายชิ้นส่วนยีนเข้าไปในเซลล์พืช พืชดัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่ใช้ยีนคัดเลือกของยา

ปฏิชีวนะ (Antibiotic resistance) และสารกำจัดวัชพืช (Herbicide resistance) ซึ่งเซลล์ที่รอดจากสารดังกล่าวในอาหารเลี้ยง แสดงว่ามียีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่

ยีนรายงานผล ถูกเชื่อมกับเวกเตอร์โดยมีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีนเป้าหมาย เพื่อช่วยในการระบุตำแหน่งในเซลล์พืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน รวมทั้งการกำหนดการแสดงที่ถูกต้องของยีนที่ฝากถ่ายเข้าไป ได้แก่ ยีน Beta glucuronidase (gus A gene) เป็นสารตั้งต้นในการเกิดสีน้ำเงิน ของเซลล์ที่ได้รับส่งถ่ายยีน

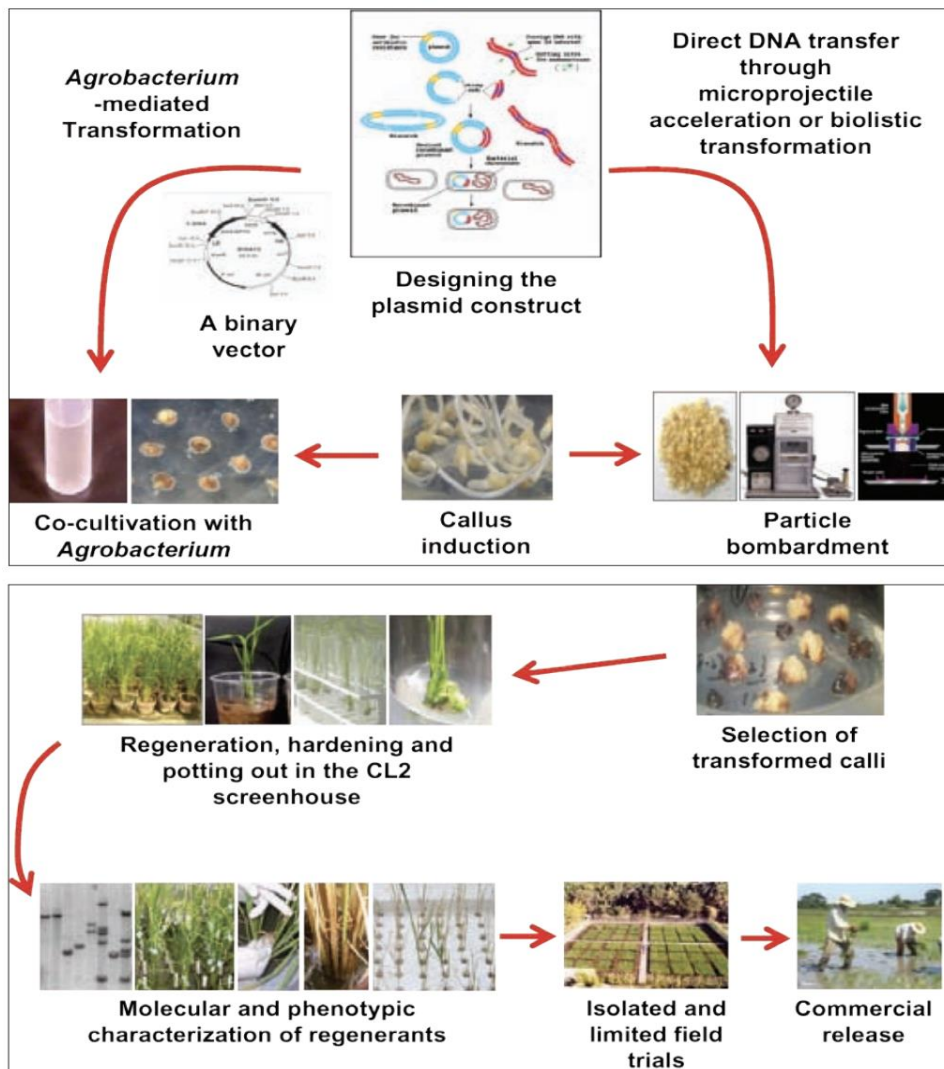
ยีนเพิ่มประสิทธิภาพ เพื่อส่งเสริมการแสดงออกของยีน สามารถเพิ่มลำดับเบสด้านหน้าของลำดับโปรโมเตอร์ หรือภายในลำดับพันธุกรรม (อินตรอน เป็นลำดับเบสที่ไม่มีการแปลรหัส) เช่น การเพิ่มการทำงานของโปรโมเตอร์โดยโคลนโปรโมเตอร์ *Cauliflower mosaic virus* บริเวณด้านหน้าของโปรโมเตอร์ของพืช



ภาพที่ 1.2 โครงสร้างยีนและองค์ประกอบของยีน ที่ใช้ในการพัฒนาข้าวสีทอง (Ye et al., 2000)

(แหล่งที่มา: <https://www.isaaa.org/>)

ขั้นตอนที่ 4. การส่งถ่ายยีน (Gene transformation) เมื่อยีนเป้าหมาย ถูกเชื่อมกับเวกเตอร์ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ ยีนรายงานผล และยีนคัดเลือก จะได้ดีเอ็นเอสายผสม (rDNA) และถูกส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวนยีน จากนั้นคัดเลือกยีนจากโคลนของแบคทีเรียเพื่อใช้ในการส่งถ่ายเข้าไปในเซลล์พืช ส่วนใหญ่การส่งถ่ายยีนอาศัยแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* และการฝากถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมพืชโดยตรง เช่น เครื่องยิงอนุภาค (Particle bombardment) (ภาพที่ 1.3)



ภาพที่ 1.3 วิธีการส่งถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมพืชโดยตรง ด้วยเครื่องยิงอนุภาค (Particle bombardment) โดยการใช้ gene gun และ การส่งถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* (แหล่งที่มา: <https://www.isaaa.org/>)

1) **เครื่องยิงอนุภาค** เป็นการนำยีนเป้าหมายเข้าสู่เซลล์พืช โดยการใช้ gene gun หรือ particle gun กระสุนปืนเป็นอนุภาคทังสเตนหรือทองคำ ถูกเคลือบด้วยดีเอ็นเอที่เชื่อมกับเวกเตอร์ และยิงเข้าสู่เซลล์พืชด้วยแรงของก๊าซฮีเลียมภายในห้องสุญญากาศ เมื่ออนุภาคที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอเข้าไปสู่เซลล์พืชแล้ว ภายใน 12 ชั่วโมง โมเลกุลดีเอ็นเอจะเข้าไปในนิวเคลียสและรวมกับดีเอ็นเอของพืช หลังจากนั้นอนุภาคทังสเตนหรือทองคำถูกกำจัดออกไปในภายหลัง เซลล์พืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีนถูกนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและกระตุ้นให้เกิดต้นพืชขนาดเล็ก (Regeneration) ที่มียีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่ในสารพันธุกรรม

2) การส่งถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* โดยตามธรรมชาติแบคทีเรีย *A. tumefaciens* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่ต้นพืชในบริเวณที่มีบาดแผล โดยจะถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปยังพืช และชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะรวมเข้ากับจีโนมของพืช ทำให้เกิดเนื้องอก (Tumor-like swellings หรือ Crown gall disease) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช (Plant metabolism) นักชีววิทยาจึงนำมาประยุกต์ใช้ในการส่งถ่ายยีน การฝากถ่ายยีนโดยอาศัย *A. tumefaciens* ควรโคลนชุดยีนทั้งหมดระหว่างลำดับเบสของ Left border (LB) และ Right border (RB) ที่อยู่สองข้างของพลาสมิด วิธีดังกล่าวถูกส่งเข้าไปในเซลล์พืชโดย Transfer DNA (T-DNA)

ขั้นตอนที่ 5 การตรวจยีนเป้าหมาย (Detection of target genes) โดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุลมาตรวจสอบการคงอยู่และการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช ได้แก่ 1) ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR) เป็นวิธีการตรวจสอบอย่างง่ายและรวดเร็ว ว่ายีนเป้าหมายยังคงอยู่ในพืชดัดแปลงพันธุกรรมหรือไม่ 2) Southern blot analysis คือเทคนิคที่ใช้ในการตรวจความคงอยู่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3) Northern blot analysis คือ เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดระดับ messenger RNA (mRNA) และ 4) Western blot analysis คือ เทคนิคที่ใช้ตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีน

2. คุณลักษณะที่ได้รับส่งถ่ายยีน เพื่อสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม (GMO Crop transited Traits)

2.1 ความต้านทานแมลงและศัตรูพืช (Bt Insect Resistance)

Bacillus thuringiensis (Bt) เป็นแบคทีเรียในดินทั่วไปที่แยกได้ครั้งแรกในรัฐทูรินเจีย (Thuringia) ประเทศเยอรมนี โดยยีนบีทีสามารถผลิตโปรตีนทำให้ตัวอ่อนของแมลงเป็นอัมพาต เช่น ตัวอ่อนหนอนเจาะเมล็ดฝ้าย และหนอนเจาะข้าวโพดในเอเชียและยุโรป ซึ่งเป็นศัตรูพืชทั่วไปที่ส่งผลร้ายแรงต่อพืชผลที่สำคัญ

2.1.1 กลไกการทำงาน (Mode of action)

เมื่อพืชถูกกินเข้าไปโดยตัวอ่อนของแมลงเป้าหมาย โปรตีนบีที จะถูกกระตุ้นให้ทำงานในสภาพที่เป็นด่างในลำไส้ของแมลง ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) จากนั้นแมลงจะตายภายในไม่กี่วัน มีการศึกษาวิจัยจำนวนมาก สำหรับการใช้ประโยชน์จากโปรตีนบีที เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการนำไปใช้ทางการเกษตร เช่น การผลิตโปรตีนเพื่อฆ่าแมลงศัตรูพืช ปัจจุบันมีโปรตีนบีทีมากกว่า 200 ชนิดที่มีระดับความเป็นพิษต่อแมลงที่แตกต่างกัน

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบีที สามารถทำได้ง่ายโดยการหมัก ซึ่งเป็นที่รู้จักกันมานานกว่า 50 ปี ในการนำโปรตีนบีที มาใช้เป็นยาฆ่าแมลงโดยเกษตรกรทั่วโลก สามารถนำมาใช้เป็นยาฆ่าแมลงได้ทั้งแบบสเปรย์หรือใส่ลงไปในดิน อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของการใช้งานค่อนข้างจำกัด เนื่องจากสิ่งมีชีวิตเป้าหมายมักไม่สัมผัสกับยาฆ่าแมลงบีที เนื่องจากตัวอ่อนศัตรูพืชมักเกาะอยู่ใต้ใบหรือเจาะเข้าไปในต้นพืช ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงศึกษาวิจัยเพื่อเอาชนะปัญหานี้ผ่านการให้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ โดยนำยีนบีที จากแบคทีเรียรวมเข้ากับจีโนมของพืช ทำให้พืชที่ได้รับการฝากถ่ายยีนมิกลไกในการป้องกันศัตรูพืชที่เป็นเป้าหมายได้ตลอดเวลา เนื่องจากพืชสามารถผลิตโปรตีนได้เอง



2.1.2 ด้านความปลอดภัยของเทคโนโลยีบีที

2.1.2.1 ผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ (Effects of human health)

ความจำเพาะของโปรตีนบีทีต่อแมลงเป้าหมายเป็นหนึ่งในคุณลักษณะที่ทำให้มีความเหมาะสมอย่างมากในการควบคุมศัตรูพืชทางชีวภาพ (Biological pest control) เนื่องจากบีทีสายพันธุ์ต่างกัน มีความเป็นพิษที่จำเพาะต่อชนิดของแมลงเป้าหมายต่างกัน ความจำเพาะนี้ขึ้นอยู่กับความเป็นพิษของโปรตีนบีที กับตำแหน่งตัวรับ (Mediated receptor) ที่บริเวณช่องท้องของแมลงที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน ซึ่งมนุษย์และแมลงที่เป็นประโยชน์ส่วนใหญ่ไม่มีตัวรับเหล่านี้

ก่อนที่พืชบีทีจะได้รับการอนุมัติออกสู่ตลาด ต้องผ่านการทดสอบตามกฎระเบียบที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยทางชีวภาพ รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษและการแพ้ โดยสำนักงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental Protection Agency : USEPA) ได้ดำเนินการประเมินทางพิษวิทยาของโปรตีนบีที จากการรายงานของ Extension Toxicology Network (Extoxnet) ซึ่งเป็นโครงการศึกษาข้อมูลยาฆ่าแมลงของมหาวิทยาลัยในอเมริกาหลายแห่ง พบว่า “ไม่มีการร้องเรียนใด ๆ หลังจากที่มีอาสาสมัคร 18 คน กินโปรตีนบีที หนึ่งกรัมทุกวันเป็นเวลาห้าวัน นอกจากนี้โปรตีนบีทีถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วโดยของเหลวในกระเพาะอาหารของมนุษย์ในหลอดทดลอง



2.1.2.2. ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Effects on the environment) จากการประเมินโปรตีนบีทีต่อระบบนิเวศของดินและน้ำใต้ดิน พบว่าโปรตีนบีทีมีความคงตัวในระดับปานกลางในดินและจัดอยู่ในประเภทเคลื่อนที่ไม่ได้ และจะเสียดสภาพในดินที่เป็นกรด และเมื่อโดนแสงแดดจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วเนื่องจากรังสียูวี และจากการศึกษาของผู้เชี่ยวชาญอิสระ ได้ตรวจสอบผลกระทบ

ของพืชที่ต่อสิ่งมีชีวิตในดินและแมลงที่เป็นประโยชน์อื่น ๆ จากการรายงานไม่พบผลกระทบใด ๆ ต่อสิ่งมีชีวิตในดินที่ไม่ใช่เป้าหมาย แม้ว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะได้รับปริมาณบีทีสูงกว่าความเข้มข้นจริงในสภาพการปลูกพืชตามธรรมชาติ เช่นเดียวกับการวิจัยของ สำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา (U.S. Environmental Protection Agency : USEPA) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในดินของวัสดุปลูกพืชบีที และวัสดุปลูกจากพืชที่ไม่ใช่บีที (Donegan et al., 1995) หรือระหว่างแปลงปลูกพืชบีทีและแปลงปลูกพืชที่ไม่ใช่บีที (Donegan et al., 1996) นอกจากนี้ จากการทดสอบกับสุนัข หนูตะเภา หนู ปลา กบ ซาลาแมนเดอร์ และนก พบว่าโปรตีนบีทีไม่มีผลร้ายใด ๆ ไม่พบพืชต่อแมลงที่เป็นประโยชน์หรือแมลงนักล่า เช่น ผีเสื้อและแมลงเต่าทอง



แต่อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ. 2542 มีรายงานว่าละอองเกสรจากข้าวโพดบีที มีผลต่อตัวอ่อนของผีเสื้อจักรพรรดิ (Monarch butterfly larvae) รายงานนี้ทำให้เกิดความกังวลและคำถามเกี่ยวกับความเสี่ยงของพืชที่ต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย อย่างไรก็ตาม การศึกษาล่าสุดแสดงให้เห็นว่าข้าวโพดบีทีเป็นภัยคุกคาม "ต่ำ" ต่อผีเสื้อจักรพรรดิ ในทุ่งนาหรือฟาร์ม จากความพยายามในการวิจัยร่วมกันของนักวิทยาศาสตร์ในสหรัฐอเมริกาและแคนาดา ได้จัดทำข้อมูลเพื่อพัฒนาการประเมินความเสี่ยงอย่างเป็นทางการเกี่ยวกับผลกระทบของข้าวโพดบีทีต่อประชากรผีเสื้อจักรพรรดิ จากการศึกษาสรุปว่า ข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสมที่มีการค้าเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่ มีการแสดงออกของโปรตีนบีทีต่ำในละอองเรณู และการศึกษาในห้องปฏิบัติการและภาคสนามไม่แสดงผลกระทบที่เป็นพิษเฉียบพลัน (Sears et al., 2001)

2.2 เทคโนโลยีความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช: ไกลโฟเซต และ กลูโฟซิเนต

(Herbicide Tolerance (HT) Technology: Glyphosate and Glufosinate)

วัชพืชเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในไร่นาของเกษตรกร ไม่เพียงแต่แย่งแย่งน้ำ สารอาหาร และพื้นที่ กับพืชผลทางการเกษตร แต่ยังเป็นที่อยู่อาศัยของแมลงและสาเหตุการก่อโรค นอกจากนี้ระบบชลประทานและระบบระบายน้ำที่ไม่สามารถควบคุมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้คุณภาพพืชผล และเมล็ดพันธุ์พืชผลปนกับเมล็ดวัชพืชหลังการเก็บเกี่ยว ถ้าปล่อยไว้ไม่มีการควบคุมวัชพืชสามารถเป็นปัจจัยสำคัญในการลดผลผลิตพืชผลอย่างมีนัยสำคัญ จากสาเหตุดังกล่าว เกษตรกรจึงเลือกใช้สารกำจัดวัชพืช ทำให้เกิดการปนเปื้อนสารเคมีในน้ำใต้ดิน มีผลต่อการตายของสัตว์ป่าหลายชนิด นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุการเจ็บป่วยของมนุษย์และสัตว์ต่าง ๆ

2.2.1 การพัฒนาพืชที่ทนต่อสารกำจัดวัชพืช: ไกลโฟเซต และกลูโฟซิเนต

(Development of HT crops : Glyphosate and Glufosinate) สารกำจัดวัชพืชไกลโฟเซตและกลูโฟซิเนต มีประโยชน์สำหรับการควบคุมวัชพืช และมีผลกระทบโดยตรงต่อชีวิตสัตว์น้อยที่สุด และไม่คงอยู่ถาวรในสิ่งแวดล้อม มีประสิทธิภาพสูงและปลอดภัยที่สุดในบรรดาสารเคมีทางการเกษตร แต่สารดังกล่าวสามารถส่งผลเช่นเดียวกับพืชผลทางการเกษตร โดยสารกำจัดวัชพืชเหล่านี้สามารถขัดขวางหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช ส่งผลต่อกระบวนการสร้างสารอาหารของพืชและตายในที่สุด ดังนั้นจึงมีการพัฒนาพืชที่ทนต่อสารกำจัดวัชพืช (Herbicide tolerant หรือ HT) ให้มีระดับความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชเหล่านี้

2.2.1.1. พืชทนไกลโฟเซต (Glyphosate tolerant crops)

ไกลโฟเซต สามารถฆ่าพืชโดยการปิดกั้นการทำงานของเอนไซม์ EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอะมิโน สารประกอบแอโรมาติก (Aromatic) วิตามิน และสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืชหลายชนิด มีหลายวิธีที่สามารถปรับเปลี่ยนพืชผลทางการเกษตรให้ทนต่อไกลโฟเซตได้ กลยุทธ์หนึ่งคือ ยีนจาก *Salmonella typhimurium* ที่สังเคราะห์ EPSP synthase mutant โดยกรดอะมิโนโพรลีน (Proline) ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนซีรีน (Serine) ทำให้ไกลโฟเซตไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ EPSP synthase mutant ส่งผลยังมีการทำงานของ EPSPS



2.2.1.2. พืชที่ทนต่อกลูโฟซิเนต (Glufosinate tolerant crops)

สารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนต ประกอบด้วยโพรฟีนอโฟส (Profenofos) สามารถฆ่าพืชโดยการปิดกั้นเอนไซม์ที่หน้าที่ในการเผาผลาญไนโตรเจนและสำหรับล้างพิษแอมโมเนีย ที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช สำหรับพืชดัดแปลงพันธุกรรมให้ทนต่อกลูโฟซิเนต (HT) ประกอบด้วยยีนของแบคทีเรียที่มียีนสร้างโพรตีน ทำหน้าที่กำจัดสารโพรฟีนอโฟส และป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหาย

วิธีการอื่น ๆ ที่พืชได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อให้อยู่รอดได้จากการสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช ได้แก่ 1) ผลิตโปรตีนชนิดใหม่ที่ล้างพิษจากสารกำจัดวัชพืช; 2) ดัดแปลงโปรตีนเป้าหมายของสารกำจัดวัชพืชไม่ได้รับผลกระทบจากสารกำจัดวัชพืช และ 3) สร้างสิ่งกีดขวางทางกายภาพหรือทางสรีรวิทยาที่ป้องกันไม่ให้สารกำจัดวัชพืชเข้าสู่พืช โดย สองวิธีแรกเป็นวิธีที่พบได้บ่อยที่สุดที่นักวิทยาศาสตร์พัฒนาพืชที่ทนต่อสารกำจัดวัชพืช

2.1.2. ด้านความปลอดภัยของเทคโนโลยีความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช

(Safety aspects of herbicide tolerance technology)

หน่วยงานกำกับดูแลของรัฐบาลในหลายประเทศได้ลงมติว่าพืช HT ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงด้านสิ่งแวดล้อมและสุขภาพอื่น ๆ เมื่อเทียบกับพืชที่ไม่ใช่พืชดัดแปลงพันธุกรรม หรือพืช GMOs โดยโปรตีนที่ถูกชักนำจะได้รับการประเมินประสิทธิภาพการก่อพิษและสารก่อภูมิแพ้ ที่อาจเกิดขึ้นตามแนวทางที่พัฒนาขึ้นโดยองค์กรระหว่างประเทศ พบว่าโปรตีนที่ถูกชักนำมาจากแหล่งที่ไม่มีประวัติการแพ้หรือเป็นพิษ และไม่มี ความคล้ายคลึงกับสารพิษหรือสารก่อภูมิแพ้ที่รู้จัก นอกจากนี้หน้าที่ของโปรตีนดังกล่าวมีการศึกษาและมีความเข้าใจกลไกการทำงานอย่างดีแล้ว

สำหรับผลกระทบต่อพืชอื่น ๆ การแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้ไม่ได้ทำลายการเจริญเติบโตของพืชและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพทางการเกษตรให้แย่งลง เมื่อเทียบกับต้นพืชพ่อแม่พันธุ์ ในส่วนของการคงอยู่หรือการรุกรานพืชผลอื่น ๆ ยังมีความกังวลด้านสิ่งแวดล้อม ที่เกี่ยวข้องกับพืชที่ทนต่อสารกำจัดวัชพืช (HT) คือ ศักยภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างวัชพืชสายพันธุ์ใหม่ ผ่านการผสมข้ามพันธุ์กับสายพันธุ์ป่า (Wild type) อย่างไรก็ตาม ศักยภาพนี้ได้รับการประเมินและติดตามตรวจสอบหลังจากปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันบ่งชี้ว่า หากไม่มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช พืชดังกล่าวไม่มีโอกาสเกิดขึ้นเอง และไม่สามารถรุกรานในพื้นที่การเกษตรหรือในแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติได้ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ใช่พืชดัดแปลงพันธุกรรม ปัจจุบันมีหลักฐานเพียงเล็กน้อยของการคงอยู่หรือการรุกรานที่เพิ่มขึ้นของพืช HT ที่ได้รับอนุมัติการค้าเชิงพาณิชย์ (<https://www.isaaa.org>)

2.3 เทคโนโลยีการทำให้สุกช้า (Delayed Ripening Technology)



การสุก (Ripening) เป็นขั้นตอนปกติในกระบวนการสุก (Maturation process) ของผักและผลไม้ เมื่อเริ่มสุกจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน ก่อนที่ผลไม้หรือผักจะไม่สามารถกินได้ กระบวนการนี้ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ นำมาซึ่งความสูญเสียที่สำคัญต่อทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาวิจัยเพื่อชะลอการสุกของผลไม้

เพอให้เกษตรกรสามารถยืดอายุในการวางขาย และสามารถรับประกันต่อผู้บริโภคว่าจะได้รับผลผลิตที่ “สดจากสวน” กระบวนการควบคุมการสุก มีหลายวิธีที่นักวิทยาศาสตร์สามารถควบคุมกระบวนการทำให้สุกโดยการดัดแปลงพันธุกรรม

2.3.1 การควบคุมปริมาณของเอทิลินที่ผลิตขึ้น สามารถควบคุมได้โดยการ "หยุดการทำงาน" หรือลดการผลิตเอทิลินในผลไม้ และมีหลายวิธี ได้แก่

1) การยับยั้งการแสดงออกของยีนสังเคราะห์ ACC (Suppression of ACC synthase gene expression) โดย ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) synthase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน S-adenosyl methionine (SAM) เป็น ACC ซึ่งเป็นขั้นที่สองก่อนจะถึงขั้นตอนสุดท้ายในการสังเคราะห์เอทิลิน การแสดงออกของเอนไซม์ถูกขัดขวางเมื่อมีการแทรกสายแอนติเซนส์ (Antisense) เข้าในจีโนมของพืช

2) การแทรกยีน ACC deaminase (Insertion of the ACC deaminase gene.) ลำดับของยีน ACC deaminase ได้จาก *Pseudomonas chlororaphis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินที่ไม่ก่อให้เกิดโรคทั่วไป โดยจะแปลง ACC เป็นสารประกอบที่แตกต่างกัน ซึ่งจะช่วยลดปริมาณ ACC ทำให้สามารถลดการผลิตเอทิลินได้

3) การแทรกยีน SAM hydrolase (Insertion of the SAM hydrolase gene) วิธีการนี้คล้ายกับ ACC deaminase ซึ่งการผลิตเอทิลินถูกขัดขวาง เมื่อปริมาณของสารตั้งต้นเมตาโบไลต์ลดลง ในกรณีนี้ SAM จะถูกแปลงเป็นโฮโมเซอรีน (Homoserine) สำหรับลำดับยีนของเอนไซม์ได้มาจาก *E. coli* T3 bacteriophage

4) การยับยั้งการแสดงออกของยีน ACC oxidase (Suppression of ACC oxidase gene expression) โดย ACC ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ACC ให้อยู่ในรูปเอทิลิน ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์เอทิลิน การควบคุมการแสดงออกของยีน ACC oxidase โดยแทรกชิ้นส่วนยีน anti-sense ในจีโนมของพืช ทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอทิลิน ส่งผลทำให้ผลสุกช้าลง

2.3.2 ด้านความปลอดภัยของเทคโนโลยีการทำให้สุกช้า

(Safety aspects of Delayed Ripening technology) พืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดแรกที่ได้รับการอนุมัติสำหรับการค้าเชิงพาณิชย์ คือ มะเขือเทศ Flavr-Savr™ ที่ผลิตโดย Calgene, Inc. (สหรัฐอเมริกา) ในปี 1994 หลังจากศึกษาเทคโนโลยีการทำให้สุกช้า และผลิตภัณฑ์ของบริษัทอย่างถี่ถ้วนแล้ว สหรัฐอเมริกาเป็นหน่วยงานกำกับดูแล ได้ข้อสรุปว่าเทคโนโลยีการทำให้สุกช้า มีความปลอดภัย โดยมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมมีองค์ประกอบทางโภชนาการเหมือนกับมะเขือเทศทั่วไป และไม่แสดงระดับของสารก่อภูมิแพ้หรือสารพิษที่ต่างกันเมื่อเทียบกับ มะเขือเทศปกติ

นอกจากนี้ การทดลองภาคสนามยังแสดงให้เห็นว่ามะเขือเทศ ทำให้สุกช้าไม่ก่อให้เกิดอันตรายใด ๆ ต่อพืชชนิดอื่นหรือต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย มะเขือเทศที่พัฒนาให้สุกช้า อื่น ๆ ที่พัฒนาขึ้นมารายหลัง



ได้รับสถานะยกเลิกการควบคุมจากหน่วยงานกำกับดูแลในหลายประเทศ รวมถึงสหรัฐอเมริกา แคนาดา และเม็กซิโก และเทคโนโลยีทำให้สุกซ้านี้ ถูกนำมาใช้ในแต่งสายพันธุ์ต่าง ๆ และมะละกอ นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในดอกคาร์เนชั่นเพื่อชะลอการเหี่ยวเฉา (<https://www.isaaa.org>)

3. ศักยภาพการใช้ประโยชน์จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (Potential GMO Applications)

อุตสาหกรรมจำนวนมากได้รับประโยชน์จากการศึกษาวิจัยและการพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรม เนื่องจากสามารถลดต้นทุนในการผลิต และย่นระยะเวลาในการเก็บผลผลิต นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความทนทานต่อความเครียด ด้านทานโรค และสารกำจัดวัชพืช พร้อมทั้งสามารถเพิ่มคุณค่าทางอาหาร และเพิ่มการเจริญเติบโตโดยการควบคุมระบบการผสมเกสรของพืช

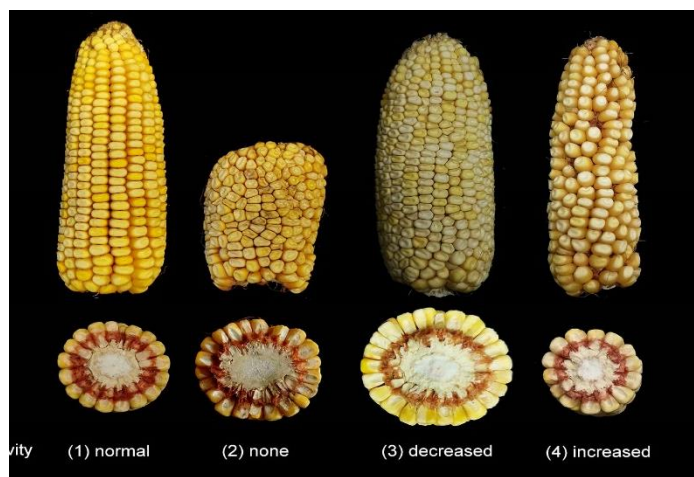
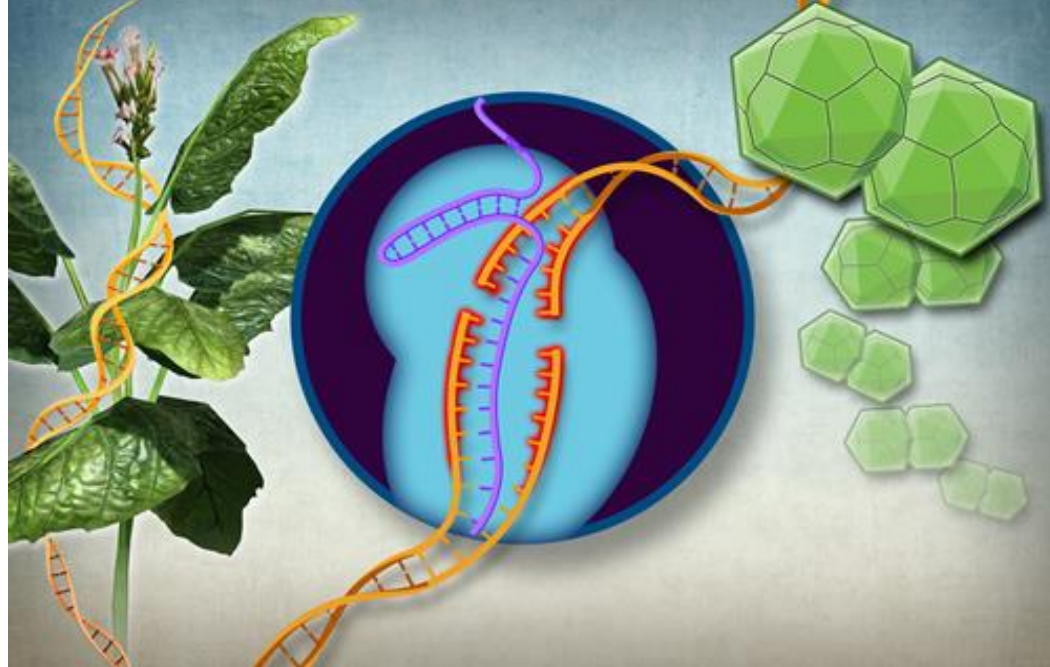
แต่อย่างไรก็ตามยังมีความกังวลเกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น เช่น ความเสี่ยงด้านสุขภาพ (Health risks) ที่อาจเกิดขึ้นกับมนุษย์ ได้แก่ ความเป็นไปได้ที่จะสัมผัสกับสารก่อภูมิแพ้ใหม่ในอาหารดัดแปลงพันธุกรรม เช่นเดียวกับการถ่ายโอนยีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ที่อาจส่งผลต่อระบบย่อยอาหารของทั้งคนและสัตว์ ทำให้ยังมีข้อกังวลหลายประการ เช่น การถ่ายโอนยีนแนวนอน (Horizontal gene transfer) ของพืช ที่มีความต้านทานของสารกำจัดศัตรูพืช สารกำจัดวัชพืช หรือความต้านทานยาปฏิชีวนะต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อาจทำให้มนุษย์ตกอยู่ในความเสี่ยง หรืออาจส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลทางนิเวศวิทยา (Ecological imbalances) ทำให้พืชที่ไม่มีพิษก่อนหน้านี้สามารถสร้างสารก่อพิษ ที่ไม่สามารถควบคุมได้ แม้ว่าความเป็นไปได้ของการถ่ายโอนยีนในแนวนอนระหว่างสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ไม่สามารถปฏิเสธได้ แต่ในความเป็นจริง ความเสี่ยงนี้ถือว่าค่อนข้างต่ำ เนื่องจากการถ่ายโอนยีนแนวนอนเกิดขึ้นตามธรรมชาติในอัตราที่ต่ำมาก (Ma et al., 2003)

ปัจจุบันเครื่องมือเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ เช่น เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม (Genome editing) เทคโนโลยีการปรับแต่งลำดับเบส (Base editors: BEs) และเทคโนโลยีการแก้ไขจีโนมแบบ Prime editing (PE) เป็นวิธีที่มีความเจาะจงสูงและควบคุมได้มากขึ้นสำหรับการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอของพืชหรือโปรตีน สามารถเพิ่มผลผลิตและคุณค่าทางโภชนาการให้สูงขึ้น และ/หรือพืชที่สามารถปรับตัวต่อสภาพอากาศที่รุนแรงได้ดี เช่น ในสภาวะแห้งแล้ง และโรคภัยต่าง ๆ เนื่องจากเครื่องมือเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ดังกล่าว สามารถเอาชนะข้อจำกัดที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการส่งถ่ายยีนทั่วไป ซึ่งถือเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการนำมาปรับปรุงพืชทางการเกษตร ในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรทั่วโลก และส่งเสริมความมั่นคงด้านอาหารในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Donegan, K.K., C.J. Palm, V.J. Fieland, L.A. Porteous, L.M. Ganio, D.L. Schaller, L.Q. Bucao, and R.J. Seidler. 1995. Changes in Levels, Species and DNA Fingerprints of Soil Microorganisms Associated with Cotton Expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Endotoxin. *Applied Soil Ecology* 2(2): 111-124.
- Donegan, K.K., Schaller, D.L., Stone, J.K., Ganio, L.M., Reed, G., Hamm, P.B. and Seidler. R.J. 1996. Microbial Populations, Fungal Species Diversity and Plant Pathogen Levels in Field Plots of Potato Plants Expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* Endotoxin. *Transgenic Research* 5(1): 25-35.
- ISAAA Publications. <https://www.isaaa.org/resources/publications/default.asp>
- Losey, J. E., Rayor, L. S. and Carter, M. E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399(6733), 214–214. doi:10.1038/20338
- Ma, J. K.-C., Drake, P. M. W. and Christou, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4(10), 794–805. doi:10.1038/nrg1177
- Naqvi, S., Farre, G., Sanahuja, G., Capell, T., Zhu. C. and Christou. P. 2009. When More is Better: Multigene Engineering in Plants. *Trends in Plant Science* 15(1): 48-56.
- Sears, M., Hellmich, R. Stanley-Horn, S., Onerhauser, K. Pleasants, J., Mattila, H., Siegfried, B. and Dively, G. 2001. Impact of Bt Corn Pollen on Monarch Butterfly Populations: A Risk Assessment. *PNAS* 98(21): 11937-11942.
- Tanaka, Y., Brugliera, F. and Chandler. S. 2009. Recent Progress of Flower Colour Modification by Biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences* 10(12): 5350–5369.
- Ye X.D., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P. Beyer, P. and Potrykus. I. 2000. Engineering the Provitamin A (Beta-carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-free) Rice Endosperm. *Science* 287(5451): 303–305.





บทที่ 2

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่: พืชปรับแต่งจีโนม (Plant genome editing)

เรียบเรียงโดย วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร 2565

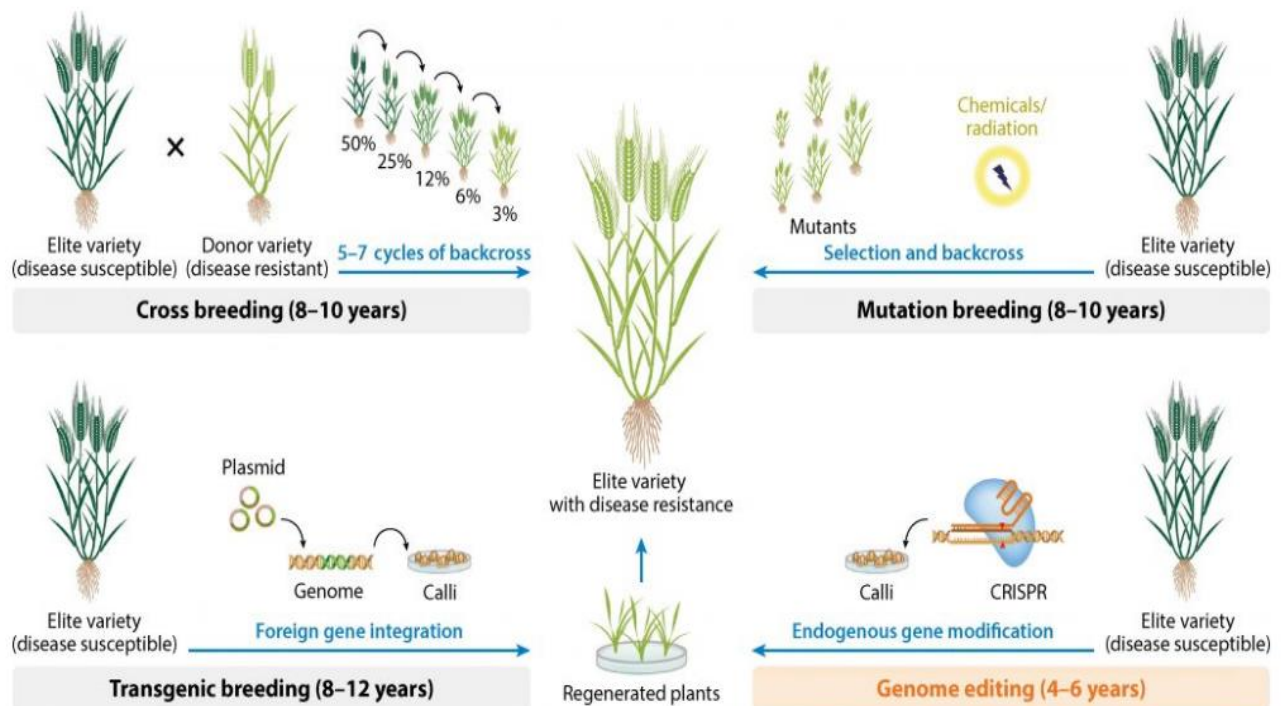
1. บทนำ

พันธุ์พืชต่าง ๆ ที่มนุษย์บริโภคหรือใช้ประโยชน์ในปัจจุบันนั้นล้วนแต่ ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ที่มีการคัดเลือกจากฐานสู่ฐานเป็นเวลายาวนาน แบบดั้งเดิมตามธรรมชาติโดยมีกระบวนการที่ผ่านการคัดเลือกพันธุ์ที่ให้ลักษณะดีต่าง ๆ เช่น ให้ผลผลิตปริมาณมาก ขนาดผลผลิตใหญ่ มีธาตุอาหารสูง มีสี มีกลิ่น และรสชาติดี เป็นต้น (Moreno-González and Cubero 1993)

นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการเพิ่มลักษณะพิเศษอื่น ๆ เช่น การต้านทานต่อโรค ที่ต้องผ่านการคัดเลือกพันธุ์จากฐานสู่ฐานมีการผสมพันธุ์ และผ่านการผสมกลับ และคัดเลือกจนกว่าจะได้พืชที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคนั้น ๆ โดยที่ไม่เสียลักษณะที่ดีที่มีอยู่ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานานมากและทรัพยากรมหาศาล หนึ่งในตัวช่วยที่จะสามารถลดระยะเวลาและทรัพยากรในการคัดเลือกพันธุ์ได้ก็คือการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA marker) ซึ่งเป็นการลดขั้นตอนและทรัพยากรในการผสมคัดเลือกพันธุ์ (Semagn et al. 2006) (ภาพที่ 2.1)

นอกจากนี้ยังมีการคิดค้นวิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยการทำให้พืชนั้นเพิ่มปริมาณชุดยีนโดยการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ทำให้มีผลต่อการเป็นหมันและได้ลักษณะพิเศษอื่น ๆ เกิดขึ้นอีก เช่น การใช้กระบวนการโพรโตพลาสต์ฟิวชันในพืชที่ไม่สามารถผสมพันธุ์ได้โดยตรงตามธรรมชาติหรือแม้กระทั่งการใช้สารเคมีกระตุ้นการกลายพันธุ์ (Mutagen) และการใช้รังสี ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เช่นกัน (ภาพที่ 2.1) ต่อมาในปี 1989 เริ่มมีการใช้พันธุวิศวกรรมในการถ่ายฝากยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เข้าสู่เซลล์พืชโดยผ่านทางแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งวิธีการนำเข้าสู่เซลล์พืชมีด้วยกันหลากหลายวิธี เช่น การใช้ Particle bombardment การใช้ Electroporation และ Chemical transfection เข้าสู่เซลล์โพรโตพลาสต์ (Gasser and Fraley 1989) วิธีการต่าง ๆ เหล่านี้ต้องผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งจะต้องมีกระบวนการรีเจนเนอเรชันเพื่อให้ได้เป็นต้นสมบูรณ์ซึ่งอาจจะมีระยะเวลานานในพืชบางชนิด (ภาพที่ 2.1)

อย่างไรก็ตามยังมีข้อถกเถียงถึงเรื่องของการควบคุมกำกับดูแล เกี่ยวกับกระบวนการกำกับดูแลระหว่างการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ กับกระบวนการที่มนุษย์สร้างขึ้น โดยแบ่งออกได้เป็น 2 กระบวนการ การควบคุมกำกับดูแล โดยการพิจารณาแบบ 1) Process regulation และ 2) Product regulation ซึ่งกระบวนการพันธุวิศวกรรม ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการถ่ายฝากยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นเข้าสู่เซลล์พืชซึ่งมักหลงเหลือชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากแหล่งภายนอกไว้ เรียกว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรม หรือ พืชจีเอ็มโอ (Twyman et al. 2002) ในทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการคิดค้นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคโนโลยีใหม่ที่เป็นการทำลายดีเอ็นเอสายคู่แบบจำเพาะเจาะจงและมีการซ่อมแซมดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดการเสียหาย ทำให้ลำดับเบสบริเวณนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น หากกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ต้องอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) หรือดีเอ็นเอผู้ให้ (Donor DNA) ทำให้ได้ดีเอ็นเอใหม่แทรกอยู่ในจีโนมของพืชในตำแหน่งที่แม่นยำ (Jansing et al. 2019; Ghogare et al. 2020) ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้จะไม่หลงเหลือชิ้นส่วนดีเอ็นเอในกระบวนการถ่ายฝากยีน เปรียบเทียบได้กับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมที่ใช้สารเคมีหรือใช้รังสี (Pérez-Massot et al. 2013; Zhu et al. 2017) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเบสของดีเอ็นเอได้เพียงแค่ 1 เบส ในตำแหน่งที่ต้องการ (Monsur et al. 2020) (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 การปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม การปรับปรุงพันธุ์แบบการกระตุ้นการกลายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์แบบการถ่ายฝากยีน และการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการปรับแต่งจีโนม (แหล่งที่มา : <https://www.genesproutinitiative.com/npbts/>)

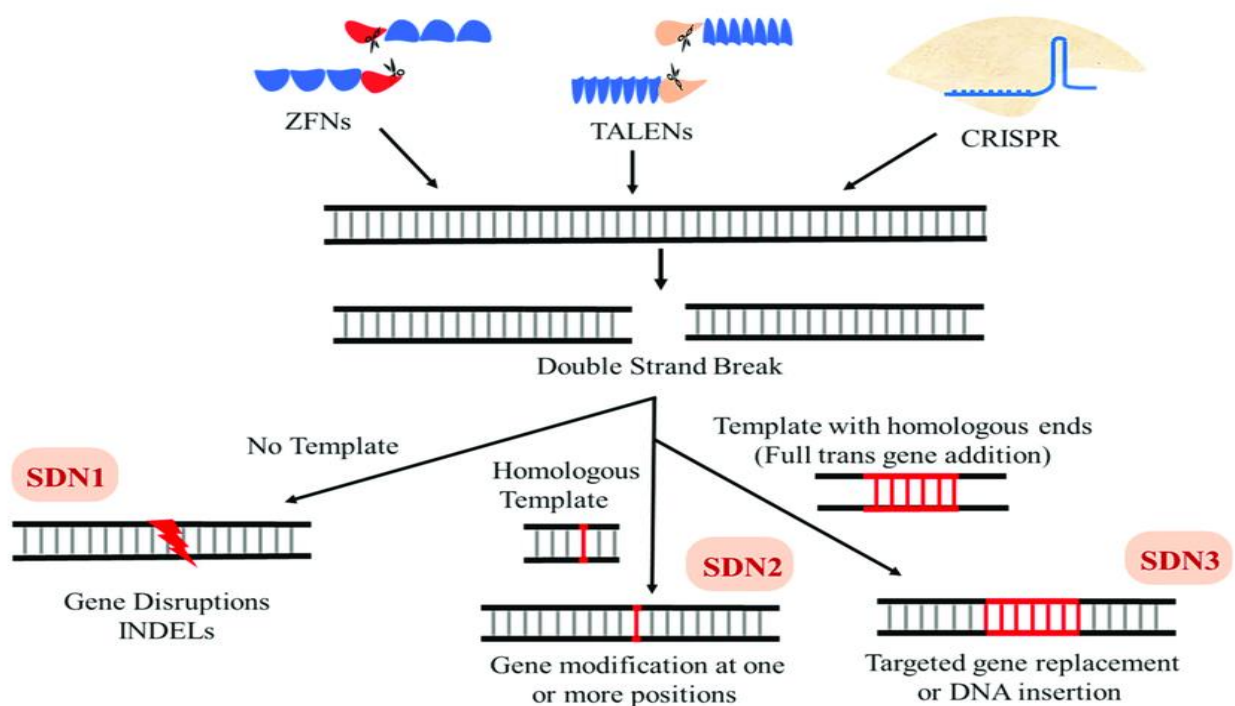
2. เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม (Genome editing)



การปรับแต่งจีโนม (Genome editing) เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีความแม่นยำสูง โดยการปรับเปลี่ยนเบสบนจีโนมของพืชบริเวณเป้าหมายที่ต้องการได้อย่างจำเพาะเจาะจง ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการปรับแต่งจีโนม ที่นำมาใช้ทางการเกษตรที่สำคัญ ได้แก่ 1) ระบบ ZFNs (DNA-binding zinc finger modules) 2) ระบบ TALENs (Transcription activator-like effector nucleases) และ 3) ระบบ CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein) (Ghogare *et al.* 2020; Shukla *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2013) โดยหลักการแล้ว ระบบ ZFNs และ TALENs มีกลไกการทำงานที่เหมือนกัน โดยมีโปรตีนไกด์ (Guided protein) เป็นตัวนำพาเอนไซม์ตัดจำเพาะให้ตัดดีเอ็นเอสายคู่ในตำแหน่งจำเพาะตามที่ออกแบบนั้น ๆ โดยจะต้องมีการออกแบบและสังเคราะห์ โปรตีนไกด์ซึ่งใช้เวลาและขั้นตอนมาก ในขณะที่ระบบ CRISPR/Cas9 เป็นนิวคลีโอไทด์ไกด์หรือ guide RNA (gRNA) เป็นตัวนำพาเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีความง่ายและสะดวกมากกว่า

2.1 รูปแบบการปรับแต่งยีนเป้าหมายและการควบคุมกำกับดูแล

ระบบการปรับแต่งจีโนม มีการปรับแต่งยีนเป้าหมายโดยการทำงานของเอนไซม์ Site-directed nucleases (SDN) สามารถแบ่งออก ได้ 3 รูปแบบ SDN1 SDN2 และ SDN3 เมื่อดีเอ็นเอเสียหาย เซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีกลไกซ่อมแซมดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอสายคู่ (Double strand DNA) ที่เสียหาย จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หากกลไกซ่อมแซมดีเอ็นเอไม่ต้องการดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) บริเวณที่เสียหายจะถูกตัดออก (Deletion) เรียกรูปแบบนี้ว่า SDN1 ในกรณีที่การซ่อมแซมดีเอ็นเอต้องการอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบในระหว่างการซ่อมแซมดีเอ็นเอสายคู่ หากมีการเปลี่ยนแปลงเบสเพียง 1 เบส ที่เพิ่มขึ้นมา (Insertion) เรียกรูปแบบนี้ว่า SDN2 และ 3) หากดีเอ็นเอต้นแบบมีที่มีการแทรกของยีนใหม่มีความยาวมากกว่า 1 เบส เรียกรูปแบบนี้ว่า SDN3 (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 รูปแบบการปรับแต่งยีนเป้าหมาย แบบ Site-directed nucleases1-3

ที่มา: Ahmad A. *et al.*, (2021)

เนื่องจากรูปแบบการปรับแต่งยีนเป้าหมายมีกลไกการทำงานต่างกัน ทำให้การควบคุมกำกับดูแลของพืชปรับแต่งจีโนม หรือ พืช GEด มีความแตกต่างกันในแต่ละประเทศ ในหลายประเทศกำหนดให้รูปแบบ SDN1 ไม่ต้องใช้กฎหมายกำกับดูแลเดียวกันกับพืชดัดแปลงพันธุกรรม หรือ พืช GMOs เนื่องจากรูปแบบ SDN1 เป็นการตัดยีนเป้าหมายออก ซึ่งรูปแบบการกลายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ในธรรมชาติ จึงไม่ถือว่าเป็นสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม จึงไม่มีการควบคุมกำกับดูแล และนำมาใช้ประโยชน์ทางการค้าได้ เช่นเดียวกันกับรูปแบบ SDN2 บางประเทศถือว่าไม่เป็นสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม แต่สำหรับรูปแบบ SDN3 การนำมาใช้ประโยชน์ การอนุมัติใช้ จะต้อง

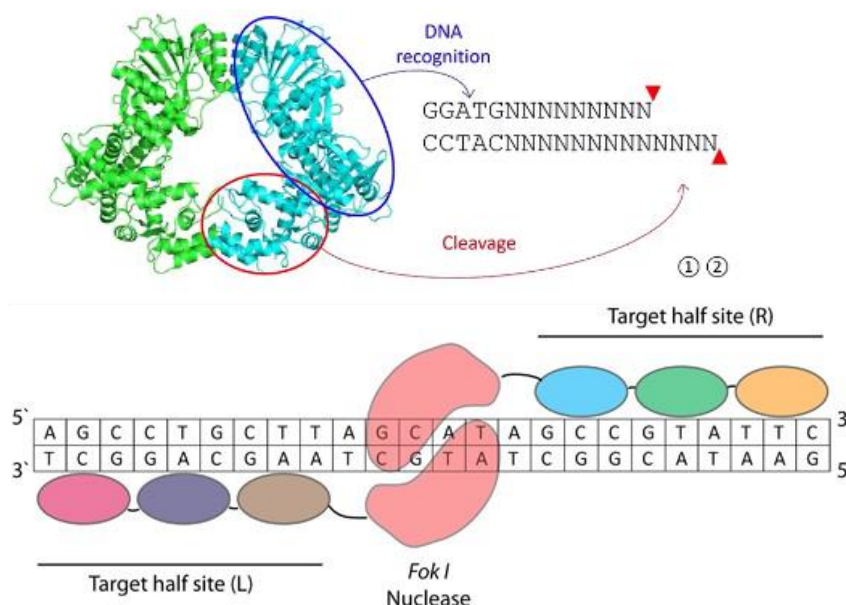
การพิจารณา เป็นกรณีกรณีนีไป และมักจะมีการควบคุมกำกับ ดุลเฉพาะ เนื่องจากมีการปรากฏของชิ้น ยีนใหม่ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เพื่อความปลอดภัยตามข้อตกลงของการใช้สิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม

สำหรับตัวอย่างประเทศที่อนุมัติให้รูปแบบ SDN1 และ SDN2 ไม่ต้องมีการควบคุม กำกับดูแล ได้แก่ สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา บราซิล ชิลี และ ญี่ปุ่น เป็นต้น ในขณะที่รูปแบบ SDN1 และ SDN2 มีการควบคุมกำกับดูแลเป็นกรณีกรณีนีไป ได้แก่ แคนาดา โคลัมเบีย และ ฮอนดูรัส เป็นต้น สำหรับประเทศที่ควบคุมกำกับดูแลเช่นเดียวกับพืช GMOs ได้แก่ นิวซีแลนด์ และ สหภาพยุโรป โดย ภาวะเปรียบเทียบการควบคุมกำกับดูแลในหลายประเทศยังอยู่ระหว่างการพัฒนา และพิจารณา เพื่อออก กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกำกับดูแลนี้ สำหรับประเทศไทยยังไม่มีภาวะเปรียบเทียบในการควบคุม กำกับดูแลอย่างเป็นทางการ

3. กลไกการทำงานของระบบ ZFNs

(DNA-binding zinc finger modules)

ระบบ ZFNs อาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์ *FokI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะประเภท Type II (S) คุณสมบัติพิเศษคือจุดตัดเอนไซม์ (Cleavage site) แยกจากจุดจดจำ (DNA-recognition site) โดยเอนไซม์ *FokI* เป็นโปรตีนโดเมอ์ที่จะจดจำลำดับเบส GGATG ในขณะที่จุดตัดเอนไซม์จะอยู่ห่าง ออกไปแล้วตัดแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อลำดับเบสถัดไป (ภาพที่ 2.3) ซึ่งเป็นเทคนิคแรกในการนำมา ประยุกต์ในงานทางด้านการดัดแปลงพันธุกรรม (Genome engineering)



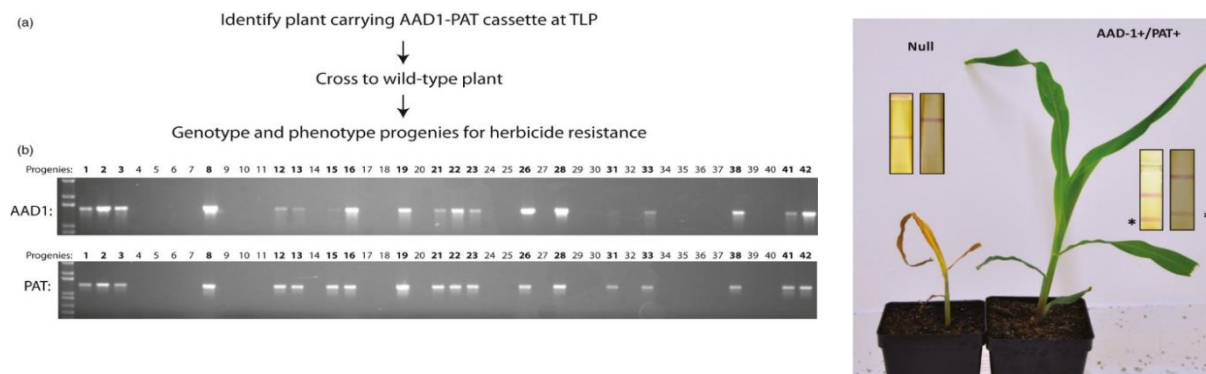
ภาพที่ 2.3 กลไกการทำงานของระบบ ZFNs (DNA-binding zinc finger modules) ที่มา: Palpant, N. and Dudzinski, D. (2013)

3.1 การประยุกต์ใช้ ระบบ ZFNs ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

[illegible]

20

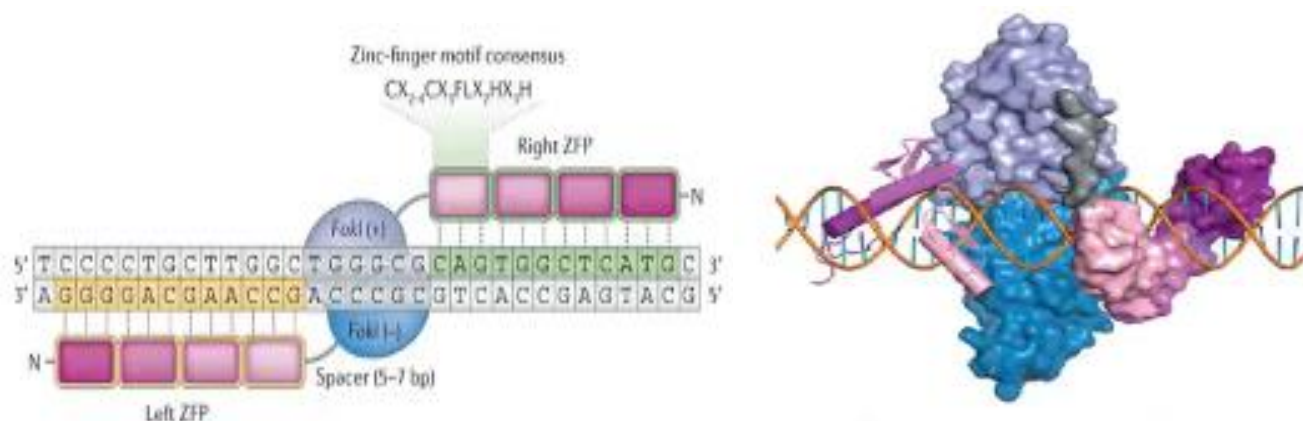
นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำ Trait stacking ในข้าวโพดเพื่อให้เกิดลักษณะการต้านทานสารกำจัดวัชพืชให้สามารถถ่ายทอดลักษณะจากพันธุ์หนึ่งไปสู่อีกพันธุ์หนึ่งได้ โดยการเพิ่มยีน *AAD1* และ *PAT* เมื่อมีการผสมข้ามพันธุ์ และตรวจสอบความมียูของยีนที่ใส่เข้าไป โดยในพันธุ์ลูกผสมที่มียีน *AAD1* และ *PAT* จะแสดงลักษณะต้านทานสารกำจัดวัชพืช (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 การเพิ่มยีน *AAD1* และ *PAT* ในข้าวโพดเพื่อให้เกิดลักษณะการต้านทานสารกำจัดวัชพืชด้วย ZFNs (ที่มา: Ainley et al., 2013)

4. กลไกการทำงานของระบบ TALENs (Transcription activator-like effector nucleases)

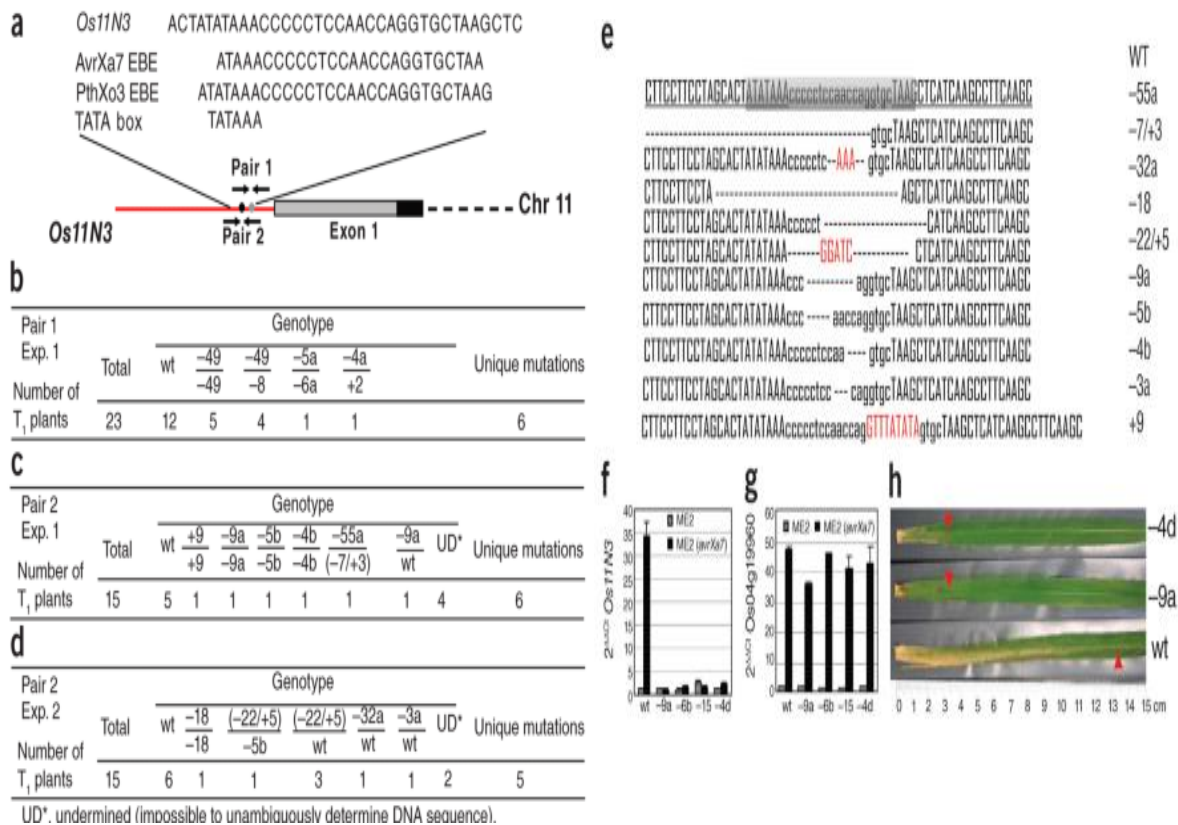
กลไกการทำงานคล้ายกับระบบ ZFNs ประกอบไปด้วยหน่วยของโปรตีนที่เรียกว่า TALENs (Transcription activator-like effector) มีคุณสมบัติในการจดจำหน่วยนิวคลีโอไทด์ได้ต่อหนึ่งหน่วยโปรตีน ซึ่งแตกต่างจาก ระบบ ZFNs ที่จดจำ 1 หน่วยโปรตีนต่อ 1 โคดอน (3 นิวคลีโอไทด์) (ภาพที่ 2.6) ทำให้ระบบ TALENs มีความจำเพาะต่อลำดับเบสที่ต้องการปรับแต่งมากกว่า เมื่อนำหน่วย TALENs มาเชื่อมต่อกับเอนไซม์ *FokI* จะทำให้ตัดดีเอ็นเอสายคู่ได้อย่างแม่นยำ และลดการผิดพลาดลงได้มาก



ภาพที่ 2.6 กลไกการทำงานของระบบ TALENs (Transcription activator-like effector nucleases) (ที่มา <https://www.youtube.com/watch?v=JArLDYv0Qw4>)

4.1 การประยุกต์ใช้ระบบ TALENs ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับแต่งยีน *OsSWEET14* เพื่อให้ต้านทานต่อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่ก่อโรคใบไหม้ในข้าว (ภาพที่ 2.7) โดยการทำให้เกิดการขาดหายไปของลำดับเบสบริเวณก่อน exon ที่ 1 ซึ่งข้าวที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์นี้ เมื่อถูกโจมตีโดยเชื้อแบคทีเรียจะมีลักษณะต้านทานเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวทั่วไป



ภาพที่ 2.7 การปรับแต่งยีน *OsSWEET14* เพื่อให้ต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคในข้าวด้วยเทคนิค TALENs (ที่มา Li et al., 2012)

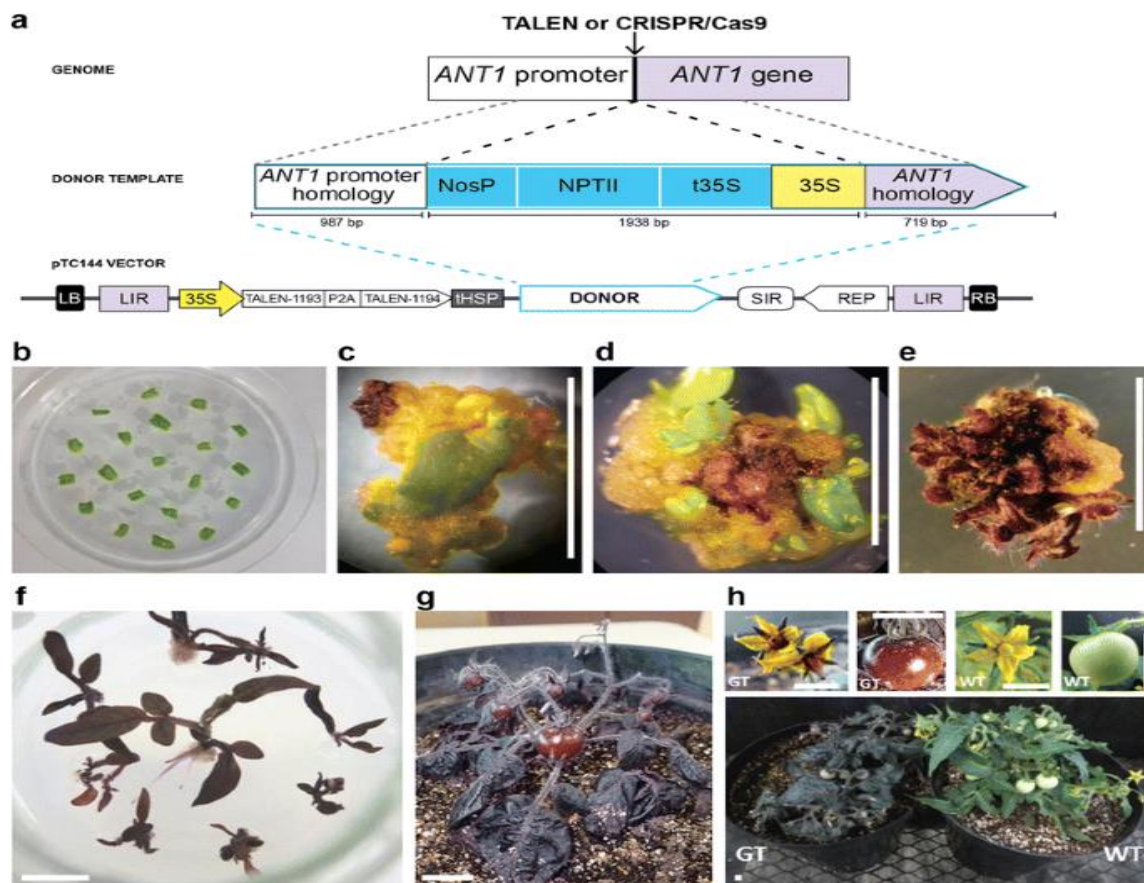
นอกจากนี้ยังมีการใช้ระบบ TALENs ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มียีนกรดโอเลอิกสูง ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยการปรับแต่งยีน FAD2-1A และ FAD2-1B ให้มีลำดับเบสที่ขาดหายไป 63 และ 23 เบสตามลำดับ (ภาพที่ 2.8) ทำให้ถั่วเหลืองมียีนกรดโอเลอิกสูง มีประโยชน์ ต่อร่างกายมากกว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัว ช่วยลดกระบวนการเติมหมู่ไฮโดรเจน (Hydrogenesis) ซึ่งเป็นที่มาของไขมันทรานส์ สาเหตุของโรคต่าง ๆ ต่อผู้บริโภค เช่น โรคเบาหวาน โรคความดัน โรคหัวใจ โรคอ้วน

(a)	Total Events	T0 genotyped	T0 mutants	Transmissible mutants to T1
FAD2_T04	35	19	4	3



ภาพที่ 2.8 การปรับแต่งยีน *FAD2-1A* และ *FAD2-1B* ในถั่วเหลืองด้วย TALENs (ที่มา Haun et al., 2014)

เช่นเดียวกับการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีสีม่วง เกิดจากการสะสมสารแอนโทไซยานินสูง โดยใช้ระบบ TALENs ปรับแต่งยีน *AN71* (Myb transcription factor) ให้มีการแสดงออกมากผิดปกติ ส่งผลให้มะเขือเทศผลิตแอนโทไซยานินมากกว่าปกติ เพื่อให้ได้มะเขือเทศที่มีต้นสีม่วงและผลเป็นสีม่วง (ภาพที่ 2.9)

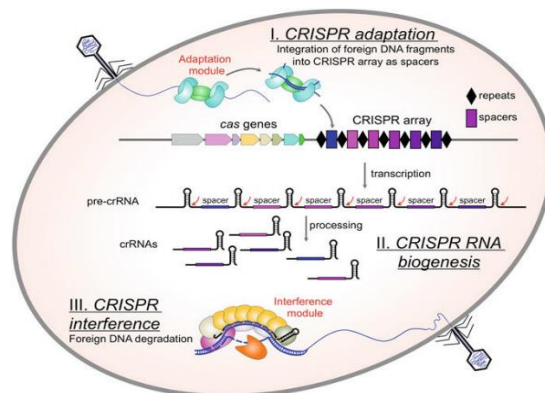


ภาพที่ 2.9 การปรับแต่งยีน *ANT1* ในมะเขือเทศให้ได้มะเขือเทศสีม่วงด้วยเทคนิค TALENs (ที่มา Čermák et al., 2015)

5 กลไกการทำงานของระบบ CRISPR-Cas9

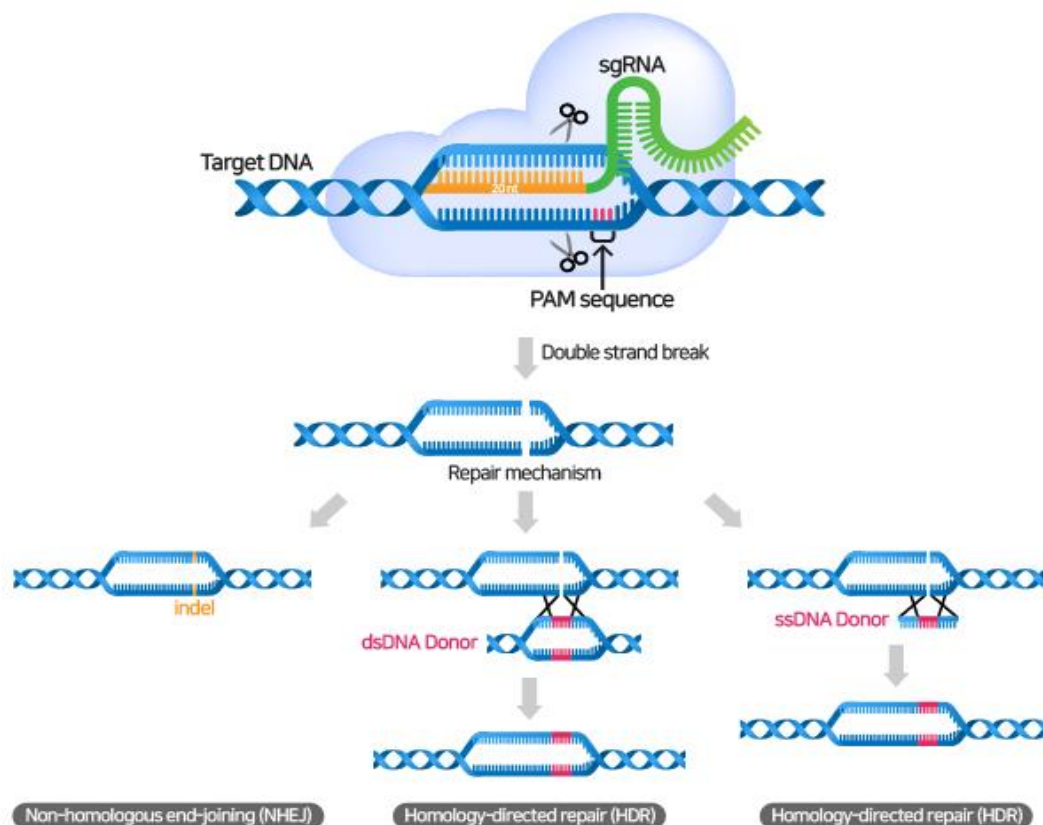
(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

ค้นพบจากระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรีย *Streptococcus Pyogenes* โดยการป้องกันการโจมตีจากไวรัส ที่จะปล่อยดีเอ็นเอสายคู่ (Double strand DNA) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เพื่อผลิตโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นแบคทีเรียจึงมีระบบภูมิคุ้มกันป้องกันการโจมตีจากไวรัส (Semenova E. and Severinov K., 2017)



ภายในจีโนมของแบคทีเรียมีตำแหน่งยีนที่เรียกว่า CRISPR locus (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats locus) เป็นลำดับเบสสั้น ๆ ซ้ำ ๆ กันอยู่ในตำแหน่งนี้ เมื่อมีลำดับเบสของไวรัสเข้ามาแบคทีเรียจะจำจดลำดับเบส และเพิ่มลำดับเบสคู่เหมือนแทรกเข้าไปในบริเวณ ดังกล่าว เมื่อมีการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ (mRNA) จากนั้นจะถูกย่อยเป็นสายสั้น ๆ ซึ่งภายใน

นั้นจะประกอบไปด้วยลำดับเบสของไวรัสและลำดับเบสของ CRISPR locus เรียกว่า crRNA (CRISPR RNA) ซึ่งมีหน้าที่จำเพาะกับ Transactivating CRISPR RNA (tracr RNA) เมื่อเข้าคู่กันและทำงานร่วมกับเอนไซม์ Cas9 จะเกิดระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อดีเอ็นเอจากไวรัสผู้บุกรุกเข้ามาสู่เซลล์แบบที่เรารู้จักอีกที จะมีการทำงานร่วมกันระหว่าง crRNA tracr RNA และ เอนไซม์ Cas9 จะตัดสายดีเอ็นเอ ของไวรัส แบบสายคู่ DSB (Double Strand Break) จึงเป็นที่มาของการสร้างระบบ CRISPR-Cas9 (ภาพที่ 2.10)

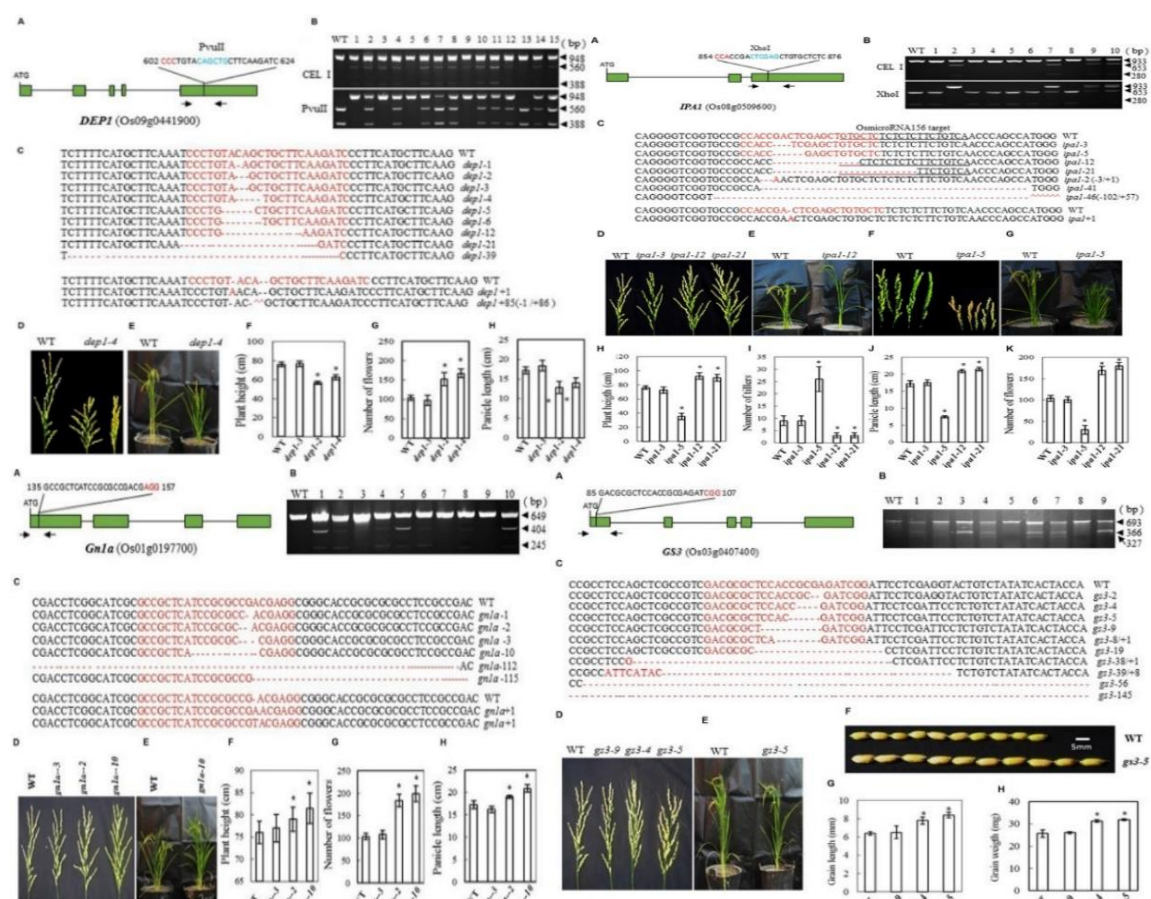


ภาพที่ 2.10 กลไกและระบบการทำงานของ CRISPR-Cas9

(ที่มา <https://eng.bioneer.com/c-life-science/service/crispr.html>)

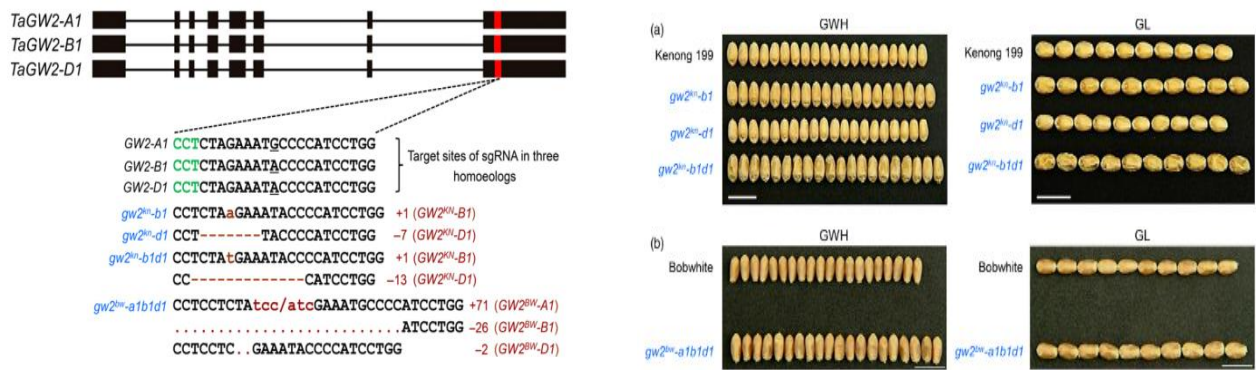
ปัจจุบันสามารถออกแบบ sgRNA เพื่อทำหน้าที่แทน crRNA และ tracr RNA ในธรรมชาติ ซึ่งสามารถทำงานร่วมกับโปรตีน Cas ในการตัดสายดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะ การออกแบบ sgRNA จะต้องคำนึงถึงลำดับเบส PAM (Protospacer adjacent motifs) ที่อยู่บนจีโนมที่ต้องการปรับแต่ง โดยมีเว็บไซต์ที่ช่วยในการคำนวณค่าการเกิดข้อผิดพลาด (Off target) ก่อนทำการออกแบบ sgRNA เช่น ซอฟต์แวร์ <http://chopchop.cbu.uib.no/> ลำดับเบสของ sgRNA ที่เหมาะสมควรมี off target ไม่เกิน 20 ตำแหน่ง ซึ่งโปรแกรมสามารถประเมินค่าดังกล่าวของ sgRNA ที่ออกแบบได้ว่าตัวใดมีโอกาสเกิด off target มากน้อยเพียงใด

การปรับแต่งยีน *Gn1a*, *DEP1*, *GS3* และ *IPA1* ในข้าวเพื่อให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2.11) โดยการทำให้ยีน *DEP1* และ *IPA1* ขาดหายไป ทำให้มีลักษณะต้นเตี้ย แต่มีการออกดอกมากกว่าสายพันธุ์ป่า (wild type) ในขณะที่การปรับแต่งยีน *Gn1a* ให้มีการขาดหายไป ทำให้ข้าวมีลักษณะต้นสูง และมีการออกดอกมากกว่าสายพันธุ์ป่า และการปรับแต่งลำดับเบสของยีน *GS3* ขาดหายไป ข้าวมีขนาดเมล็ดใหญ่ขึ้น มีน้ำหนักมากขึ้นและ มีจำนวนเมล็ดต่อช่อดอกมากกว่าสายพันธุ์ป่า แสดงให้เห็นว่าการใช้ระบบ CRISPR-Cas9 ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อการเกษตรโดยให้ผลผลิตมากขึ้น



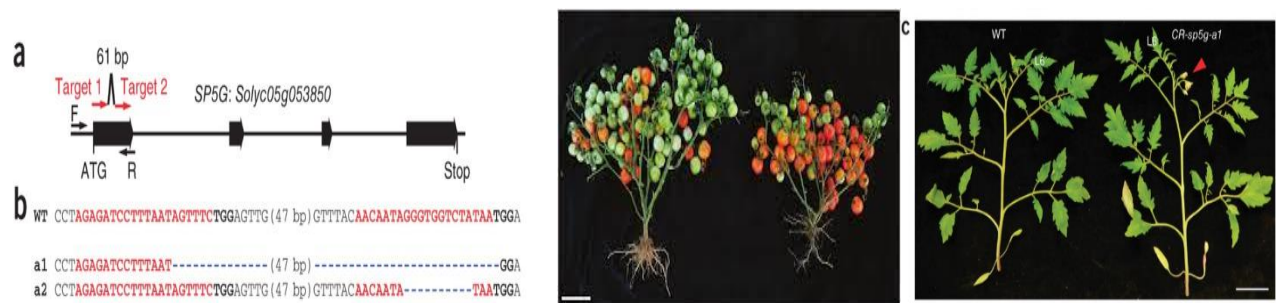
ภาพที่ 2.11 การปรับแต่งยีนในข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตด้วย CRISPR-Cas9 (ที่มา Li et. al., 2016)

26



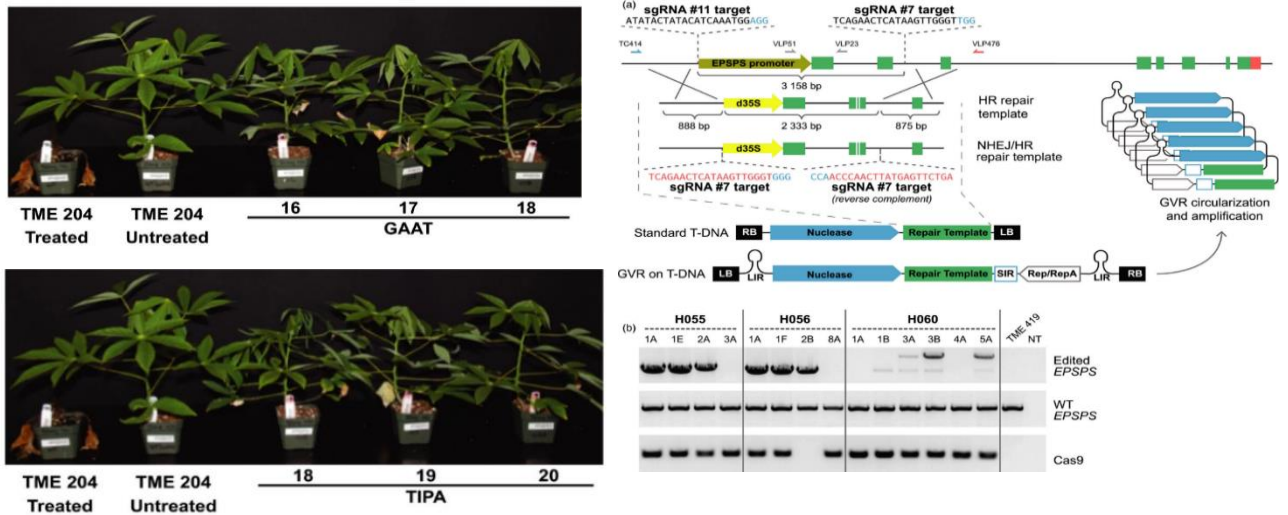
ภาพที่ 2.12 การปรับแต่งยีน *TaGW2* ในข้าวสาลีเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำหนักริ่เมล็ดและโปรตีนด้วย CRISPR-Cas9 (ที่มา Zhang Y. et al., 2018; Zhang Y. et al., 2018)

การปรับแต่งยีน *SP5G* (SELF PRUNING 5G) ในมะเขือเทศให้สามารถออกดอกได้ในทุกสภาวะแสง และสุกเร็วกว่าปกติ โดยการปรับแต่งให้เกิดการกลายพันธุ์แบบขาดหายไปของลำดับเบส (ภาพที่ 2.13) ทำให้มะเขือเทศออกดอกเร็วขึ้น ผลโตเร็วขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับมะเขือเทศสายพันธุ์ปกติ



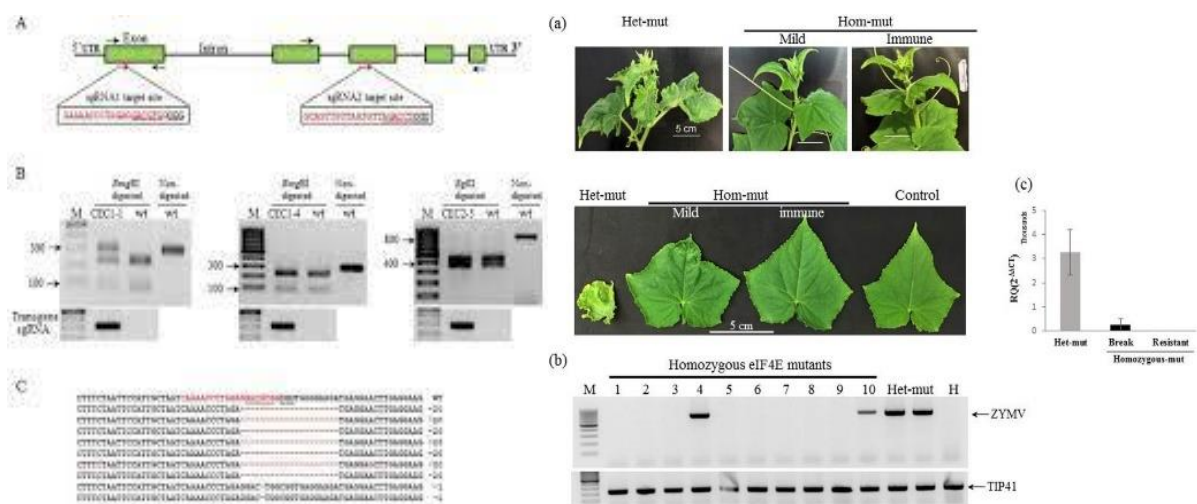
ภาพที่ 2.13 การปรับแต่งยีน *SP5G* ในมะเขือเทศควบคุมการออกดอกด้วย CRISPR-Cas9 (ที่มา Soyk, et al., 2017)

มีการใช้เทคโนโลยีการปรับแต่งยีนในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง ให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเซต โดยการถ่ายฝากยีน *EPSPS* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) พบว่ามันสำปะหลัง มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเซตเป็นอย่างมาก (ภาพที่ 2.14)



ภาพที่ 2.14 การปรับแต่งยีนในการสร้างพันธุ์มันสำปะหลังให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสตด้วย CRISPR-Cas9 (ที่มา Hummel et al., 2017)

เช่นเดียวกับการปรับแต่งจีโนมพืชให้ต้านทานต่อไวรัส เช่น การปรับแต่งยีน *eIF4E* (Eukaryotic translation initiation factor; 4E) ในแตงกวา เป็นการปรับแต่งให้มีการขาดหายไป 1-3 เบส บนยีน 2 ตำแหน่ง บริเวณ N-Terminal และ C-Terminal เมื่อขยายพันธุ์จากรุ่นที่ 1 ไปถึงรุ่นที่ 3 ไม่เกิดโฮโมไฮกีสสำหรับการกลายพันธุ์อื่น *eIF4E* ทำให้แตงกวารุ่นที่ 3 มีความสามารถในการต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนของมะละกอ (ภาพที่ 2.15) ซึ่งถือเป็นการพัฒนาสายพันธุ์ต้านทานไวรัสโดยใช้เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมครั้งแรก โดยที่ไม่หลงเหลือชิ้นยีนที่ได้จากการถ่ายยีน เป็นต้นแบบในการพัฒนาพืชต้านทานไวรัสในพืชชนิดอื่น



ภาพที่ 2.15 การปรับปรุงพันธุ์แตงกวาต้านทานต่อไวรัสด้วย CRISPR-Cas9 (ที่มา Chandrasekaran, et al., 2016)

6. การส่งถ่ายยีนในระบบการปรับแต่งจีโนมเข้าสู่เซลล์พืช

แบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

6.1. ดีเอ็นเอ (DNA-based) ทำได้โดยวิธีการถ่ายยีนโดยแบคทีเรีย (*Agrobacterium*-mediated transformation) การใช้เครื่องยิงอนุภาค (Particle bombardment) และการใช้ไวรัส (Viral infection) ทำโดยการถ่ายดีเอ็นเอของยีน Cas9 และ single guide RNA (sgRNA) โดยมีระบบของ Cas9 expression system เพื่อให้ยีนไปแสดงออกในเซลล์พืชวิธีนี้สามารถถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อของพืชได้

6.2. อาร์เอ็นเอ (RNA-based) ทำได้โดยการถ่ายอาร์เอ็นเอโดยตรง (Direct transfection) โดยการถ่ายอาร์เอ็นเอเข้าสู่โปรโตพลาสต์ (Protoplast transformation) โดยการถ่าย Cas9-mRNA และ synthetic sgRNA เข้าสู่เซลล์พืช แคลลัสหรือโปรโตพลาสต์

6.3. โปรตีน (Protein-based) หรือวิธีใช้ไรโบนิวคลีโอโปรตีน (Ribonucleoprotein [RNP] transfection) ทำได้โดยการถ่ายโปรตีนโดยตรง (Direct transfection) โดยการถ่าย โปรตีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ การใช้เครื่องยิงอนุภาค การใช้กระแสไฟฟ้า (Electroporation) โดยการถ่ายโปรตีน Cas9 ที่แยกบริสุทธิ์ ร่วมกับ synthetic sgRNA เข้าสู่เซลล์พืช แคลลัส หรือโปรโตพลาสต์

เอกสารอ้างอิง

- Ahmad A, Munawar N, Khan Z, Qusmani AT, Khan SH, Jamil A, Ashraf S, Ghouri MZ, Aslam S, Mubarik MS, Munir A, Sultan Q, Abd-Elsalam KA and Qari SH. 2021. An Outlook on Global Regulatory Landscape for Genome-Edited Crops. *Int J Mol Sci.* 22(21):11753. doi: 10.3390/ijms222111753.
- Ainley WM, Sastry-Dent L, Welter ME, Murray MG, Zeitler B, Amora R, Corbin DR, Miles RR, Arnold NL, Strange TL, Simpson MA, Cao Z, Carroll C, Pawelczak KS, Blue R, West K, Rowland LM, Perkins D, Samuel P, Dewes CM, Shen L, Sriram S, Evans SL, Rebar EJ, Zhang L, Gregory PD, Urnov FD, Webb SR and Petolino JF. 2013. Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnol J.* 11(9):1126-34. doi: 10.1111/pbi.12107.
- Čermák T, Baltes NJ, Čegan R, Zhang Y and Voytas DF. 2015. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol.* 16:232.
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T and Gal-On A. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol.* 17(7):1140-53. doi: 10.1111/mpp.12375.
- Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E et al. 2014. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J.*; 12:934-40.
- Hummel AW, Chauhan RD, Cermak T, Mutka AM, Vijayaraghavan A, Boyher A, Starker

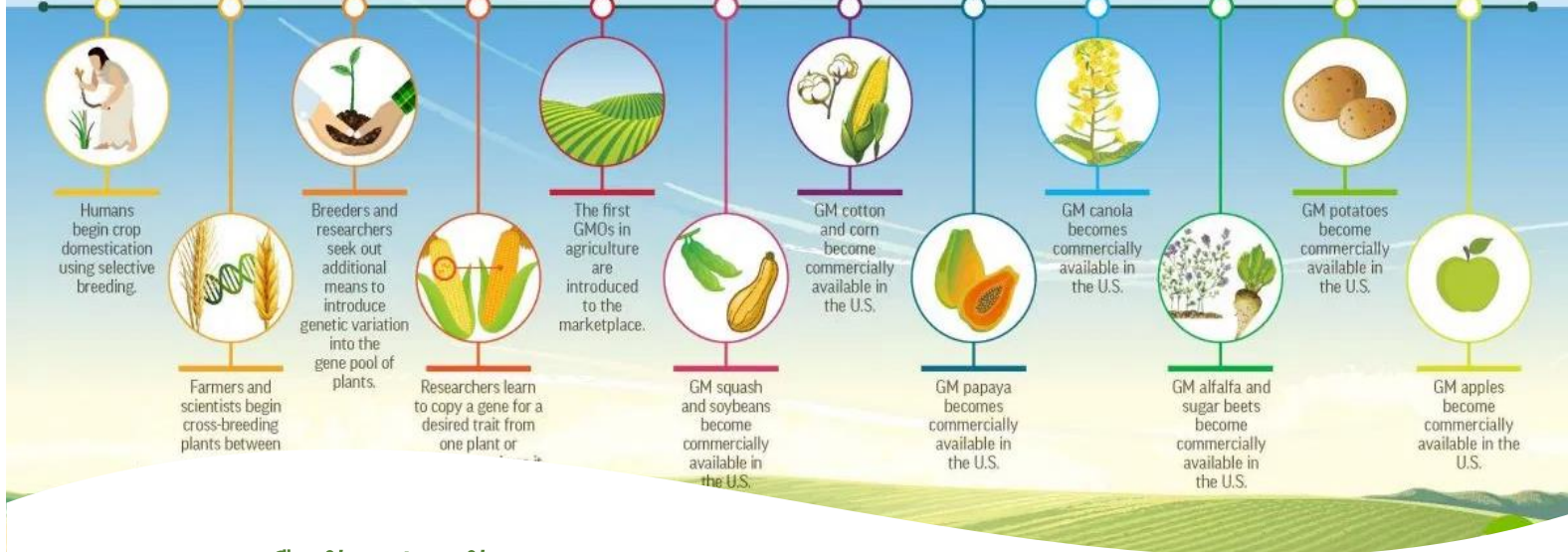
- CG, Bart R, Voytas DF and Taylor NJ. 2018. Allele exchange at the EPSPS locus confers glyphosate tolerance in cassava. *Plant Biotechnol J.* 16(7):1275-1282. doi: 10.1111/pbi.12868.
- Li M, Li X, Zhou Z, et al. 2016. Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Front Plant Sci.* 7:377. doi:10.3389/fpls.2016.00377
- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP and Yang B. 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol.*; 30:390–2.
- Palpant, N. and Dudzinski, D. 2013. Zinc finger nucleases: looking toward translation. *Gene Ther* 20;121–127. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.2>
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, et al. 2009. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature.*; 459:437–41.
- Soyk S, Müller NA, Park SJ, Schmalenbach I, Jiang K, Hayama R, Zhang L, Van Eck J, Jiménez-Gómez JM and Lippman ZB. 2017. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nat Genet.* 49(1):162-168. doi: 10.1038/ng.3733.
- Zhang Y, Li D, Zhang D, Zhao X, Cao X, Dong L, Liu J, Chen K, Zhang H, Gao C. and Wang D. 2018. Analysis of the functions of TaGW2 homoeologs in wheat grain weight and protein content traits. *Plant J.* Jun;94(5):857-866. doi: 10.1111/tpj.13903.



บทที่ 3 สถานภาพของ พืชดัดแปลงพันธุกรรม (GMOs) ในปัจจุบัน

เรียบเรียงโดย รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
 กรมวิชาการเกษตร 2565



1. พืชดัดแปลงพันธุกรรม

(Genetically Modified Organisms หรือ GMOs)

สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม หรือ จีเอ็มโอ ย่อมาจากคำภาษาอังกฤษว่า Genetically Modified Organisms (GMOs) หมายถึง สิ่งมีชีวิตใด ๆ ที่ได้รับการถ่ายฝากสารพันธุกรรมจากการตัดต่อยีน (Genes) ให้สิ่งมีชีวิตนั้นมีคุณลักษณะที่ต้องการ โดยสารพันธุกรรมอาจได้มาจาก สิ่งมีชีวิตที่ใกล้ชิดกันหรือต่างชนิดพันธุ์ ตัวอย่างเช่น การนำยีนที่แสดง คุณสมบัติทนทานต่อความหนาวเย็นจากปลาข้าวโลก มาดัดแปลงเข้ากับยีน ของมะเขือเทศ เพื่อสร้างมะเขือเทศชนิดใหม่ที่สามารถเพาะปลูกได้ในพื้นที่มี อากาศหนาวเย็น เป็นต้น



ปัจจุบันมีการเรียกชื่อได้หลายชื่อ เช่น พืชจีเอ็มโอ พืชเทคโนโลยีชีวภาพ พืชไบโอเทค พืช ดัดแปลงพันธุกรรม พืชดัดแปรพันธุกรรม เป็นต้น เทคโนโลยีการดัดแปลงพันธุกรรมได้รับการพัฒนาขึ้น โดยมีจุดประสงค์หลักในการยกระดับคุณภาพอาหาร ยา และเทคโนโลยีทางการแพทย์ เพื่อรองรับ จำนวนประชากรโลกที่เพิ่มมากขึ้นในทุก ๆ วัน. นอกจากนี้ สิ่งมีชีวิตที่ได้จากการดัดแปลงพันธุกรรม สามารถช่วยเพิ่มความหลากหลายทางชีวภาพ ลดภาวะโลกร้อน รักษาสมดุลสภาพธรรมชาติ เพิ่ม ศักยภาพให้กับพืชและสัตว์ ตลอดจนลดต้นทุนการผลิต (Sharma et al. 2022) (ภาพที่ 3.1)

เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และเข้ามามีบทบาทสำคัญในการ สร้างความมั่นคงทางอาหาร โดยเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมหรือที่เรียกว่า Genome Editing (GE) ถือว่าเป็นเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ที่ได้รับการยอมรับในการนำมาใช้ในพัฒนาสายพันธุ์ของพืชผลทาง การเกษตร โดยไม่จำเป็นต้องฝากถ่ายยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นสอดแทรกในสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการ เป็นวิธีการ ที่ทำให้สารพันธุกรรมขาดหายไป (Deletion) หรือเพิ่มลำดับสารพันธุกรรมใหม่ (Insertion) หรือ การ สลับเบสที่ตำแหน่งเดิมเพียงตำแหน่งเดียว (Substitution) บนบริเวณยีนที่เราต้องการ ทำให้มีการ แสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป



tolerance) เช่น ฝ้ายบีทีและข้าวโพดบีที พืชทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Stress tolerance) เช่น ความแห้งแล้ง (ข้าวโพด อ้อย และข้าวสาลี) นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มคุณค่าทางอาหาร (Modified product quality) เช่น วิตามินเอในข้าวสีทอง และ โลโคปิ่นในสับปะรดสีชมพู ลดการเกิดสีน้ำตาล (Non-Browning) ทำให้สามารถวางขายได้นานขึ้น. เช่น แอปเปิ้ล

แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันมีเพียง 8 ลักษณะสำคัญทางการเกษตรที่ได้รับการอนุมัติให้ค้าขายเชิงพาณิชย์ ได้แก่ ความทนทานต่อความเครียด (Abiotic stress tolerance) การเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต/ผลผลิต (Altered growth/yield) ความต้านทานโรค (Disease resistance) ความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช (Herbicide tolerance) ความต้านทานแมลง (Insect resistance) การเพิ่มคุณภาพของสารอาหาร (Modified product quality) ความต้านทานไส้เดือนฝอย (Nematode resistance) และการควบคุมระบบการผสมเกสร (Pollination control system) โดยรายละเอียดชนิดพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีรายงานในฐานข้อมูลของ ISAAA (<http://www.isaaa.org>) (ตารางที่ 3.2)

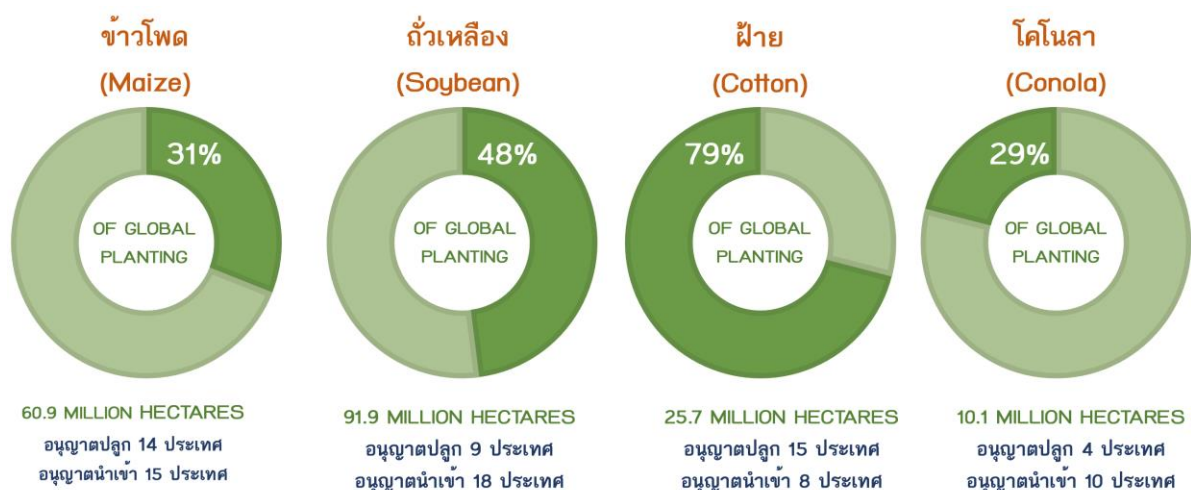


ตารางที่ 3.1 ลักษณะสำคัญทางการเกษตรที่ได้รับการปรับแต่งของพืชดัดแปลงพันธุกรรม

ลำดับ	GM Trait	ลำดับ	GM Trait
1	2,4-D herbicide tolerance	24	Lowered Reducing Sugars
2	Altered lignin production	25	Male sterility
3	Anti-allergy	26	Mannose metabolism
4	Antibiotic resistance	27	Mesotrione Herbicide Tolerance
5	Coleopteran insect resistance	28	Modified alpha amylase
6	Delayed fruit softening	29	Modified amino acid
7	Delayed ripening/senescence	30	Modified flower color
8	Dicamba herbicide tolerance	31	Modified fruit color
9	Drought stress tolerance	32	Modified oil/fatty acid
10	Enhanced Photosynthesis/Yield	33	Modified starch/carbohydrate
11	Enhanced Provitamin A Content	34	Multiple insect resistance
12	Fertility restoration	35	Nematode Resistance
13	Foliar Late Blight Resistance	36	Nicotine reduction
14	Glufosinate herbicide tolerance	37	Non-Browning
15	Glyphosate herbicide tolerance	38	Nopaline synthesis
16	Hemipteran Insect Resistance	39	Oxynil herbicide tolerance
17	Imazamox herbicide tolerance	40	Phytase production
18	Increased Ear Biomass	41	Reduced Black Spot
19	Isoxaflutole herbicide tolerance	42	Sulfonylurea herbicide tolerance
20	Late blight disease resistance	43	Tolerance to HPPD inhibiting herbicides
21	Lepidopteran insect resistance	44	Viral disease resistance
22	Low Gossypol	45	Visual marker
23	Lowered Free Asparagine	46	Volumetric Wood Increase

3. การปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมทั่วโลก (GMOs around the World)

พืชดัดแปลงพันธุกรรม หรือพืชเทคโนโลยีชีวภาพ เริ่มมีการปลูกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535-2565 (ค.ศ. 1992-2022) ปัจจุบันมีทั้งหมด 32 พืชปลูก (Crops) จำนวน 541 Events และ อนุมัติให้ปลูกทั้งหมด 45 ประเทศ (ISAAA, 2022, <https://www.isaaa.org/>) (ภาพที่ 3.3 และ ตารางที่ 3.2) เป็นเวลากว่า 30 ปี พืชดัดแปลงพันธุกรรมถูกผลิตออกสู่ตลาด สร้างผลประโยชน์อย่างมากต่อภาคการเกษตร เนื่องจากเป็นทางเลือกในการแก้ปัญหาเกี่ยวกับความยั่งยืนของอาหารและสิ่งแวดล้อม โดยสามารถสร้างสายพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อโรคพืชและแมลงศัตรูพืช และมีส่วนทำให้เกิดนวัตกรรมด้านโภชนาการและยารักษาโรคของมนุษย์ที่ก้าวล้ำ พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปลูกมากที่สุด 4 อันดับได้แก่ ถั่วเหลือง (91.9 ล้านเฮกตาร์) ตามด้วยข้าวโพด (60.9 ล้านเฮกตาร์) ฝ้าย (25.7 ล้านเฮกตาร์) และ คาโนลา (10.1 ล้านเฮกตาร์)



ภาพที่ 3.2 พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปลูกมากที่สุด 4 อันดับ

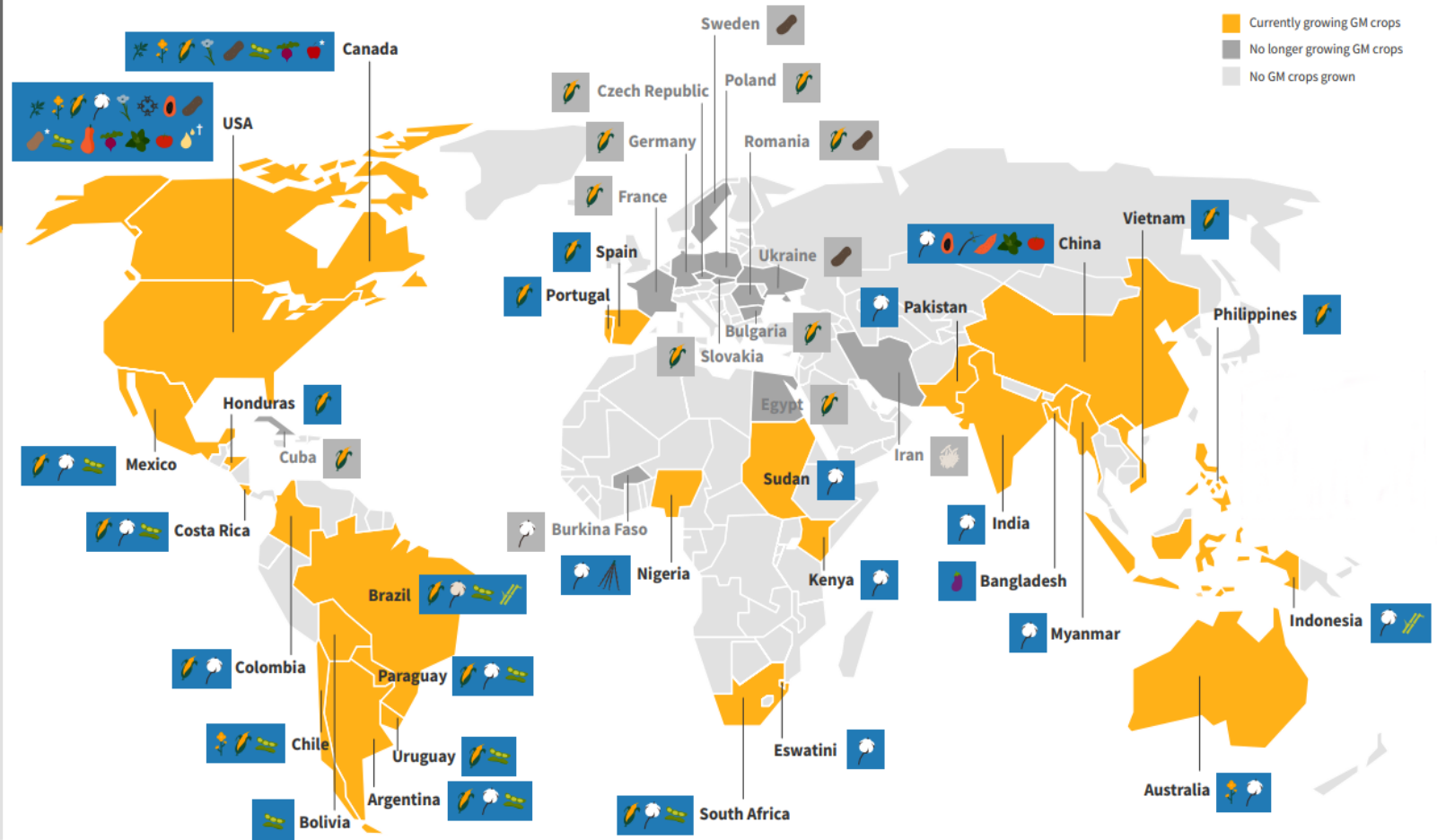
แหล่งที่มา: <https://www.isaaa.org/blog/entry/default.asp?BlogDate=5/11/2022>

22 Crops, 41 Countries Planted Their First Genetically-Altered Crop, 1992–2020

The map shows where genetically engineered (GE) crops were approved, grown and commercialized at one time — 22 crops in 41 countries. Some cultivations have been suspended. The countries highlighted in gray no longer grow GE crops.



* Crop developed using a New Breeding Technique
† Crop developed using gene editing



This infographic was composed from a variety of resources, some of which presented conflicting data: Genetic Literacy Project's Global Gene Editing Regulation Tracker, ISAAA Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops; GMOs Globally by GMO Answers; List of genetically modified crops. Infographic by Kayleen Schreiber, PhD.

Genetic Literacy Project
SCIENCE NOT IDEOLOGY

ภาพที่ 3.3 ประเทศที่มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมทั่วโลก มีทั้งหมด 32 พืช จำนวน 45 ประเทศ

ตารางที่ 3.2 ประเทศที่ได้รับอนุมัติให้มีการนำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีทั้งหมด 541 events ทั้งหมด 45 ประเทศ ดังนี้

ลำดับ	ประเทศ	Crops (events)	Total events
1	อาร์เจนตินา (Argentina)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> . : (1 Event) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (7 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (52 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (18 Events) Wheat - <i>Triticum aestivum</i> : (1 Event)	80
2	ออสเตรเลีย (Australia)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> : (3 Events) Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (25 Events) Carnation - <i>Dianthus caryophyllus</i> : (12 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (28 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (29 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : 19 Events Rice - <i>Oryza sativa</i> L. : (2 Events) Rose - <i>Rosa hybrida</i> : (1 Event) Safflower - <i>Carthamus tinctorius</i> L. : (2 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (19 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (2 Events) Wheat - <i>Triticum aestivum</i> : (2 Events)	144
3	บังกลาเทศ (Bangladesh)	Eggplant - <i>Solanum melongena</i> : (1 Event)	1
4	โบลิเวีย (Bolivia)	Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (1 Event)	1
5	บราซิล (Brazil)	Bean - <i>Phaseolus vulgaris</i> : (1 Event) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (23 Events) Eucalyptus - <i>Eucalyptus</i> sp. : (1 Event) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (64 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (19 Events) Sugarcane - <i>Saccharum</i> sp. : (3 Events) Wheat - <i>Triticum aestivum</i> : (1 Event)	112
6	บูร์กินาฟาโซ (Burkina Faso)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (1 Event)	1
7	แคนาดา (Canada)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> : (3 Events) Apple - <i>Malus x Domestica</i> : (3 Events) Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (22 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (27 Events) Flax - <i>Linum usitatissimum</i> L. : (1 Event) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (69 Events) Papaya - <i>Carica papaya</i> : (1 Event) Pineapple - <i>Ananas comosus</i> : (1 Event) Polish canola - <i>Brassica rapa</i> : (4 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : (28 Events) Rice - <i>Oryza sativa</i> L. : (2 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (23 Events) Squash - <i>Cucurbita pepo</i> : (1 Event) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (2 Events)	192

ลำดับ	ประเทศ	Crops (events)	Total events
		Sugarcane - <i>Saccharum sp.</i> : (1 Event) Tomato - <i>Lycopersicon esculentum</i> : (4 Events)	
8	ชิลี (Chile)	Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (1 Event) Maize - <i>Zea mays L.</i> : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (1 Event)	3
9	จีน China	Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (14 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum L.</i> : (11 Events) Maize - <i>Zea mays L.</i> : (24 Events) Papaya - <i>Carica papaya</i> : (1 Event) Petunia - <i>Petunia hybrida</i> : (1 Event) Poplar - <i>Populus sp.</i> : (2 Events) Rice - <i>Oryza sativa L.</i> : (2 Events) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (17 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (1 Event) Sweet pepper - <i>Capsicum annuum</i> : (1 Event) Tomato - <i>Lycopersicon esculentum</i> : (3 Events)	77
10	โคลอมเบีย (Colombia)	Carnation - <i>Dianthus caryophyllus</i> : (8 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum L.</i> : (17 Events) Flax - <i>Linum usitatissimum L.</i> : (1 Event) Maize - <i>Zea mays L.</i> : (55 Events) Rice - <i>Oryza sativa L.</i> : (2 Events) Rose - <i>Rosa hybrida</i> : (2 Events) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (21 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (1 Event) Wheat - <i>Triticum aestivum</i> : (2 Events)	109
11	คอสตาริกา (Costa Rica)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum L.</i> : (17 Events) Maize - <i>Zea mays L.</i> : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (2 Events)	20
12	คิวบา (Cuba)	Maize - <i>Zea mays L.</i> : (1 Event)	1
13	อียิปต์ Egypt	Maize - <i>Zea mays L.</i> : (1 Event)	1
14	เอสวาตินี (eSwatini)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum L.</i> : (2 Events)	2
15	เอธิโอเปีย (Ethiopia)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum L.</i> : (2 Events)	2
16	สหภาพยุโรป (European Union)	Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (14 Events) Carnation - <i>Dianthus caryophyllus</i> : (7 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum L.</i> : (15 Events) Maize - <i>Zea mays L.</i> : (55 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum L.</i> : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (22 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (1 Event) Tobacco - <i>Nicotiana tabacum L.</i> : (1 Event)	116
17	กานา (Ghana)	Cowpea - <i>Vigna unguiculata</i> : (1 Event)	1
18	ฮอนดูรัส (Honduras)	Maize - <i>Zea mays L.</i> : (7 Events) Rice - <i>Oryza sativa L.</i> : (1 Event)	8
19	อินเดีย (India)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum L.</i> : (6 Events) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (5 Events)	11
20	อินโดนีเซีย (Indonesia)	Maize - <i>Zea mays L.</i> : (10 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum L.</i> : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (8 Events) Sugarcane - <i>Saccharum sp.</i> : (3 Events)	22

ลำดับ	ประเทศ	Crops (events)	Total events
21	อิหร่าน (Iran)	Maize - <i>Zea mays</i> L. : (5 Events) Rice - <i>Oryza sativa</i> L. : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (12 Events)	18
22	ญี่ปุ่น (Japan)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> : (5 Events) Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (16 Events) Carnation - <i>Dianthus caryophyllus</i> : (8 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (34 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (88 Events) Papaya - <i>Carica papaya</i> : (1 Event) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : (9 Events) Rose - <i>Rosa hybrida</i> : (2 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (30 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (3 Events)	196
23	มาเลเซีย (Malaysia)	Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (2 Events) Carnation - <i>Dianthus caryophyllus</i> : (8 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (4 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (18 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (11 Events)	44
24	เม็กซิโก (Mexico)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> : (5 Events) Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (14 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (33 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (85 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : (16 Events) Rice - <i>Oryza sativa</i> L. : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (28 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (1 Event) Tomato - <i>Lycopersicon esculentum</i> : (5 Events)	188
25	พม่า (Myanmar)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (1 Event)	1
26	นิวซีแลนด์ (New Zealand)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> : (3 Events) Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (16 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (23 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (29 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : (19 Events) Rice - <i>Oryza sativa</i> L. : (2 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (18 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (2 Events) Wheat - <i>Triticum aestivum</i> : (2 Events)	114
27	ไนจีเรีย (Nigeria)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (1 Event) Cowpea - <i>Vigna unguiculata</i> : (1 Event) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (15 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (11 Events) Wheat - <i>Triticum aestivum</i> : (1 Event)	29
28	นอร์เวย์ (Norway)	Carnation - <i>Dianthus caryophyllus</i> : (11 Events)	11
29	ปากีสถาน (Pakistan)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (2 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (4 Events)	6
30	ปานามา (Panama)	Maize - <i>Zea mays</i> L. : (1 Event)	1

ลำดับ	ประเทศ	Crops (events)	Total events
31	ปารากวัย (Paraguay)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (4 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (15 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (3 Events)	22
32	สาธารณรัฐฟิลิปปินส์ (Philippines)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> : (4 Events) Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (6 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (16 Events) Eggplant - <i>Solanum melongena</i> : (1 Event) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (64 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : (11 Events) Rice - <i>Oryza sativa</i> L. : (2 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (24 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (1 Event)	129
33	รัสเซีย (Russia)	Maize - <i>Zea mays</i> L. : (15 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : (2 Events) Rice - <i>Oryza sativa</i> L. : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (9 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (1 Event)	28
34	สิงคโปร์ (Singapore)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> : (3 Events) Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (2 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (4 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (17 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (11 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (1 Event)	38
35	แอฟริกาใต้ (South Africa)	Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (5 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (10 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (42 Events) Rice - <i>Oryza sativa</i> L. : (1 Event) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (14 Events)	72
36	สาธารณรัฐเกาหลี (South Korea)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> : (5 Events) Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (15 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (30 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (83 Events) Potato - <i>Solanum tuberosum</i> L. : (8 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (28 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (1 Event)	170
37	สาธารณรัฐซูดาน (Sudan)	Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (1 Event)	1
38	สวิตเซอร์แลนด์ (Switzerland)	Maize - <i>Zea mays</i> L. : (3 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (1 Event)	4
39	ไต้หวัน (Taiwan)	Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (10 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum</i> L. : (27 Events) Maize - <i>Zea mays</i> L. : (84 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (28 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (1 Event)	150
40	ประเทศไทย (Thailand)	Maize - <i>Zea mays</i> L. : (12 Events) Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (3 Events)	15
41	ตุรกี (Turkey)	Maize - <i>Zea mays</i> L. : 23 Events Soybean - <i>Glycine max</i> L. : (13 Events)	36
42	สหรัฐอเมริกา (United States)	Alfalfa - <i>Medicago sativa</i> : (3 Events)	215

ลำดับ	ประเทศ	Crops (events)	Total events
	States)	Apple - <i>Malus x Domestica</i> : (3 Events) Argentine Canola - <i>Brassica napus</i> : (22 Events) Chicory - <i>Cichorium intybus</i> : (3 Events) Cotton - <i>Gossypium hirsutum L.</i> : (32 Events) Creeping Bentgrass - <i>Agrostis stolonifera</i> : (1 Event) Flax - <i>Linum usitatissimum L.</i> : (1 Event) Maize - <i>Zea mays L.</i> : (47 Events) Melon - <i>Cucumis melo</i> : (2 Events) Papaya - <i>Carica papaya</i> : (3 Events) Petunia - <i>Petunia hybrida</i> : (1 Event) Pineapple - <i>Ananas comosus</i> : (1 Event) Plum - <i>Prunus domestica</i> : (1 Event) Potato - <i>Solanum tuberosum L.</i> : (44 Events) Rice - <i>Oryza sativa L.</i> : (5 Events) Rose - <i>Rosa hybrida</i> : (2 Events) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (26 Events) Squash - <i>Cucurbita pepo</i> : (2 Events) Sugar Beet - <i>Beta vulgaris</i> : (3 Events) Sugarcane - <i>Saccharum sp.</i> : (2 Events) Tobacco - <i>Nicotiana tabacum L.</i> : (1 Event) Tomato - <i>Lycopersicon esculentum</i> : (8 Events) Wheat - <i>Triticum aestivum</i> : (2 Events)	
43	อุรุกวัย (Uruguay)	Maize - <i>Zea mays L.</i> : (10 Events) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (7 Events)	17
44	เวียดนาม (Vietnam)	Maize - <i>Zea mays L.</i> : (14 Events) Soybean - <i>Glycine max L.</i> : (8 Events)	22
45	สาธารณรัฐแซมเบีย (Zambia)	Maize - <i>Zea mays L.</i> : (6 Events)	6



3.1 พืชดัดแปลงพันธุกรรมในแอฟริกา (GMO Crops in Africa)

คณะกรรมการระหว่างรัฐบาลว่าด้วยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ หรือ IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) คาดการณ์ว่าจากสภาพอากาศที่ยังคงอุ่นขึ้นทุกปี ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนของปริมาณน้ำฝนในแอฟริกาเพิ่มขึ้น โดยทางตอนใต้ของแอฟริกาและจะงอยแอฟริกา (Horn of Africa) ที่ติดกับทะเลอาหรับทางตะวันออกเฉียงเหนือ มีแนวโน้มจะประสบภัยแล้งเนื่องจากปริมาณน้ำฝนที่ลดลงทุกปี มากถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลกระทบอย่างมากสำหรับเกษตรกรหลายล้านคน เนื่องจากต้องอาศัยน้ำฝนในการทำการเกษตรของพืชผล ดังนั้นเทคโนโลยีชีวภาพจึงมีบทบาทสำคัญในการแก้ไขปัญหา เพื่อเพิ่มศักยภาพในการต้านทานต่อศัตรูพืชและวัชพืช และคุณค่าทางโภชนาการของพืชผลหลักบางประเภท เพื่อแก้ไขปัญหาการขาดสารอาหารในประชากรของประเทศกำลังพัฒนาจำนวนมาก

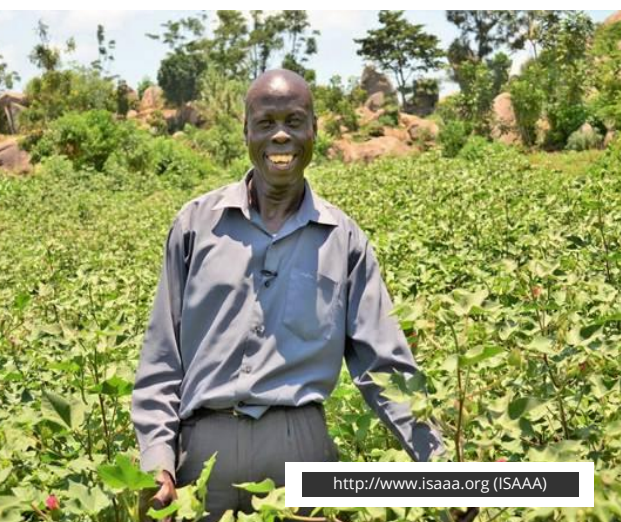
ข้อมูลจาก ISAAA รายงานว่าแอฟริกาใต้เป็นหนึ่งในสิบประเทศกำลังพัฒนาที่ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมมากที่สุด โดยเฉพาะปลูกข้าวโพด ถั่วเหลือง และฝ้าย มีพื้นที่ปลูกเกือบ 6.7 ล้านเอเคอร์ โดยพื้นที่ปลูกในปี 2019 มีพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในปีเดียวกันนั้น เกษตรกรประมาณ 150,000 คน ในชุดานปลูกฝ้ายดัดแปลงพันธุกรรมได้มากกว่า 580,000 เอเคอร์ (1,467,400 ไร่) และมี 11 ประเทศ ได้แก่ บุร์กินาฟาโซ เอธิโอเปีย กานา เคนยา มาลาวี โมซัมบิก ไนจีเรีย แอฟริกาใต้ สวาซิแลนด์ แทนซาเนีย และยูกันดา ทำการทดลองภาคสนามกับพืช 10 ชนิด (Crops) ที่มี 16 ลักษณะ (Traits) ที่เกี่ยวข้องกับความทนแล้ง ความทนเค็ม ประสิทธิภาพการใช้ไนโตรเจนและปริมาณสารอาหารที่เพิ่มขึ้น

โดยข้าวโพดเป็นพืชที่ปลูกกันมากที่สุดในแอฟริกา ซึ่งโครงการ the TELA Maize Project เป็นความพยายามอย่างต่อเนื่องในการพัฒนาและจำหน่ายพันธุ์ข้าวโพดสายพันธุ์ทนแล้ง (Transgenic drought-tolerance) และต้านทานต่อแมลงศัตรูพืช (Insect tolerance) ของเกษตรกรในอนุภูมิภาคทะเลทรายซาฮารา (Sub-Saharan Africa)

นอกจากนี้ยังมีการวิจัยและพัฒนาที่น่าโดยมูลนิธิเทคโนโลยีการเกษตรแห่งแอฟริกา (African Agricultural Technology Foundation หรือ AATF) ยังคงเดินหน้าปรับปรุงพันธุ์พืชผลหลักอื่น ๆ ในแอฟริกา รวมถึงถั่วพุ่ม (Cowpea) และข้าว (Rice) นักวิทยาศาสตร์ในไนจีเรีย กานา และบุร์กินาฟาโซ กำลังร่วมกันวิจัยพัฒนาถั่วพุ่มบีที (Bt cowpea) ที่ต้านทานต่อแมลงหนอนเจาะฝัก ซึ่งสามารถทำลายพืชผลของเกษตรกรได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์



<http://www.isaaa.org> (ISAAA)



สำหรับการบริโภคข้าวในแอฟริกาที่มีอัตราเพิ่มขึ้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมา โดยข้าวกลายเป็นพืชผลหลักที่สำคัญในทวีปแอฟริกา แต่อย่างไรก็ตามเกษตรกรบางรายได้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากความเค็มของดินสูง น้ำไม่เพียงพอ และการขาดปุ๋ยไนโตรเจน ดังนั้นมูลนิธิ AATF ร่วมกับศูนย์เกษตรเขตร้อนระหว่างประเทศ (International Center for Tropical Agriculture) และระบบการวิจัยการเกษตรแห่งชาติ (National Agricultural Research Systems) ของกานา ไนจีเรีย และยูกันดา กำลังอยู่ระหว่างวิจัยและพัฒนาข้าวปรับแต่งพันธุกรรมแบบรวมยีน (Stacked genes) ที่มีลักษณะเด่นด้านประสิทธิภาพการใช้ไนโตรเจน (Nitrogen-use-efficient traits) ประหยัดน้ำ (Water-use-efficient traits) และทนต่อน้ำเค็ม (Saline-tolerant traits)





3.2 พืชดัดแปลงพันธุกรรมในเอเชีย-แปซิฟิก (GMO Crops in Asian-Pacific)

ในปี พ.ศ. 2562 มากกว่า 9 ประเทศในแถบเอเชียแปซิฟิก (Asian-Pacific countries) ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยอินเดียเป็นผู้ผลิตฝ้ายอันดับหนึ่งของโลก ตามด้วยประเทศปากีสถาน จีน ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย พม่า เวียดนาม บังคลาเทศ และอินโดนีเซีย

ประเทศอินเดีย ฝ้ายเกือบทั้งหมดที่ปลูกในประเทศเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม (Bt cotton) ตั้งแต่ปี 2545 ฝ้ายต้านทานแมลง (Insect-resistant cotton) ได้รับการยอมรับเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 94 โดยมีเกษตรกรปลูกมากกว่า 7 ล้านคน นับตั้งแต่การปลูกฝ้ายดัดแปลงพันธุกรรมครั้งแรก ผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจสะสมจากการผลิตอยู่ที่ 24.3 พันล้านดอลลาร์ ในปี 2558 เพียงปีเดียว การปลูกฝ้ายบีที มีมูลค่าถึง 1.5 พันล้านดอลลาร์

แม้ว่าอินเดียจะเป็นผู้ผลิตฝ้ายชั้นนำของโลก แต่อินเดียยังไม่ได้ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นอาหาร อย่างไรก็ตาม อินเดียยังมีการวิจัย โดยรัฐบาลได้ดำเนินการทดลองภาคสนามสำหรับพืชดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ ถั่วลูกไก่ (Chickpeas) ข้าว (Rice) และมะเขือเทศ (Tomatoes)

ในปี 2017 คณะกรรมการประเมินทางพันธุวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมของอินเดีย ได้ข้อสรุปเกี่ยวกับมัสตาร์ดดัดแปลงพันธุกรรม (GM mustard) ที่ได้รับการยอมรับจากสาธารณชนแล้วว่ามีความปลอดภัยและมีคุณค่าทางโภชนาการ ทำให้มัสตาร์ดดัดแปลงพันธุกรรม ไกล่จะได้รับการอนุมัติในทางการค้าและการใช้สำหรับอาหารมนุษย์ เช่นเดียวกับมะเขือยาวดัดแปลงพันธุกรรม (GM eggplant) แม้มีการอนุมัติด้านกฎระเบียบแล้ว รัฐบาลยังคงไม่แน่ชัดว่าจะผลิตสินค้าโภคภัณฑ์จากมะเขือยาวสำหรับการผลิตเชิงพาณิชย์หรือไม่ นอกจากนี้อินเดียยังเป็นประเทศนำเข้าน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันคาโนลาดัดแปลงพันธุกรรมในปริมาณมากเพื่อการบริโภคของมนุษย์

ประเทศปากีสถาน เป็นผู้ผลิตฝ้ายมากที่สุดอีกรายหนึ่ง โดยคิดเป็นร้อยละ 95 ของพันธุ์ฝ้ายดัดแปลงพันธุกรรม (GM cotton varieties) ในปี 2019 มีการปลูกฝ้ายดัดแปลงพันธุกรรม มากกว่า 7 ล้านเอเคอร์ (17,710,000 ไร่) ซึ่งลดลงเล็กน้อยจากปี 2018 เนื่องจากการขาดแคลนน้ำ การระบาดของศัตรูพืช และความไม่แน่นอนเกี่ยวกับการอนุมัติ ปากีสถานส่งออกฝ้ายไปยังประเทศอื่น ๆ ในเอเชีย รวมถึงอินเดีย อินโดนีเซีย ไทย และไต้หวัน ผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจที่เพิ่มขึ้นของการผลิตฝ้ายดัดแปลงพันธุกรรม ระหว่างปี 2010 ถึง 2015 อยู่ที่ 5.8 พันล้านดอลลาร์ และการผลิตฝ้ายที่เพิ่มขึ้นสามารถสร้างงานให้กับคนงานในฟาร์ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพิ่มโอกาสสร้างงานให้แก่ผู้หญิงภายในประเทศ

เช่นเดียวกับอินเดีย ปากีสถานยังไม่ได้อนุมัติให้พืชอาหารดัดแปลงพันธุกรรม (GM crops) สำหรับการเพาะปลูก แต่กำลังดำเนินการวิจัยในโรงเรือนและการทดลองภาคสนามเกี่ยวกับพืชดัดแปลงพันธุกรรมจำนวนหนึ่ง เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว อ้อย ถั่วเหลือง ถั่วลูกไก่ มันฝรั่ง และถั่วบด (Ground nut) รวมทั้งต้นยาสูบ การสนับสนุนการค้าพันธุ์พืชสำหรับอาหารดัดแปลงพันธุกรรมกำลังได้รับการสนับสนุนจากชุมชนเกษตรกรรมของปากีสถาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังจากประสบความสำเร็จในการทดลองแปลงปลูกข้าวโพด นอกจากนี้ปากีสถานเป็นผู้นำเข้ารายใหญ่ของน้ำมันถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมและน้ำมันคาโนลา



ประเทศจีน เป็นผู้นำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมรายใหญ่ของโลก รัฐบาลจีนมีนโยบายการเพิ่มผลิตภัณฑ์และการผลิตพืชผลให้เพียงพอภายในประเทศ ตั้งแต่ปี 1994 ประเทศจีนได้อนุมัติ 73 events ของพืชดัดแปลงพันธุกรรมสำหรับอาหารคน อาหารสัตว์ และการแปรรูป ในปี 2019 จีนได้ปลูกฝ้ายและมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม มากกว่า 7.9 ล้านเอเคอร์ ซึ่งเกษตรกรชาวจีนมีแนวโน้มในการยอมรับฝ้ายและมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ถึงร้อยละ 95 และ 85 ตามลำดับ การปลูกฝ้ายที่ต้านทานแมลง (Insect-resistant cotton) ได้เพิ่มผลผลิตเฉลี่ย 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการใช้จ่ายฆ่าแมลง มากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และฟาร์มสามารถเพิ่มรายรับมากกว่า 23.2 พันล้านดอลลาร์ ตั้งแต่ปี 2541 และ ในปี 2561 สามารถเพิ่มมูลค่ามากถึง 1.5 พันล้านดอลลาร์ เพียงปีเดียว

จากความสำเร็จของจีน พบว่าองค์ประกอบสำคัญ คือแผนพัฒนาเศรษฐกิจ โดยการเพิ่มการวิจัยและพัฒนาภายในประเทศ รัฐบาลจีนสนับสนุนเงินทุนหลายพันล้านเหรียญเพื่อขยายอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพภายในประเทศ และกำลังดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด-เลี้ยงสัตว์ ถั่วเหลือง และถั่วลิสง

ประเทศออสเตรเลีย อยู่ในอันดับที่ 13 ของโลกในด้านการผลิตพืชเทคโนโลยีชีวภาพ มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมมากถึง 140 events โดยส่วนใหญ่เกษตรกรปลูกฝ้ายและคาโนลาดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งเพิ่มขึ้นกว่าร้อยละ 98 และ 31 ตามลำดับ มีพื้นที่ปลูก 1.5 ล้านเอเคอร์ ในปี 2559 นับตั้งแต่การปลูกครั้งแรกในปี 2539 ผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจของการปลูกพืชเทคโนโลยีชีวภาพระหว่างปี 2539 ถึง 2558 คาดว่าอยู่ที่ 1 พันล้านดอลลาร์

การวิจัยและการทดลองภาคสนามกำลังดำเนินการกับพืชหลายพันธุ์ ได้แก่ กล้วย ข้าวบาร์เลย์ คาโนลา ฝ้าย อุ่น มีสตาร์ดอินเดีย ข้าวโพด มะละกอ และข้าวไรย์กราส (Perennial ryegrass) สับปะรด ดอกคำฝอย อ้อย ต้นสนสูง ทอเรเนีย ข้าวสาลี และโคลเวอร์ขาว



ประเทศฟิลิปปินส์ มีเกษตรกรกว่า 400,000 ราย ปลูกข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม มากกว่า 2.2 ล้านเอเคอร์ ในปี 2559 คิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตข้าวโพดในฟิลิปปินส์ นับตั้งแต่ปลูกข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ครั้งแรกในปี 2546 ผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจสะสมอยู่ที่ประมาณ 873 ล้านดอลลาร์ หรือ 87.7 ล้านดอลลาร์ในปี 2561



ฟิลิปปินส์อนุมัติพืชเทคโนโลยีชีวภาพ 122 events (รวมถึง stacked genes) และมีผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาด้วยการสนับสนุนจากภาครัฐและเอกชน ได้รับการอนุมัติในการทดลองภาคสนาม เช่น ข้าวสีทอง (Golden Rice) มะเขือเปราะ (Insect-resistant brinjal) ฝ้ายต้านทานแมลง (Insect-resistant cotton) และมะละกอด้านไวรัส (Virus-resistant papaya)

ประเทศญี่ปุ่น แม้ว่าไม่ใช่ผู้ปลูกพืชผลเพื่อบริโภค (Food crops) เป็นหลัก แต่ญี่ปุ่นได้ปลูกกุหลาบดัดแปลงพันธุกรรมสีน้ำเงิน มาตั้งแต่ปี 2554 ทั่วทั้งภูมิภาคในปี 2559 เกือบ 48 ล้านเอเคอร์ และผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจที่เพิ่มขึ้นในปี 2561 ถึง 3.7 พันล้านดอลลาร์ รัฐบาลหลายแห่งมีนโยบายเพื่อขยายการผลิตกุหลาบเพิ่มขึ้นในอนาคต

ประเทศพม่า ในปี 2559 ปลูกฝ้ายต้านทานแมลง (Insect-resistant cotton) มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 740,000 เอเคอร์ โดยมีอัตราการปลูกเพิ่มขึ้นร้อยละ 86 ทำให้เกษตรกรรายย่อยกว่า 430,000 ราย ได้รับประโยชน์จากการเพาะปลูกฝ้ายต้านทานแมลง โดยฟาร์มมีรายได้เพิ่มขึ้นระหว่างปี 2549 ถึง 2561 อยู่ที่ 462 ล้านดอลลาร์

ประเทศเวียดนาม เพาะปลูกข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมเป็นเวลากว่า 5 ปี ในปี 2019 เกษตรกรปลูกข้าวโพดต้านทานแมลง (Insect-resistance) และข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืช (Herbicide-tolerance) มีพื้นที่ปลูกกว่า 92,000 เอเคอร์ เพิ่มขึ้นร้อยละ 88 จากปี 2018 และให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 16.5 ถึง 25 เมื่อเทียบกับพันธุ์ที่ไม่ใช่พืชดัดแปลงพันธุกรรม (Non-GM varieties) ปัจจุบันเวียดนามอนุมัติพืชดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 22 events และนำเข้าข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ถั่วเหลือง ฝ้าย คาโนลา และอัลฟัลฟา นอกจากนี้ การทดลองภาคสนามได้รับการอนุมัติในข้าวโพด ถั่วเหลือง และฝ้าย

ประเทศบังกลาเทศ ปลูกมะเขือม่วงดัดแปลงพันธุกรรม (GM eggplant) เป็นชนิดแรก การอนุมัติปลูกมะเขือม่วงพันธุ์ต้านทานแมลงทำให้บังกลาเทศเป็นประเทศกำลังพัฒนา ประเทศแรกที่อนุญาตปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงพาณิชย์ ในปี 2019 การปลูกมะเขือม่วงพันธุ์ต้านทานแมลงเพิ่มขึ้น 28 เท่าจากปี 2018 มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 4770 เอเคอร์ ลักษณะต้านทานแมลงศัตรูพืช ช่วยลดต้นทุนของเกษตรกร ถึง 120 ดอลลาร์ต่อเฮกตาร์ (2.7 เอเคอร์) โดยสามารถลดการใช้สารกำจัดศัตรูพืชลงอย่างมีนัยสำคัญ ถึงร้อยละ 70 ถึง 90 และเพิ่มผลผลิตร้อยละ 30 ผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจโดยประมาณต่อเฮกตาร์มากกว่า 1,800 ดอลลาร์ ปัจจุบันมีการวิจัยและการทดลองภาคสนามอย่างต่อเนื่องสำหรับมะเขือม่วงต้านทานแมลงสายพันธุ์ใหม่ นอกจากนี้สถาบันวิจัยการเกษตรบังกลาเทศกำลังวิจัยเพื่อพัฒนามันฝรั่ง ข้าว ฝ้าย และมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม



3.3 พืชดัดแปลงพันธุกรรมในแคนาดาและสหรัฐอเมริกา

(GMO Crops in Canada and the United States)

แคนาดาและสหรัฐอเมริกา คือ 2 ใน 6 ประเทศ ที่เริ่มปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมตั้งแต่ปี 2539 (อีกสี่ประเทศ ได้แก่ อาร์เจนตินา ออสเตรเลีย จีน และเม็กซิโก) นับตั้งแต่การปลูกครั้งแรก จนถึงปัจจุบันมีการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมมากถึง 10 พืช (Crops) มีพื้นที่ปลูกมากกว่าล้านเอเคอร์ โดยผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจจากการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม ของทั้งสองประเทศ ระหว่างปี 2539 ถึง 2561 มีมูลค่ามากกว่า 105.6 พันล้านดอลลาร์

จากทั้งหมด 26 ประเทศ ประเทศแคนาดาปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมในปี 2559 อยู่ในอันดับ 4 ด้านการผลิตพืชเทคโนโลยีชีวภาพ โดยปลูกคาโนลา ข้าวโพด ถั่วเหลือง ผักกาดฝรั่ง (Sugar beets) แอลแฟลฟา (Alfalfa) และมันฝรั่ง บนพื้นที่ปลูกกว่า 31 ล้านเอเคอร์ โดยพืช 3 อันดับแรกที่ปลูกมากที่สุดของเกษตรกร ได้แก่ คาโนลา ข้าวโพด และถั่วเหลือง คิดเป็นร้อยละ 95 90 และ 82 ตามลำดับ บริษัท CropLife ในประเทศแคนาดา ประเมินการว่าการใช้พืชดัดแปลงพันธุกรรม สามารถลดการไถย่ำฆ่าแมลง และเกษตรกรสามารถผลิตพืชผลเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 42 เพิ่มมูลค่าถึง 8.3 พันล้านดอลลาร์ต่อปี จนถึงปัจจุบัน แคนาดาได้อนุมัติพืชดัดแปลงพันธุกรรม ทั้งหมด 185 ลักษณะ (traits) สำหรับอาหารคน อาหารสัตว์ และการเพาะปลูก รวมถึงมันฝรั่งที่ไม่มีสีน้ำตาล (Low-b bruising Innate® potato) และแอปเปิ้ลที่ไม่มีสีน้ำตาล (Non-browning Arctic® apple) ซึ่งพัฒนาโดย Okanagan Specialty Fruit (OSF) ตั้งแต่ปี 2017 ได้รับการอนุมัติให้ปลูกในแคนาดา

สำหรับสหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ใหญ่ที่สุดในโลก โดยมีพื้นที่ปลูกถึงร้อยละ 38 ของการผลิตทั้งหมดทั่วโลก ในปี 2019 เกษตรกรในสหรัฐอเมริกาปลูกข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม ฝ้าย ถั่วเหลือง คาโนลา ผักกาดฝรั่ง (Sugar beets) แอลแฟลฟา มะละกอ มันฝรั่ง แอปเปิ้ล และสควอชฤดูร้อน (Summer squash) มีพื้นที่ปลูกกว่า 175 ล้านเอเคอร์

ในช่วง 20 ปีของการค้าพืชเทคโนโลยีชีวภาพเชิงพาณิชย์ (พ.ศ. 2539-2558) สหรัฐอเมริกาได้รับผลประโยชน์สูงสุดที่ 72.9 พันล้านดอลลาร์และ 6.9 พันล้านดอลลาร์ในปี 2558 เพียงปีเดียว การยอมรับของเกษตรกรสำหรับพืชดัดแปลงพันธุกรรมสำหรับบริโภค ที่สำคัญ ได้แก่ ข้าวโพด (ร้อยละ 92) ถั่วเหลือง (ร้อยละ 94) ฝ้าย (ร้อยละ 98) และคาโนลาและผักกาดฝรั่ง (ร้อยละ 100) จากข้อมูลของกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา หรือ USDA ผู้ส่งออกสินค้าเกษตรรายใหญ่ที่สุดของโลก โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ข้าวโพดและถั่วเหลืองที่ส่งออกไปต่างประเทศส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ดัดแปลงพันธุกรรม (GMOs) ทั้งสหภาพยุโรปและจีนเป็นตลาดสำคัญสำหรับการส่งออกธัญพืชของสหรัฐฯ โดยมีการส่งออกถั่วเหลืองไปยังสหภาพยุโรป ประมาณ 6.5 ล้านตัน เมื่อเร็ว ๆ นี้ USDA ได้อนุมัติถั่วเหลืองทนแล้ง HB4 (Drought tolerant soybean- HB4) ได้รับการอนุมัติสำหรับการเพาะปลูกในบราซิลและอาร์เจนตินา



3.4 พืชดัดแปลงพันธุกรรมในยุโรป (GMO Crops in Europe)

ในปี 2010 คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission หรือ EC) ได้ตีพิมพ์รายงานข้อมูล ที่รวบรวมจากการวิจัย ใช้เวลากว่าสองทศวรรษ ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจากสหภาพยุโรป ศึกษาเกี่ยวกับ พืชดัดแปลงพันธุกรรม "ข้อสรุปหลักที่ได้จากความพยายามของโครงการวิจัยมากกว่า 130 โครงการ ซึ่ง ครอบคลุมระยะเวลาการวิจัยมากกว่า 25 ปี และเกี่ยวข้องกับกลุ่มวิจัยอิสระมากกว่า 500 กลุ่มวิจัย บ่งชี้ว่า เทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม หรือ GMOs ไม่มีข้อบ่งชี้ว่า มีความเสี่ยงมากกว่า เทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบเดิม (Conventional plant breeding technologies)

แม้ว่ามีข้อมูลยืนยันความปลอดภัยของพืชเทคโนโลยีชีวภาพโดย EC รวมทั้ง European Academy of Sciences และ European Food Safety Authority (EFSA) แต่การต่อต้านพืช ดัดแปลงพันธุกรรม (anti-GMO) ในที่สาธารณะยังคงแพร่หลายไปทั่วสหภาพยุโรป (EU) ส่งผลต่อการ อนุมัติพืชดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ใหม่และการเข้าถึงเมล็ดพันธุ์ของเกษตรกร อย่างไรก็ตาม สหภาพ ยุโรปยังคงนำเข้าธัญพืชดัดแปลงพันธุกรรม (GM grains) จำนวนมหาศาล สำหรับภาคอุตสาหกรรม ปศุสัตว์ (Livestock)

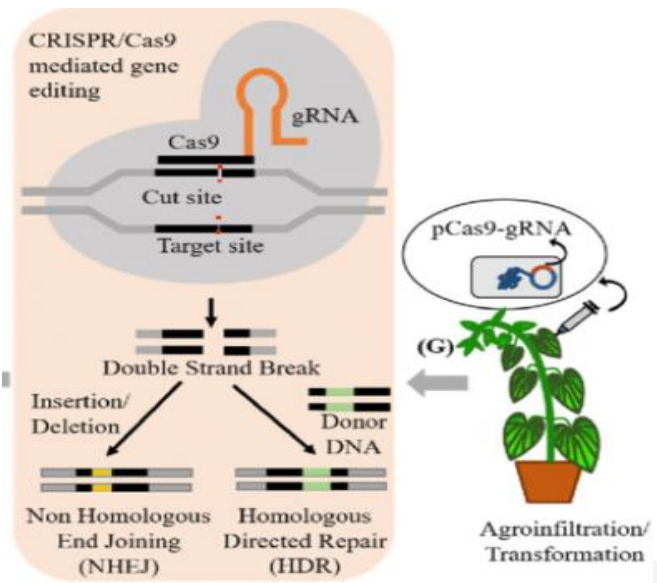
ในสหภาพยุโรป พืชดัดแปลงพันธุกรรมทั้งหมดที่นำเข้าเพื่ออุตสาหกรรมหรือการเพาะปลูก จะต้องได้รับการประเมินความเสี่ยงอย่างละเอียดโดย EFSA ปัจจุบัน EFSA มีข้อมูลทาง วิทยาศาสตร์ในเชิงบวกของพืชดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 109 events และยืนยันความปลอดภัยของ พืชดัดแปลงพันธุกรรมทั้งหมดที่ได้รับการอนุมัติให้ออกสู่ตลาดอย่างต่อเนื่อง

ปัจจุบัน 19 จาก 25 ประเทศในสหภาพยุโรป ลงมติไม่ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม แม้จะมีการ ห้ามการผลิตในประเทศอย่างเข้มงวด แต่สหภาพยุโรปยังคงเป็นหนึ่งในผู้นำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม รายใหญ่ที่สุด สำหรับอาหารสัตว์และการใช้ในภาคอุตสาหกรรมอื่น ๆ ปัจจุบัน 2 ประเทศในยุโรป ได้แก่ สเปน และโปรตุเกส อนุญาตให้ปลูกข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ มีพื้นที่ปลูกเกือบ 276,000 เฮกตาร์

สำหรับสหราชอาณาจักร (UK) ที่เปลี่ยนจากการเป็นสมาชิกสหภาพยุโรปอย่างเป็นทางการแล้ว รัฐบาลแห่งชาติจึงมีหน้าที่รับผิดชอบในการร่างนโยบายการค้าและการผลิตทางการเกษตรใหม่ แม้ว่า สหราชอาณาจักรจะยังไม่อนุมัติพืชเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับการเพาะปลูก แต่สหราชอาณาจักรเป็นผู้นำ ของสหภาพยุโรปในการวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเกษตรเชิงนวัตกรรม ในปี พ.ศ. 2564 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสิ่งแวดล้อมของอังกฤษได้กล่าวถึงความสำคัญของการประเมิน กระบวนการกำกับดูแลเกี่ยวกับเทคนิคทางเทคโนโลยีการเกษตรแบบต่าง ๆ อีกครั้ง เมื่อเทียบกับเทคนิค การปรับปรุงพันธุ์แบบเดิม โดยหวังว่าจะทำให้กระบวนการอนุมัติพืชดัดแปลงพันธุกรรมง่ายขึ้น

สถานีวิจัย Rothamsted ด้านการเกษตรที่เก่าแก่ที่สุดในโลก ของสหราชอาณาจักร กำลังวิจัยเพื่อพัฒนาและดำเนินการทดสอบภาคสนามสำหรับข้าวสาลีปรับแต่งพันธุกรรม (Genetically engineered wheat) และพันธุ์คาเมลินาปรับแต่งพันธุกรรม (Genetically engineered camelina) โดยใช้เทคโนโลยี CRISPR-Cas9 เพื่อลดปริมาณแอสพาราจีนในเมล็ดข้าวสาลี ซึ่งแอสพาราจีน (Asparagine) เป็นหนึ่งในกรดอะมิโนทั่วไป 20 ชนิดที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน แต่ปริมาณแอสพาราจีนในแป้งที่มากเกินไปอาจนำไปสู่การก่อตัวของสารประกอบที่เป็นพิษของอะคริลาไมด์ (Acrylamide) ในระหว่างการอบ โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการริเริ่มการวิจัยร่วมกันหลายสถาบันในศูนย์วิจัย 8 แห่งในสหราชอาณาจักรที่เรียกว่า Designing Future Wheat

นอกจากนี้ John Innes Center ซึ่งเป็นศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์พืชชั้นนำในเมือง Norwich สหราชอาณาจักร ได้เข้าร่วม Alliance for Accelerated Crop Improvement in Africa (ACACIA) วัตถุประสงค์เพื่อเร่งการปรับปรุงพืชผลในแอฟริกาโดยการพัฒนาทรัพยากร ความสามารถในการวิจัยและความร่วมมือที่สำคัญ นักวิทยาศาสตร์ของสหราชอาณาจักรมีส่วนร่วมในโครงการนี้เกี่ยวกับการเพาะพันธุ์ถั่วกลาส (Grass pea) ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีศักยภาพที่จะเติบโตในสภาพอากาศที่แห้งแล้ง พร้อมกับการผลิตโปรตีนสูงและปรับปรุงคุณภาพของดิน สำหรับการเพาะปลูกทั่วภูมิภาคของทะเลทรายซาฮารา (Sub-Saharan Africa) ถั่วกลาสป่า (Wild grass pea) มีสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่เป็นพิษ ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามศึกษาวิจัยที่จะทำให้มนุษย์สามารถบริโภคได้





3.5 พืชดัดแปลงพันธุกรรมในละตินอเมริกา (GMO Crops in Latin America)

ประเทศในแถบละตินอเมริกาเป็นผู้ผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมรายใหญ่ มีทั้งหมด 10 ประเทศ มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 207 ล้านเอเคอร์ ส่วนใหญ่ปลูกข้าวโพด ถั่วเหลือง ฝ้าย และคาโนลา ในปี 2559 บราซิลเป็นประเทศในละตินอเมริกา ที่มีการเพาะปลูกและการส่งออกมากที่สุด รองลงมา คือ อาร์เจนตินา ปารากวัย โบลิเวีย อุรุกวัย เม็กซิโก โคลอมเบีย ชิลี ฮอนดูรัส และคอสตาริกา ประเทศในละตินอเมริกายังเป็นผู้ผลิตพืชเทคโนโลยีชีวภาพ โดยมีการพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรมในท้องถิ่น ซึ่งมักเป็นการร่วมทุนระหว่างภาครัฐและเอกชน

นับตั้งแต่ปี 1998 **ประเทศบราซิล** ได้อนุมัติพืชดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 111 events และจากข้อมูลของ ISAAA รายงานว่าผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจสำหรับเกษตรกรที่ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม ระหว่างปี 2546 ถึง 2561 มีมูลค่า มากกว่า 26.6 พันล้านดอลลาร์ โดยเพิ่มขึ้น 3.4 พันล้านดอลลาร์ในปี 2561 ในปี 2559 บราซิล มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 87 ล้านเอเคอร์ สำหรับถั่วเหลือง ข้าวโพด และฝ้ายดัดแปลงพันธุกรรม และเป็นผู้ส่งออกสำคัญของพืชทั้งสามชนิด โดยทั้งจีนและสหภาพยุโรปนำเข้าฝ้ายและถั่วเหลืองจากบราซิล เช่นเดียวกันกับ อิหร่านและประเทศในแถบเอเชียนำเข้าข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมจากบราซิลเช่นกัน

นอกจากนี้บราซิลได้อนุมัติยูคาลิปตัสดัดแปลงพันธุกรรม (GM eucalyptus) ที่ให้ผลผลิตสูงสำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมชีวภาพ (ซึ่งถือว่าการอนุมัติยูคาลิปตัสประเทศแรกของทั่วโลก) รวมทั้งถั่วต้านทานไวรัส (GM virus-resistant bean) และถั่วเหลืองต้านทานสารกำจัดวัชพืช (Herbicide-tolerant soybean.) พร้อมทั้งบริษัทภาคเอกชน คือ BASF และศูนย์เทคโนโลยีในอ้อย (Center of Technology in Sugarcane) ทำงานร่วมกับสถาบันสาธารณะ EMBRAPA ซึ่งเป็นบริษัทวิจัยการเกษตรของบราซิล ได้ทำการพัฒนาและทดสอบถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช (herbicide-tolerant soybean) และ อ้อย ทน แล้ง (drought-tolerant sugarcane)



ประเทศอาร์เจนตินา (Argentina) ได้อนุมัติพืชดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 78 ลักษณะ (traits) ถือเป็นอันดับที่สองรองจากบราซิล ในปี 2019 สามารถผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง ฝ้าย และแอลแฟลฟา บนพื้นที่ปลูกกว่า 59 ล้านเอเคอร์ โดยตลอด 20 ปีของการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม เกษตรกรเจ้าของฟาร์มในอาร์เจนตินามีรายได้เพิ่ม ประมาณ 28 พันล้านดอลลาร์



อาร์เจนตินาเป็นผู้ผลิตกากถั่วเหลือง (Soybean meal) รายใหญ่ที่สุดของโลก โดยเกือบร้อยละ 100 เป็นถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม และส่งออกเกือบ 11 MMT ในปี 2019 อาร์เจนตินาได้อนุมัติ ข้าวโพดแบบรวมยีน HT/IR (Stacked HT/IR) 6 ลักษณะ (traits) นอกจากนี้ยังอนุมัติให้เกษตรกรอาร์เจนตินาปลูกแอลแฟลฟา (GM alfalfa) เพื่อเป็นพืชอาหารสัตว์สำหรับการเลี้ยงสัตว์ทั้งเนื้อวัวและโคนมในประเทศ

อีกแปดประเทศในละตินอเมริกา ได้แก่ โบลิเวีย ชิลี โคลอมเบีย คอสตาริกา ฮอนดูรัส เม็กซิโก อุรุกวัย และปารากวัย อนุญาตให้ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นอาหาร รวมทั้งพืชสวน เช่น ข้าวโพด ฝ้าย คาโนลา ถั่วเหลือง คาร์เนชั่น และดอกกุหลาบ

ประเทศโบลิเวีย (Bolivia) เพาะปลูกถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม (GM soybean) เกือบ 3.5 ล้านเอเคอร์ ทำให้โบลิเวียเป็นผู้ผลิตถั่วเหลืองรายใหญ่อันดับ 9 ของโลก และเพิ่มผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจของเกษตรกรจากปี 2551 ถึงปี 2561 เพิ่มขึ้น 874 ล้านดอลลาร์ พืชผลของโบลิเวียส่งออกไปยังประเทศอื่น ๆ ในละตินอเมริกา รวมทั้งเอกวาดอร์ เปรู และเวเนซุเอลา ปัจจุบันถั่วเหลืองที่ทนต่อสารไกลโฟเซต (Glyphosate tolerant soybeans) ได้รับการอนุมัติสำหรับการเพาะปลูกแล้ว ปัจจุบันเกษตรกรกำลังผลักดันให้มีการอนุมัติเมล็ดพันธุ์ที่ทนต่อความแห้งแล้ง (Drought tolerant seed) เนื่องจากปริมาณน้ำฝนมักเป็นปัจจัยจำกัดที่สุดในการผลิตพืชผลในโบลิเวีย

ประเทศชิลี (Chile) เพาะปลูกข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม คาโนลา และถั่วเหลือง สำหรับเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกเท่านั้น มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 100,000 เอเคอร์ โดยชิลีอยู่ในอันดับที่ 9 ของโลก ในด้านการผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งออก และเป็นอันดับหนึ่งในการผลิตเมล็ดพันธุ์ดัดแปลงพันธุกรรม โดยเมล็ดพันธุ์ส่วนใหญ่ส่งออกไปยังสหรัฐอเมริกาและแคนาดา แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อห้ามในการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อการบริโภคภายในประเทศ



ดังนั้นชิลีจึงนำเข้าธัญพืชดัดแปลงพันธุกรรม สำหรับอาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่มีส่วนผสมของพืชดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้มีโครงการวิจัยหลายโครงการในชิลี โดยดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อพัฒนาพันธุ์พืชในท้องถิ่น นักวิจัยจากมหาวิทยาลัย Talca ได้พัฒนาสายพันธุ์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมที่ทนต่อสภาพแล้ง (Drought tolerance) ได้ดีมาก สามารถอยู่ในสถานะแล้งได้ถึง 52 วัน โดยไม่ต้องใช้น้ำ ให้ผลผลิตสูงถึงร้อยละ 80 หากนวัตกรรมนี้ได้รับอนุมัติ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรในประเทศที่มีพื้นที่แห้งแล้งรอบทะเลทราย

ประเทศคอสตาริกา (Costa Rica) เช่นเดียวกับชิลี ที่ปลูกพืชเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อส่งออกไปยังแคนาดาและสหรัฐอเมริกา ในปี 2019 คอสตาริกา มีพื้นที่ปลูกกว่า 730 เฮกตาร์ของพืชดัดแปลงพันธุกรรม ได้แก่ ฝ้าย ถั่วเหลือง และสับปะรดสีชมพูที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ นักวิทยาศาสตร์ในพื้นที่กำลังพัฒนาและทดสอบข้าวที่ทนต่อสารกำจัดวัชพืชและกล้วยต้านทานต่อโรค Black Sigatoka ซึ่งเป็นโรคพืชที่อาจทำให้สูญเสียผลผลิตได้ ถึงร้อยละ 50



ประเทศโคลอมเบีย (Colombia) ผลิตข้าวโพดและฝ้ายดัดแปลงพันธุกรรมในปี 2559 ได้มากกว่า 250,000 เฮกตาร์ และนับตั้งแต่การปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเริ่มขึ้นในปี 2547 รายได้เกษตรกรเพิ่มขึ้น 302 ล้านดอลลาร์ โคลอมเบียยังปลูกดอกคาร์เนชันดัดแปลงพันธุกรรม (GM-Dutch blue carnations) เพื่อส่งออกไปยังยุโรป และกุหลาบกลีบดอกสีน้ำเงินจีเอ็ม (GM blue petal roses) เพื่อส่งออกไปยังญี่ปุ่น โดยดอกกุหลาบหนึ่งดอกสามารถขายปลีกได้สูงถึง 50 ดอลลาร์ ปัจจุบัน มีโครงการวิจัยภาครัฐและเอกชนจำนวนมากที่กำลังดำเนินการเพื่อพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง กาแฟ ข้าว มันฝรั่ง และอ้อยที่ดัดแปลงพันธุกรรม

ประเทศฮอนดูรัส (Honduras) ในปี 2019 มีการเพาะปลูกข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม เพิ่มขึ้นร้อยละ 5 จากปี 2018 โดยมีพื้นที่เพาะปลูกมากกว่า 92,000 เฮกตาร์ ฮอนดูรัสปลูกข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ การบริโภคของมนุษย์ และเพื่อการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมไปยังโคลัมเบีย คาดว่าตั้งแต่ปี 2545 รายได้ของเกษตรกรเพิ่มขึ้นจากการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม เกือบ 20.9 ล้านดอลลาร์ นอกจากนี้ฮอนดูรัสยังนำเข้าอาหารดัดแปลงพันธุกรรม สำหรับอุตสาหกรรมปศุสัตว์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ประเทศปารากวัย (Paraguay) เป็นผู้ผลิตพืชเทคโนโลยีชีวภาพรายใหญ่เป็นอันดับหกของโลก ปารากวัย มีพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นในปี 2019 มากกว่า 10 ล้านเฮกตาร์ โดยเฉพาะฝ้าย ข้าวโพด และถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม



ปารากวัยเป็นผู้ผลิตเทคโนโลยีชีวภาพรายใหญ่เป็นอันดับสามในละตินอเมริกา โดยส่งออกไปยังบราซิล สหภาพยุโรป อิสราเอล และรัสเซีย เกือบร้อยละ 99 เป็นถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม นับตั้งแต่การปลูกครั้งแรกในปี 2547 รายได้ของฟาร์มในปารากวัยเพิ่มขึ้น 2.3 พันล้านดอลลาร์

ประเทศเม็กซิโก (Mexico) ในปี 2019 เกษตรกรชาวเม็กซิกันกว่า 8,000 ราย ปลูกฝ้ายดัดแปลงพันธุกรรม เกือบ 590,000 เฮกตาร์ และจนถึงขณะนี้เม็กซิโกได้อนุญาตให้มีการนำเข้าและบริโภคพืชดัดแปลงพันธุกรรม จำนวน 188 events รวมถึงถั่วเหลือง ข้าวโพด ข้าว อัลฟัลฟา คาโนลา มันฝรั่ง มะเขือเทศ และผักกาดฝรั่ง ตั้งแต่ปี 2539 ถึงปี 2561 เกษตรกรชาวเม็กซิกันมีรายได้ 798.5 ล้านดอลลาร์จากการปลูกพืชเทคโนโลยีชีวภาพ โดยศูนย์วิจัยปรับปรุงข้าวโพดและข้าวสาลีระหว่าง

ประเทศ (International Maize and Wheat Improvement Center หรือ CIMMYT) ในเม็กซิโก มีการวิจัยพัฒนาทำการทดสอบข้าวโพดและข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มความทนแล้งและศัตรูพืช

ประเทศอูรุกวัย (Uruguay) เป็นผู้ผลิตพืชเทคโนโลยีชีวภาพรายใหญ่ที่สุดอันดับที่ 11 ของโลก โดยปลูกข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม เกือบ 3 ล้านเอเคอร์ คิดเป็นร้อยละ 97 ของถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม กว่า 15 ปีที่เกษตรกรในอูรุกวัยปลูกพืชเทคโนโลยีชีวภาพ รายได้ของเกษตรกรเพิ่มขึ้น 214 ล้านดอลลาร์ อูรุกวัยส่งออกถั่วเหลืองไปยังอียิปต์ สหภาพยุโรป จีน และประเทศอื่น ๆ ในเอเชีย

อ้างอิง

- Barta, A., Sommergruber, K., Thompson, D., Hartmuth, K., Matzke, M. A., and Matzke, A. J.M. 1986. The expression of a nopaline synthase? human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, 6(5), 347–357. doi:10.1007/bf00034942
- Demont, M., Dillen, K., Mathijs, E. and Tollens, E. 2007. GM crops in Europe: How much value and for whom? *EuroChoices* 6, 46–53.
- Devos, Y., Maesele, P., Reheul, D., Van Speybroeck, L., and De Waele, D. 2007. Ethics in the Societal Debate on Genetically Modified Organisms: A (Re)Quest for Sense and Sensibility. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 21(1), 29–61. doi:10.1007/s10806-007-9057-6
- Desamero, NV. 2007. Genetic enhancement of in vitro culture-derived tungro resistant rice breeding lines. Paper presented during the 19 th Federation of Crop Science Societies of the Philippines, Development Academy of the Philippines, Tagaytay City. June 13-15.
- Hansen Jesse, L. C., and Obrycki, J. J. 2000. Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, 125(2), 241–248.
- Hoban, T. 2004. Public attitudes towards agricultural biotechnology. ESA working papers nos. 4-9. Agricultural and Development Economics Division, Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). 2022) Agricultural Biotechnology (A Lot More than Just GM Crops): Biotech Information Series: 1. <https://www.isaaa.org/>
- Phillips, T. 2008. Genetically modified organisms (GMOs): Transgenic crops and recombinant DNA technology. *Nature Education*. 1(1):213

- Sears, M. K., Hellmich, R. L., Stanley-Horn, D. E., Oberhauser, K. S., Pleasants, J. M., Mattila, H. R., Dively, G. P. 2001. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 11937–11942. doi:10.1073/pnas.211329998
- Ye, X, Al-babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P and Potrykusl. 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*. 287: 303-305.

TOP 5 COUNTRIES GROWING
BIOTECH CROPS IN 2018 (MILLION HECTARES)

USA	75.0
Brazil	51.3
Argentina	23.9
Canada	12.7
India	11.6

<http://www.isaaa.org> (ISAAA)



บทที่ 4

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของ พืชที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

เรียบเรียงโดย ปิยนุช ศรชัย

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร 2565

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety assessment) สำหรับการสร้างพืชเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ตามหลักการสากลก่อนที่จะถูกนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ พืชเหล่านั้นจะต้องผ่านการประเมินความเสี่ยง (Risk assessment) หรือการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ (Biosafety assessment) ภายใต้กระบวนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่มีมาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับสากล แบบทีละขั้นตอน (Step-by-step) ตั้งแต่ระดับห้องปฏิบัติการ ระดับโรงเรือน (โรงเรือนกระจก และ/หรือ โรงเรือนตาข่าย) และการทดลองในภาคสนาม แล้วประเมินผลความปลอดภัยทางชีวภาพด้วยคณะผู้เชี่ยวชาญและหน่วยงานกำกับดูแล โดยอาศัยหลักการพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ (Science-based) ต้องมีเหตุผลที่สามารถอธิบายได้ด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์ อยู่บนพื้นฐานความเทียบเท่า (Substantial equivalence) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชสายพันธุ์เดิมที่ไม่ได้ผ่านการพัฒนาด้วยเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ อยู่บนพื้นฐานของการประเมินแบบเป็นกรณีๆ ไป (Case-by-case) ทำการประเมินในแต่ละสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีการพัฒนาขึ้น และอยู่บนพื้นฐานที่สาธารณชนได้มีส่วนร่วม (Public participation) ให้สาธารณชนได้มีส่วนร่วมในการพิจารณาผลการประเมินความเสี่ยงก่อนการตัดสินใจ สำหรับการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพแบ่งออกเป็น 2 กรณี ได้แก่ การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรม และการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชที่ได้รับการปรับแต่งจีโนม

1. การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในพืชดัดแปลงพันธุกรรม ประกอบไปด้วย 2 ด้าน ดังนี้

1.1. การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อม

การทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อมของพืชดัดแปลงพันธุกรรม เป็นการจำแนกและประเมินความเสี่ยงในการปลดปล่อยหรือเพาะปลูกพืชเหล่านี้ เปรียบเทียบตามหลักการความคุ้นเคย (Familiarity) และความเทียบเท่า (Substantial equivalence) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชสายพันธุ์เดิมที่ไม่ได้ผ่านการพัฒนาด้วยเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ หรือพืชพันธุ์เดิมที่มีประวัติการใช้อย่างปลอดภัย โดยการทดสอบจะดำเนินการแบบทีละขั้นตอน (Step-by-step) ประกอบด้วย

1.1.1 การทดสอบในห้องปฏิบัติการ เป็นการทดสอบภายหลังจากถ่ายยีนเข้าสู่ต้นพืช เพื่อคัดเลือกต้นที่เหมาะสม รวมทั้งตรวจสอบข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular biology) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชดัดแปลงพันธุกรรมในเบื้องต้น ก่อนเข้าสู่กระบวนการทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลองต่อไป โดยการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ถือเป็นสภาพที่ปิดมิดชิด (Contained facility) เพื่อป้องกันการหลุดรอด



1.1.2 การทดสอบในสภาพโรงเรือน เป็นการทดสอบ

ความปลอดภัยทางชีวภาพ เพื่อประเมินพืชที่ได้รับการพัฒนาในด้านต่างๆ เช่น การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โอกาสในการผสมข้ามกับพืชพันธุ์ท้องถิ่นชนิดเดียวกัน โอกาสการผสมข้ามไปยังสิ่งมีชีวิตอื่น และผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย โดยดำเนินการในสถานที่ปิดมิดชิด ป้องกันการหลุดรอด เพื่อให้ได้ข้อมูลความปลอดภัยเบื้องต้น สำหรับการพิจารณาดำเนินการทดสอบในภาคสนามต่อไป



1.1.3 การทดสอบในแปลงทดลองภาคสนาม (Field trial)

พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่จะดำเนินการทดสอบในขั้นตอนนี้ จำเป็นต้องผ่านการทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือนแล้ว ในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อม ขั้นตอนการทดสอบในระดับภาคสนามเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากที่สุด เนื่องจากเป็นการทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพในสภาพนิเวศจริง โดยต้องทำการทดสอบในประเด็นต่างๆ อาทิ การทดสอบด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล การประเมินศักยภาพในการเป็นวัชพืช การประเมินศักยภาพในการเคลื่อนย้ายยีนไปยังสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่มีความใกล้ชิด และการประเมินผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่มีใช่เป้าหมาย เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การดำเนินงานทดสอบในขั้นตอนนี้มีความจำเป็นต้องมีหน่วยงานภาครัฐในการกำกับดูแล



1.2. การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหาร

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหารของพืชดัดแปลงพันธุกรรม ดำเนินการตามหลักสากล ได้แก่ “แนวทางปฏิบัติสำหรับการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของอาหารที่ได้จากพืชดัดแปลงพันธุกรรมโดยเทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ” (Guideline for Conduct of Food Safety Assessment of Food Derived from Recombinant-DNA Plants) (Codex alimentarius, 2003 และ 2008) ที่จัดทำขึ้นภายใต้โครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ ขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ และองค์การอนามัยโลก (Joint FAO/WHO CODEX Alimentarius Commission) โดยให้หลักการความเทียบเท่าโดยสาระสำคัญ (Substantial equivalence) เปรียบเทียบกับพืชดั้งเดิมที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรมในประเด็นต่างๆ อาทิ การทดสอบด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล การประเมินความเป็นไปได้ในการก่อให้เกิดพิษ การประเมินความเป็นไปได้ในการก่อให้เกิดภูมิแพ้ และการประเมินด้านโภชนาการ สำหรับการประเมินความปลอดภัยนี้เป็นประเมินความปลอดภัยของความแตกต่างใดๆ ที่ตรวจพบ จึงพิจารณาได้ว่า “ผลิตภัณฑ์ใหม่ปลอดภัย โดยเทียบกับคู่เปรียบเทียบกับพืชนั้นๆ” (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2549) ไม่ใช่การยืนยันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่อย่างสมบูรณ์



พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการประเมินว่ามีความปลอดภัยแล้วจะได้รับอนุญาตให้ปลูกเชิงพาณิชย์ หลังจากภายหลังประเมินความเสี่ยงทุกขั้นตอนและมีระบบการจัดการความเสี่ยง (Risk management) เพื่อกำกับดูแล ตรวจสอบ และควบคุมให้ไม่มีผลกระทบแตกต่างไปจากพืชที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม ทั้งนี้จากประวัติการบริโภคพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับอนุญาตให้จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ในระยะกว่า 20 ปีที่ผ่านมา ยังไม่ปรากฏว่ามีรายงานการเกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคแต่อย่างใด

3. องค์ประกอบสำหรับการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ มีหลายองค์ประกอบที่ต้องทำการพิจารณาได้แก่ ประเภทของงานวิจัยและการทดลอง ประเภทของห้องปฏิบัติการที่จะใช้ดำเนินงานวิจัย รวมถึงสภาพโรงงานที่จะใช้ในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ

3.1 ระดับประเภทของการวิจัยและทดลองเกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

สำหรับประเภทของงานวิจัยที่ได้พัฒนาขึ้นได้รับการจำแนกตามคู่มือแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ (2559) ซึ่งมีแบ่งงานวิจัยออกเป็น 4 ประเภท

งานวิจัยประเภทที่ 1 เป็นการวิจัยและทดลองที่มีความเสี่ยง หรือ อันตรายน้อยต่อผู้ปฏิบัติงาน ชุมชน และสิ่งแวดล้อม เป็นงานวิจัยและทดลองที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการ แลกเปลี่ยนดีเอ็นเอ โดยกระบวนการทางสรีรวิทยา ซึ่งเป็นที่ยอมรับ เป็นการวิจัยและทดลองที่เกี่ยวข้องกับระบบเจ้าบ้าน/พาหะที่ได้รับอนุญาต หรือ เป็นการวิจัยและทดลองที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ที่เกิด จาก self-cloning ในสิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงหรืออันตรายน้อยต่อผู้ปฏิบัติงาน ชุมชน และสิ่งแวดล้อม โดยมีหลักฐานยืนยัน การวิจัยและทดลองดัดแปลงพันธุกรรมในพืชที่ใช้สารพันธุกรรมจากพืช ชนิดนั้นเอง และไม่เป็นวัชพืชร้ายแรงหรือไม่สามารถผสมข้ามกับวัชพืชได้ ทั้งนี้สำหรับการดำเนินงานวิจัยให้หัวหน้าโครงการวิจัยแจ้งรายละเอียดการทดลองและวิธีการทดลองต่อคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพของสถาบัน (IBC) ถึงสถานภาพการทำงานและมาตรการความปลอดภัยทางชีวภาพ และสามารถดำเนินงานได้เมื่อ IBC เห็นชอบ

งานวิจัยประเภทที่ 2 เป็นงานวิจัยและทดลองที่มีความเสี่ยง หรืออันตรายปานกลางต่อผู้ปฏิบัติงานชุมชน และสิ่งแวดล้อม เป็นการวิจัยและทดลองที่เกี่ยวข้องกับระบบเจ้าบ้าน/พาหะที่ไม่ได้รับอนุญาต หรือการวิจัยและทดลองที่เกี่ยวข้องกับระบบเจ้าบ้าน/พาหะที่ได้รับอนุญาตไว้แล้วตามแต่ยีนที่จะนำมาเชื่อมมีลักษณะเป็นตัวกำหนดให้เกิดพิษภัย หรือ -ดีเอ็นเอ (DNA) หรือ อาร์เอ็นเอ(RNA) จากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์สัตว์หรือพืช ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงระดับที่ 2 หรือมียีนสร้างโปรตีนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตหรือการแบ่งเซลล์ หรือ เป็นการวิจัยและทดลองดัดแปลงพันธุกรรมพืชที่ได้รับสารพันธุกรรมจากพืช ชนิดอื่น หรือสิ่งมีชีวิตอื่น แต่ต้องไม่มีสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตก่อโรค ต่างถิ่น (Exotic pathogen) สำหรับงานวิจัยประเภทที่ 2 ดำเนินการโดยหัวหน้าโครงการวิจัยต้องส่งรายละเอียดการทดลอง และวิธีการจัดการความเสี่ยงไปยัง IBC โดย IBC จะพิจารณาถึงสภาพการ

ทำงาน และมาตรการความปลอดภัยทางชีวภาพ และจะเริ่มงานวิจัยได้ต่อเมื่อได้รับการอนุมัติจาก IBC แล้ว

งานวิจัยประเภทที่ 3 เป็นงานวิจัยและทดลองที่มีความเสี่ยงหรืออันตรายสูงต่อผู้ปฏิบัติงาน ชุมชน และสิ่งแวดล้อม โดยเป็นการวิจัยในเชื้อที่ก่อโรคร้ายแรงในคนหรือสัตว์ แต่ยังเป็นโรคที่มีวิธีป้องกันหรือรักษา หรือเป็นงานวิจัยและทดลองเกี่ยวกับการรักษาผู้ป่วยโดยการดัดแปลงพันธุกรรม เป็นการวิจัยและทดลองที่เกี่ยวกับระบบเจ้าบ้าน/พาหะ หรือยีน หรือชิ้นส่วน ดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ที่อาจทำให้เกิดโรคในมนุษย์สัตว์ หรือพืช ที่อยู่ใน กลุ่มเสี่ยงระดับที่ 3 หรือเชื้อที่อาจมีอันตรายในระดับที่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เป็นการวิจัยและทดลองเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารพิษ (Toxin producers) การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอ และการโคลนนิ่งดีเอ็นเอ (DNA cloning) ที่ควบคุมการสร้างสารพิษ หรือผลิตสารพิษที่มี LD 50 ต่ำกว่า 100 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม การวิจัยที่เกี่ยวกับยีนที่ให้ผลผลิตสูง ถึงแม้ว่าสารพิษที่ผลิตจะมี LD 50 สูงกว่า 100 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม ก็ตามทั้งนี้รวมถึงการวิจัยที่ใช้ DNA ของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารพิษ ซึ่งยังไม่ทราบ แน่ชัดว่าอาจจะยังมีอันตรายอยู่ ต้องระบุรายละเอียดการทดลอง ให้ชัดเจนถึงชนิดของสารพิษ ชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ร่วมในการทำโคลนนิ่ง (cloning) และระดับความเป็นพิษ การวิจัยและทดลองที่ใช้ไวรัสเป็นพาหะ ซึ่งทำให้เซลล์มนุษย์ติดเชื้อได้ หรืองานวิจัยที่มี DNA ส่วนที่เสริมแต่งซึ่งมีความสามารถผลิตสารควบคุม การเจริญเติบโต หรือเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ การวิจัยและทดลองที่มีการสร้างสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้สามารถดื้อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance gene) หลายชนิด โดยที่ยาปฏิชีวนะ นั้นๆ ยังมีการใช้ในการบำบัดรักษามนุษย์สัตว์หรือใช้ในการเกษตร การวิจัยและทดลองดัดแปลงพันธุกรรมพืชที่ได้รับสารพันธุกรรมจากพืช ชนิดอื่น หรือสิ่งมีชีวิตอื่น โดยสารพันธุกรรมนั้นมาจากจุลินทรีย์ต่างถิ่น ที่ก่อโรค หรือมียีนสร้างสารพิษต่อสัตว์มีกระดูกสันหลัง ทั้งนี้งานที่ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงระดับอันตรายจะรวมอยู่ในประเภทนี้ด้วย สำหรับการดำเนินงานหัวหน้าโครงการวิจัยต้องส่งรายละเอียดการทดลอง และวิธีการจัดการความเสี่ยงไปยัง IBC ซึ่ง IBC จะพิจารณาถึงสภาพการทำงาน และมาตรการความปลอดภัยทางชีวภาพ โดยจะเริ่มดำเนินงานวิจัยได้ต่อเมื่อได้รับการอนุมัติจาก IBC ทั้งนี้อาจขอรับคำแนะนำจาก TBC ร่วมด้วย

งานวิจัยประเภทที่ 4 เป็นงานวิจัยและทดลองที่มีความเสี่ยงหรืออันตรายระดับร้ายแรงต่อผู้ปฏิบัติงาน ชุมชน และสิ่งแวดล้อม และ/หรือ ขัดต่อศีลธรรม จะไม่ได้รับอนุญาตให้ดำเนินการ เป็นงานวิจัยและทดลองที่ไม่มีมาตรการ และ/หรือข้อมูลที่ใช้ในการพิสูจน์ และควบคุมป้องกันในเชิงวิทยาศาสตร์อย่างชัดเจนหรือ เป็นงานวิจัยและทดลองที่มุ่งเน้นผลิตสิ่งมีชีวิตก่อโรค และ/หรือสารพิษ เพื่อใช้เป็นอาวุธชีวภาพ หรือเป้าหมายทางสงคราม



กลไกการกำกับดูแลตามแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ

งานวิจัย ประเภทที่ 1	งานวิจัย ประเภทที่ 2	งานวิจัย ประเภทที่ 3	งานวิจัย ประเภทที่ 4
แจ้ง IBC	ขออนุญาต IBC	ขออนุญาต IBC	ไม่อนุญาตให้ ดำเนินการ
หัวหน้าโครงการเพียง แจ้งรายละเอียดการ ทดลองและวิธีการ ดำเนินการที่ เหมาะสมต่อ IBC ให้ทราบถึงสภาพการ ทำงานและมาตรการ ความปลอดภัยทาง ชีวภาพ และสามารถ เริ่มดำเนินการได้เมื่อ IBC เห็นชอบ	หัวหน้าโครงการต้อง ส่งรายละเอียดการ ทดลองและวิธีการ จัดการความเสี่ยง ไปยัง IBC โดย IBC จะพิจารณาถึง สภาพการทำงาน และมาตรการความ ปลอดภัยทางชีวภาพ และจะเริ่มงานวิจัยได้ ต่อเมื่อได้รับการ อนุมัติจาก IBC แล้ว	หัวหน้าโครงการต้องส่ง รายละเอียดการทดลอง และวิธีการจัดการ ความเสี่ยงไปยัง IBC โดย IBC จะพิจารณา ถึงสภาพการทำงาน และมาตรการความ ปลอดภัยทางชีวภาพ โดยจะเริ่มดำเนินการ งานวิจัยได้ต่อเมื่อได้รับ การอนุมัติจาก IBC ที่เนื้อหาจะรองรับ คำแนะนำจาก TBC ร่วมด้วย	การวิจัยและทดลอง ที่มีความเสี่ยงสูง เกินกว่าระดับ ที่ยอมรับได้ ปฏิบัติตามขั้นตอน และสิ่งแวดล้อม และ/หรือ ปิดต่อ สาธารณะ จะไม่ได้ ขออนุญาตให้ ดำเนินการ

ภาพที่ 4.1 กลไกการกำกับดูแลงานวิจัยทั้ง 4 ประเภท

3.2 ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ

สำหรับห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัยและทดลองแบ่งได้หลายระดับดังนี้

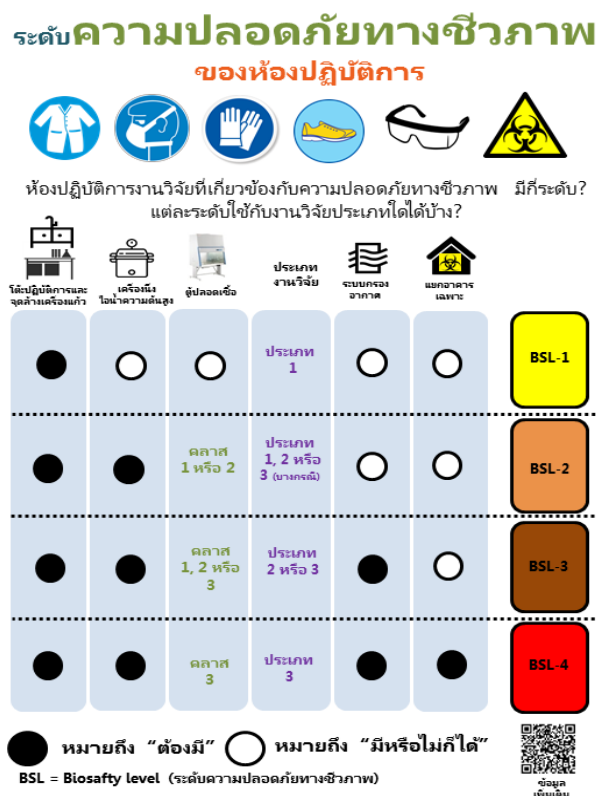
1. ห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 1 (Biosafety Level 1; BSL1) สามารถใช้ได้กับการวิจัยและทดลองสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมประเภทที่ 1 ซึ่งทำงานกับกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่มีอันตรายในระดับต่ำที่สุดต่อผู้ปฏิบัติงานที่มีสุขภาพดี และสิ่งแวดล้อม ห้องปฏิบัติการ BSL1 นี้ ไม่จำเป็นต้องแยกออกจากห้องปฏิบัติการทั่วไป สามารถทำงานบนโต๊ะปฏิบัติการทั่วไป โดยไม่ต้องมีอุปกรณ์พิเศษใดๆ บุคคลในห้องปฏิบัติการควรได้รับการฝึกฝนเป็นพิเศษจากนักวิทยาศาสตร์ทางด้านจุลชีววิทยาและวิทยาศาสตร์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง สิ่งสำคัญที่ต้องมีในห้องปฏิบัติการ BSL1 ได้แก่ โต๊ะปฏิบัติการ อ่างล้างมือ อุปกรณ์วิจัย และเทคนิคทาง จุลชีววิทยาทั่วไป

2. ห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 2 (Biosafety Level 2; BSL2) สามารถใช้ได้กับการวิจัยและทดลองเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ประเภทที่ 1 และ ประเภทที่ 2 หรือบางลักษณะของงานประเภทที่ 3 โดยกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการทดลองวิจัย มีความเสี่ยงอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง สิ่งที่ต้องจัดเตรียมและวิธีการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ BSL2 ต้องมีเครื่องมือและครุภัณฑ์ตามห้องปฏิบัติการ BSL1 เป็นอย่างต่ำ โดยต้องมี ตู้ชีวนิรภัย (Biological Safety Cabinet; BSC) เครื่องนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave) เพื่อการฆ่าเชื้อสำหรับของเสียติดเชื้อ โดยติดตั้งภายในอาคารที่ตั้งของห้องปฏิบัติการหรือในบริเวณใกล้เคียงโดยปฏิบัติตามขั้นตอนปฏิบัติ (Standard Operating Procedure; SOP) ในการเคลื่อนย้ายของเสีย และ ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ BSL2 ต้องผ่านการฝึกอบรมด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ และ/หรือการฝึกอบรมทางเทคนิคเกี่ยวกับจุลินทรีย์ก่อโรค

3. ห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 3 (Biosafety Level 3; BSL3) สามารถใช้ได้กับการวิจัยและทดลองเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมประเภทที่ 3 หรืองานที่ใช้

สิ่งมีชีวิตที่ก่อโรคร้ายแรงและ/หรือมีโอกาสแพร่กระจายผ่านทางระบบหายใจ ทั้งนี้ต้องมีเครื่องมือและครุภัณฑ์ตามห้องปฏิบัติการ BSL2 เป็นอย่างต่ำ โดยจำเป็นต้องมีระบบไหลเวียนอากาศในห้องปฏิบัติการควรเป็นระบบที่สามารถลดการหลุดรอดของจุลินทรีย์ออกสู่สิ่งแวดล้อมให้มากที่สุด มีระบบที่เข้มงวดต่อการให้อนุญาตบุคคลภายนอก หรือผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องเข้ามาในสถานที่ รวมไปถึงผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ BSL3 ต้องผ่านการฝึกอบรมการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ BSL3

4 ห้องปฏิบัติการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 4 (Biosafety Level 4; BSL4) สามารถใช้ได้กับการทดลองเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมประเภทที่ 3 รวมถึงการใช้กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงสูงสุด สิ่งที่ต้องจัดเตรียมและวิธีการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ BSL4 ต้องมีเครื่องมือและครุภัณฑ์ตามห้องปฏิบัติการ BSL3 เป็นอย่างต่ำ โดยเพิ่มเติม ผู้ชีวนิรภัย Class III เครื่องนิ่งไอน้ำความดันสูงแบบ 2 ประตู (double-doored autoclave) และจำเป็นต้องเปลี่ยนเสื้อผ้าก่อนเข้าห้องปฏิบัติการ มีที่อาบน้ำก่อนออกจากห้องปฏิบัติการ โดยอาคารหรือห้องปฏิบัติการควรแยกออกจากอาคารหรือพื้นที่อื่นอย่างชัดเจน



ภาพที่ 4.2 ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของห้องปฏิบัติการ ระดับที่ 1 -4

3.3. ระดับความปลอดภัยทางชีวภาพของโรงเรียน

1 ความปลอดภัยทางชีวภาพของโรงเรียนระดับที่ 1 (Biosafety Level 1- Plants; BSL1-P) โรงเรียน BSL1-P ใช้กับการศึกษาพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงใดๆต่อสิ่งแวดล้อม อาทิ พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่มีศักยภาพ ในการเป็นวัชพืช หรือไม่สามารถผสมข้าม

กับวัชพืช หรือพืชอื่นๆ ในบริเวณใกล้เคียง เช่น มันฝรั่งดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานแมลงที่ได้รับยีนต้านทานจากมันฝรั่งสายพันธุ์พื้นเมือง หรือพืชที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้มีลักษณะเป็นหนาม รวมไปถึงงานวิจัยจุลินทรีย์ดัดแปลง พันธุกรรมภายในท้องที่ (non-exotic) ที่มีความเกี่ยวข้องกับพืชที่ไม่สามารถแพร่กระจายได้ อย่างรวดเร็วหรือไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศ เช่น *Rhizobium* และ *Agrobacterium* เป็นต้น

2. ความปลอดภัยทางชีวภาพของโรงเรือนระดับที่ 2 (Biosafety Level 2-Plants; BSL2-P) โรงเรือน BSL2-P ใช้กับพืชดัดแปลงพันธุกรรมและสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้อง ที่หากเกิดการหลุดรอด อาจสามารถดำรงชีวิตอยู่ภายในสิ่งแวดล้อมภายนอกโรงเรือนได้แต่ไม่เกิด ผลกระทบในเชิงลบหรือสามารถจัดการได้ รวมถึงงานวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมที่มีความเกี่ยวข้องกับพืชใน 2 กรณี ได้แก่ เชื้อสาเหตุของโรคพืชหรือจุลินทรีย์ภายในท้องที่ที่หากหลุดรอดอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม แต่สามารถควบคุมได้หรือจัดการได้ และเชื้อสาเหตุของโรคพืชหรือจุลินทรีย์จากแหล่งอื่นที่หากหลุดรอดก็ไม่ก่อให้เกิด ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมหรือระบบนิเวศ นอกจากนี้โรงเรือน BSL2-P ยังใช้กับงานวิจัยแมลง และสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม ที่มีความเกี่ยวข้องกับพืช หรืองานวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับแมลง และสัตว์ที่มีความเกี่ยวข้องกับพืช ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อระบบนิเวศ หรือสามารถควบคุมได้ หรือจัดการได้

3. ความปลอดภัยทางชีวภาพของโรงเรือนระดับที่ 3 (Biosafety Level 3-Plants; BSL3-P) โรงเรือน BSL3-P ออกแบบมาเพื่อป้องกันการหลุดรอดของพืชดัดแปลงพันธุกรรม จุลินทรีย์ก่อโรคในพืช หรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีความเป็นไปได้ในการก่อผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้รวมถึงงานวิจัยพืชหรือสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมที่ยีนสร้าง สารพิษต่อสัตว์มีกระดูกสันหลังและงานวิจัยการดัดแปลงพันธุกรรมจุลินทรีย์ก่อโรคในแมลง หรือสัตว์ที่มีความเกี่ยวข้องกับพืช ในกรณีที่จุลินทรีย์นั้นอาจมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมภายในท้องที่

4. ความปลอดภัยทางชีวภาพของโรงเรือนระดับที่ 4 (Biosafety Level 4-Plants; BSL4-P) โรงเรือน BSL4-P ใช้กับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ก่อโรคจากแหล่งอื่นที่เป็น เชื้อก่อโรคร้ายแรงต่อพืชเศรษฐกิจภายในประเทศ ที่มีศักยภาพในการแพร่กระจายได้ รวมถึงเชื้อก่อโรคในมนุษย์และการผลิตวัคซีนในพืช ที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบรุนแรงต่อ สุขอนามัยมนุษย์เช่น งานทดสอบข้าวโพดต้านทานเชื้อไวรัสที่มีเปลือกอ่อนหรือเปลือกกระโดด เป็นแมลงพาหะโดยเชื้อไวรัสนั้นไม่พบภายในประเทศแต่เปลือกอ่อนหรือเปลือกกระโดดที่เป็น แมลงพาหะมีอยู่ทั่วไป จึงมีความเสี่ยงที่จะเกิดผลกระทบสูงหากเชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดสอบ ประสิทธิภาพในการต้านทานของข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมเกิดการหลุดรอด



4. การประเมินความเสี่ยง (risk assessment)

การประเมินความเสี่ยง (risk assessment) หมายถึง กระบวนการวิเคราะห์เพื่อประเมินความเสี่ยงอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ไม่ว่าความเสี่ยงนั้นจะเกิดขึ้นโดยตรงหรือโดยอ้อมหรือเกิดขึ้นทันที หรือเกิดตามมาภายหลัง ซึ่งเป็นผลจากการดำเนินการใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม การประเมินความเสี่ยงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มั่นใจว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ ส่วนการทดสอบความปลอดภัยด้านอาหารทำให้มั่นใจได้ว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมไม่มีผลกระทบต่อความปลอดภัยในการบริโภคของมนุษย์

การประเมินความเสี่ยงในพืชดัดแปลงพันธุกรรมสามารถดำเนินการได้หลากหลายวิธี (FAO, 2011) ขึ้นกับชนิดพืชหรือประวัติของพืชที่ได้รับการพัฒนา สำหรับวิธีการประเมินความเสี่ยงทั่วไปมีการประเมินหลักๆ ดังต่อไปนี้ 1) การเสถียรของยีน และการแสดงออกของยีนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม 2)การถ่ายเทยีน (gene flow) ข้ามระหว่างพืชดัดแปลงพันธุกรรมกับพืชตามธรรมชาติ 3) การที่พืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจกลายเป็นวัชพืชที่สามารถบุกรุกพืชอื่นที่อยู่ตามธรรมชาติได้ และ 4) การที่ผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจก่อให้เกิดพิษหรืออาการแพ้ในมนุษย์และสัตว์ได้

4.1. การเสถียรของยีน และ ความเสถียรในการแสดงออกของยีนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม

การพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ โดยวิธีที่นิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุดมี 2 วิธี ได้แก่ 1) การถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมพืชโดยตรงเช่น การใช้เครื่องยิงอนุภาค และ 2) การถ่ายยีนโดยใช้พาหะนำยีนเข้าสู่โครโมโซมพืช เช่นการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ การถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมพืชด้วยการแทรกของ T-DNA เราจะไม่ทราบตำแหน่งของยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปเข้าสู่จีโนมพืชนั้นและจำนวนชุดยีนซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งแบบชุดเดียว (single copy) และหลายชุด (multiple copy) (Windels et al., 2008) นอกจากนี้การสอดแทรกของยีนแบบหลายชุดนั้น อาจเกิดบริเวณเดียวกันหรือต่างบริเวณกัน นอกจากนั้นในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังที่ได้รับการถ่ายยีนอาจจะทำให้เกิด somaclonal variation ได้ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความเสถียรของยีนที่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมพืช รวมถึงความเสถียรในการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าไปด้วย การตรวจสอบความเสถียรของยีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรม พบว่ามีการตรวจสอบการคงอยู่ของยีนทันทีหลังการถ่ายยีน และช่วงแรกของการพัฒนาเป็นต้นพืชหลังจากการถ่ายยีนเท่านั้น ซึ่งส่วนใหญ่ยีนที่ใช้ในการตรวจสอบการคงอยู่จะเป็นยีนคัดเลือก หรือยีนรายงานผลโดยเทคนิคที่ใช้สำหรับการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน และการแสดงออกของยีนที่สอดแทรกเข้าสู่โครโมโซมพืชนั้นมีด้วยกันหลายวิธีเช่น เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เทคนิค Real-time PCR และเทคนิค Southern blot เป็นต้น

4.2 การถ่ายเทยีน (gene flow) ระหว่างพืชดัดแปลงพันธุกรรมสู่ระบบนิเวศ

ปัจจุบันในหลายประเทศทั่วโลกได้มีการอนุญาตให้มีการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรม อย่างแพร่หลาย แต่ในขณะเดียวกันก็มีความวิตกกังวลเกี่ยวกับผลกระทบจากการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะการถ่ายเทยีนสู่สิ่งแวดล้อม ที่อาจจะส่งผลกระทบต่อความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศวิทยา ดังนั้นก่อนนำพืชดัดแปลงพันธุกรรมมาใช้ประโยชน์ในเชิงการค้า จำเป็นจะต้องผ่านการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในประเด็นต่าง ๆ ดังนี้

4.2.1 ศักยภาพในการเคลื่อนย้ายยีนไปยังพืชที่มีความใกล้ชิดโดยผ่านทาง ละอองเกสร การประเมินความสามารถในการผสมข้ามพันธุ์กันได้ และมีลูกที่สามารถมีชีวิตรอด (vertical gene transfer) โดย การถ่ายยีนแบบ vertical gene transfer (VGT) เป็นการส่งถ่าย พันธุกรรมจากพ่อแม่สู่รุ่นลูก (FAO, 2011) หรือเรียกอีกอย่างว่า การผสมพันธุ์ สำหรับพืชพบว่า ละออง เรณูเป็นปัจจัยหลักในการผสมพันธุ์ซึ่งมีประเด็นที่กังวลกันมากจากความเสี่ยงที่พืชดัดแปลงทางพันธุกรรม จะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในระบบนิเวศตามธรรมชาติ นั่นคือพืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจจะมี ความสามารถในการอยู่รอดที่เหนือกว่าพืชปกติมากเกินไป และยีนจากพืชดัดแปลงพันธุกรรมอาจจะหลุด ออกไปสู่สิ่งมีชีวิตในธรรมชาติจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพืชป่าสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับพืชดัดแปลง พันธุกรรมนั้น ซึ่งอาจจะเพิ่มความเป็นไปได้ในการกลายพันธุ์ของพืชป่าชนิดนั้น ดังนั้นจึงมีความ จำเป็นต้องศึกษาลักษณะของละอองเรณู ความสามารถในการงอกของหลอดเรณู ความมีชีวิตของละออง เรณู ความสามารถในการผสมพันธุ์ รวมไปถึงความสามารถในการแพร่กระจายของละอองเรณูใน สภาพแวดล้อม ระยะทางในการแพร่กระจาย เพื่อที่สามารถจัดการดูแลพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดนั้นๆ ได้

4.2.2 ศักยภาพในการเคลื่อนย้ายยีน ไปยังสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่มีความใกล้ชิด (horizontal gene transfer) เป็นการประเมินความสามารถในการเคลื่อนย้ายยีนไปสู่สิ่งมีชีวิตต่างชนิด กันโดยเฉพาะแบคทีเรีย โดย horizontal gene transfer เป็นการส่งถ่ายพันธุกรรมข้ามสายพันธุ์ไปยังสิ่ง มีชีวิตที่ไม่มีความใกล้ชิดกัน (FAO, 2011) พบว่ามีโอกาสเกิดขึ้นบ่อยในสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอตมากกว่า สิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (Hotopp 2011; Mc Ginty et al. 2011; Gao et al. 2014) จากการรายงาน ของ Gao et al. (2014) ได้รายงานการเกิดการส่งถ่ายยีนแบบ horizontal ของพืช ไว้ 2 กลไกดังนี้ 1) การเกิด horizontal gene transfer โดยตรงจากพืชสู่พืช หรือ การโอนถ่ายยีนระหว่าง mitochondrial chloroplasts และ nucleus genome (Matveeva and Lutova, 2014) 2) การเกิด horizontal gene transfer โดยอาศัยพาหะ ตัวอย่างของพาหะในการนำพา ยีนมีดังนี้ ฟังไจ แบคทีเรีย ไวรัส ไวรอยด์ พลาสมิด และแมลง สำหรับโอกาสในการเกิด horizontal gene transfer ในกล้วยไม้ดัดแปลง พันธุกรรมอาจเกิดได้หลายทางดังนี้ เกิดจากทางโรคพืช เช่น Cymbidium mosaic virus แบคทีเรีย เชื้อรา และ แมลง เช่น เพลี้ยไฟ ไรแดง เป็นต้น

สำหรับข้อกังวลเกี่ยวกับการเกิด horizontal gene transfer นั้นส่วนใหญ่มี ความกังวลเกี่ยวกับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะที่ถูกถ่ายเข้าไปในจีโนมพืช เช่น ยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* ยีน *neomycin phosphotransferase (nptII)* ถูกส่งถ่ายไปยังจุลินทรีย์ที่เป็นโรคพืช หรือ จุลินทรีย์ในดิน และอาจทำให้มีความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะ (Daniell et al., 2001) ซึ่งจุลินทรีย์ที่อาจได้รับผลกระทบมากที่สุดคือ จุลินทรีย์รอบรากพืช (rhizosphere microbe) ดังนั้นส่วนใหญ่จึงมีการประเมินความเสี่ยงที่เกิดจากความสามารถในการส่งถ่ายยีนจากพืชดัดแปลง พันธุกรรมสู่แบคทีเรียรอบรากพืช

การประเมินการส่งถ่ายยีนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม Widmer et al. (1996) รายงานการตรวจสอบแปลงปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมสองชนิด คือมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) และ ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) ในระยะเวลา 77 และ 137 วันหลังออกปลูก พบว่าเมื่อนำดินที่ ปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมทั้งสองชนิดมาตรวจสอบหา ยีน nptII พบการคงอยู่ของยีน nptII ในตัวอย่าง

ดิน และจากการรายงานของ Gebhard and Smalla (1999) รายงานว่า เมื่อตรวจสอบดินที่ปลูกต้นชูการ์บีท (Beta vulgaris L.) พบการคงอยู่ของซิงค์ไดเอโนเอที่ถ่ายเข้าไปในจีโนมของต้นชูการ์บีทที่ดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nielsen et al. (2000) ที่พบการส่งถ่ายยีนหรือชิ้นส่วนของยีนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. strain BD413 ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

แต่อย่างไรก็ตาม Smalla et al., (2000) รายงานว่าโอกาสในการตรวจพบชิ้นส่วนของยีนจากต้นพืชดัดแปลงพันธุกรรมในดิน และสิ่งแวดล้อมสามารถเกิดขึ้นได้ แต่โอกาสในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรียรอบรากหรือแบคทีเรียในดินนั้นจำเป็นต้องมีความพร้อมของชิ้นส่วนยีนและ competent ของแบคทีเรียในดินจึงจะสามารถส่งผ่านได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Nielsen and van Elsas (2001) ความสามารถในการส่งถ่ายยีนจะเกิดขึ้นได้ต้องมีความพร้อมของหลายอย่างดังนี้ ความหลากหลายของสารอนินทรีย์ เช่น inorganic salts และแหล่งคาร์บอนจาก root exudates ที่จะไปกระตุ้นการเกิด competent cell ของแบคทีเรีย

นอกจากนี้ Dunfield and Germida (2003) รายงานว่า ในขณะที่โอกาสในการคงอยู่ของชิ้นส่วนหรือดีเอ็นเอของพืชดัดแปลงพันธุกรรมมีอยู่มาก แต่โอกาสในการส่งถ่ายยีนจากพืชดัดแปลงพันธุกรรมสู่แบคทีเรียรอบรากเกิดขึ้นได้น้อย เนื่องจาก เพราะ 1) ภายในสภาพแวดล้อมมี exo/endonuclease ที่สามารถทำลายชิ้นยีนที่ถูกปลดปล่อยมา 2) สภาพดินบริเวณรอบรากพืชมี substrate เช่น humic acid ที่สามารถเกาะกับชิ้นยีนที่ถูกปลดปล่อยมาทำให้ชิ้นยีนไม่สามารถถ่ายทอดสู่ดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้ (inactivation) 3) ลักษณะและรูปร่างของก้อนดินมีส่วนสำคัญในการจับเกาะหรือปกป้องชิ้นยีนที่ถูกถ่ายออกมา โดยในกรณีที่เกาะกับชิ้นยีนก็จะทำให้ชิ้นยีนไม่สามารถถ่ายทอดสู่ดีเอ็นเอได้ สำหรับกรณีที่รูปร่างดินเหนียวสามารถปกคลุมชิ้นยีนให้พ้นจาก substrate หรือ เอนไซม์ต่างๆได้ ซึ่งจะทำให้มีโอกาสในการส่งต่อยีนได้ (stabilization) แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบระหว่างสิ่งแวดล้อมและความเข้มข้นของยีนที่เหมาะสมกัน

4.3 ศึกษาผลกระทบของพืชดัดแปลงพันธุกรรมต่อระบบนิเวศ แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere microbes) โดยอาศัยอยู่บริเวณรอบผิวราก ผิวรากพืช และบริเวณขนราก โดยพบว่า จุลินทรีย์จะมีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ เมื่อระยะทางห่างออกจากผิวราก (Sylvia et al., 1998) ทั้งนี้เนื่องมาจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังกล่าว รวมถึงโครงสร้างของประชากรจุลินทรีย์ในดิน ชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์ ได้รับอิทธิพลจากรากพืชโดยตรง ได้รับสารประกอบอินทรีย์ต่างๆจากรากพืช เนื่องจากสารประกอบอินทรีย์ที่พืชปลดปล่อยออกมานั้นมีปฏิสัมพันธ์ ระหว่างรากพืชและจุลินทรีย์รอบรากพืช ซึ่งพืชในธรรมชาติแต่ละชนิดนั้นจะมีการปลดปล่อยสารที่มีความจำเพาะ จึงมีผลต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์รอบราก (Lynch and Whipps, 1990; Bowen and Rovira, 1991) จากหลักการดังกล่าวนี้ ได้มีการนำมาใช้สำหรับการประเมินความเสี่ยงของการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีผลต่อโครงสร้าง และหน้าที่ของประชากรจุลินทรีย์ในดินเปรียบเทียบกับพืชปกติ โดยการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ธรรมชาติ (Griffiths et al., 1999; Jaeger et al., 1999) เปรียบเทียบกับระหว่างพืชดัดแปลงพันธุกรรมกับพืชพันธุ์ดั้งเดิม

5. การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในพืชที่ได้รับการปรับแต่งจีโนม

เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม (genome editing) เป็นเทคนิคใหม่ที่น่าสนใจในการแก้ไขยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจีโนมได้อย่างแม่นยำ ได้ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด ทำให้ได้ลักษณะที่ดีทางการเกษตร และการปรับปรุงสายพันธุ์ทำได้รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เทคโนโลยีการแก้ไขจีโนมที่เป็นที่นิยมคือ ระบบ CRISPR/Cas โดยการทำงานของเอนไซม์ Endonuclease ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ ณ จุดที่มีลำดับเบสเป้าหมายแยกออกจากกัน เรียกว่า Double-Stranded Break (DSB) โดยทั่วไปหากปรากฏการณ์ DSB เกิดขึ้นตามธรรมชาติและปล่อยทิ้งไว้จะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ดังนั้นสิ่งมีชีวิตจึงมีกลไกในการซ่อมแซมบริเวณ DSB โดยมีกลไกในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ 2 กลไก ได้แก่ 1) Non-Homologous End Joining (NHEJ) เป็นการทำให้ส่วนของดีเอ็นเอที่ผิดปกติหลุดออกไป แล้วเชื่อมปลายโครโมโซมทั้ง 2 ข้างที่เหลืออยู่เข้าหากัน ทำให้ยีนที่ผิดปกติไม่สามารถแสดงออกได้ หรือเรียกว่า gene knockout) และ 2) Homologous Recombination-Directed Repair หรือ Homology-Directed Repair (HDR) ซึ่งนำเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปกติสอดแทรกเข้าไปทดแทน (insertion) ในบริเวณเป้าหมายของจีโนม

กลไกในการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบ NHEJ หรือ HDR อาศัยการทำงานของชนิดของเอนไซม์ nucleases ซึ่งมีทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ Site-Directed nucleases1 - 3

1) Site-Directed nucleases1 (SDN-1) เป็นการตัดดีเอ็นเอสายคู่ (deletions) ให้ขาดในตำแหน่งที่ต้องการแก้ไขโดยไม่มีการใส่ดีเอ็นเอใหม่เข้าไป ได้ลักษณะการกลายพันธุ์แบบการขาดหายของลำดับเบส

2) Site-Directed nucleases2 (SDN-2) เป็นการแทนที่ของดีเอ็นเอ (DNA substitution) โดยมีการใส่ดีเอ็นเอใหม่เข้าไปปรับแต่งยีนเพียงเล็กน้อย ประมาณ 6-20 เบส

3) Site-Directed nucleases3 (SDN-3) เป็นการใส่สายดีเอ็นเอ (DNA insertion) ใหม่เข้าไปโดยใส่ยีนยีนที่ต่างกับตำแหน่งยีนที่ตัด หรือยีนที่ให้ลักษณะใหม่

ตารางที่ 4.1 การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพในพืชที่ได้รับการปรับแต่งจีโนม

ประเทศ	รูปแบบ			รายละเอียดการพิจารณา
	SDN1	SDN2	SDN3	
สหรัฐอเมริกา	Not GMO	Not GMO	GMO	ได้รับการพิจารณาจาก USDA-APHIS
อาร์เจนตินา	Not GMO	Not GMO	GMO	ต้องได้รับคำปรึกษาจากหน่วยงานผู้รับผิดชอบ
ยุโรป	GMO	GMO	GMO	ข้อตัดสินใจของ ECJ เมื่อวันที่ 25 ก.ค. 2561 ต่อระเบียบ Directive 2001/18/EC
ออสเตรเลีย	Not GMO	GMO	GMO	ตามกฎหมายยีนเทคโนโลยี (Gene technology Act. 2000) ที่แก้ไขเพิ่มเติม มีผลบังคับใช้ 8 ต.ค. 2562
ญี่ปุ่น	Not GMO	Not GMO /GMO	GMO	หน่วยงานผู้รับผิดชอบพิจารณาจากข้อมูลการพัฒนาผลิตภัณฑ์ด้วยเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม
ฟิลิปปินส์	Not GMO	Not GMO	GMO	ต้องได้รับคำปรึกษาจากหน่วยงานผู้รับผิดชอบ
สำหรับประเทศไทย				
>>>>>>	Not GMO	Not GMO /GMO	GMO	SDN ทุกรูปแบบต้องแจ้งหน่วยงานผู้รับผิดชอบ และสำหรับรูปแบบ SDN2 ให้พิจารณาเป็นรายกรณี

ในหลายประเทศเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม (genome editing technology) ที่สามารถแก้ไขจีโนมได้หลายรูปแบบ ทั้งมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมแบบเพิ่มยีนอื่น (foreign gene) และแบบไม่เพิ่มยีนอื่นซึ่งคล้ายกับรูปแบบการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ตามธรรมชาติ จึงมีการทบทวนและปรับปรุงกฎหมายตลอดจนหลักเกณฑ์ในการประเมินความปลอดภัยของสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อให้สอดคล้องกับบริบททางวิชาการ ได้มีการแบ่งประเภทของอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาจากเทคโนโลยีการปรับแต่ง จีโนม ออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

- **ประเภทที่ 1** หมายถึง อาหารที่มาจากสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาด้วยเทคนิค site-directed nuclease 1 (SDN1) หรือเทคนิคการปรับแต่งจีโนมอื่นที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงลำดับดีเอ็นเอแบบเกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มบริเวณจำเพาะ (site-specific random mutations) ทั้งการแทนที่ (substitutions) การแทรก (insertions) และการลบ (deletions) ที่บริเวณดีเอ็นเอเป้าหมาย และต้องไม่มีดีเอ็นเอแปลกปลอมอื่น ๆ (foreign DNA) ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย
- **ประเภทที่ 2** หมายถึง อาหารที่มาจากสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาด้วยเทคนิค site-directed nuclease 2 (SDN2) หรือเทคนิคการปรับแต่งจีโนมอื่นที่มีการใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อดัดแปลงลำดับดีเอ็นเอเป้าหมายให้เป็นตามที่คาดการณ์ไว้ โดยกระบวนการ homology-directed repair (HDR)
- **ประเภทที่ 3** หมายถึง อาหารที่มาจากสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาด้วยเทคนิค site-directed nuclease 3 (SDN3) หรือเทคนิคการปรับแต่งจีโนมอื่นที่ใช้เทคนิคทั้งกระบวนการ non-homologous end-joining (NHEJ) และ homology-directed repair (HDR) เพื่อแทรกยีนในตำแหน่งจีโนมเป้าหมาย

ตารางที่ 4.2 อาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาจากเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมแต่ละประเภท มีเกณฑ์การประเมิน ดังนี้

หัวข้อ	ประเภทที่ 1 (SDN1)	ประเภทที่ 2 (SDN2)	ประเภทที่ 3 (SDN3)
1. ข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังการปรับแต่งจีโนม	✓	✓	✓
2. ข้อมูลผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการปรับแต่งจีโนม	✓	✓	✓
3. ข้อมูลการแทรกดีเอ็นเอสังเคราะห์ (spurious DNA Insertions) นอกตำแหน่งที่ได้รับผลกระทบ	-	✓	✓
4. อ้างอิงตามข้อกำหนดขั้นต่ำสำหรับยื่นขอประเมินความปลอดภัยของอาหารที่ผลิตจากจุลินทรีย์/พืช/สัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม (case-by-case) ได้แก่ ด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล ด้านคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ ด้านโภชนาการ ด้านพิษวิทยา และด้านการก่อภูมิแพ้	-	ประเมินบางรายการ โดยพิจารณาจาก คุณสมบัติของ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ เป็น กรณี ๆ ไป ✓	✓

6. การกำกับดูแลพืชดัดแปลงพันธุกรรมในระดับสากลและในประเทศไทย

การกำกับดูแลพืชดัดแปลงพันธุกรรมในระดับสากล จากการพัฒนาพืชดัดแปลงพันธุกรรม มีการถ่ายยีนหรือสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอื่นเข้าไป เพื่อให้มีลักษณะตามต้องการ จึงเกิดเป็นข้อกังวลถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อสิ่งแวดล้อมและการบริโภค หลักสากลเกี่ยวกับการดูแลความปลอดภัยของสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม เรียกว่า ความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety) ก่อนใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต้องผ่าน การประเมินความเสี่ยง (risk assessment) ภายใต้กระบวนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่มีมาตรฐานเป็นที่ยอมรับ ในระดับสากล แบบทีละขั้นตอน (step-by-step) ตั้งแต่ระดับสภาพควบคุมจนกระทั่งถึงระดับภาคสนาม องค์การนาซาได้ได้ออกกฎระเบียบและแนวทางปฏิบัติเพื่อสนับสนุนหลักการดังกล่าว ประกอบด้วย

1. พิธีสารคาร์ตาเฮนาว่าด้วยความปลอดภัยทางชีวภาพเป็นกฎหมายระหว่างประเทศฉบับแรก ที่มีเนื้อหาในการควบคุมดูแลสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ภายใต้อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ เป็นแนวทางสำหรับการควบคุมความปลอดภัยจากการเคลื่อนย้ายข้ามแดน การจัดการและการใช้สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมผ่านกลไก ข้อตกลงการแจ้งล่วงหน้าก่อนการขนส่งข้ามพรมแดน การประเมิน ความเสี่ยงด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์ และการปฏิบัติสำหรับนำมาใช้เป็นอาหารคน อาหารสัตว์ และใช้ในกระบวนการผลิต

2. แนวทางปฏิบัติสำหรับการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของอาหารที่ได้จากพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยคณะกรรมการอาหารโครุกรามาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) ความร่วมมือระหว่างองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลก (WHO) เป็นแนวทางประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อคุ้มครองสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค ให้เกิดความเชื่อมั่น จัดอุปสรรคทางการค้าระหว่างประเทศ

3. ความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยพืช และความตกลงว่าด้วยอุปสรรคทางการค้า (SPS/TBT) เป็นความตกลงภายใต้ WTO ให้ประเทศสมาชิกสามารถกำหนดข้อยกเว้นที่เป็นเงื่อนไขเฉพาะในกรณีจำเป็นสามารถนำมาบังคับใช้ในกรณีของสินค้าดัดแปลงพันธุกรรม

4. อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC) จัดทำขึ้นภายใต้ความรับผิดชอบของ FAO เพื่อสร้างความร่วมมือระหว่างประเทศในการควบคุมและการป้องกันการแพร่ระบาดของศัตรูพืช โดยให้แต่ละประเทศพิจารณาความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น ทั้งในเชิงผลกระทบทางเศรษฐกิจและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และใช้มาตรการบนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อปกป้องตามความเหมาะสม ในส่วนที่เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ครอบคลุมแนวทางการประเมินและจัดการความเสี่ยงต่อสุขอนามัยพืชและผลิตภัณฑ์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยให้พิจารณาประเมินความเสี่ยงสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม เป็นกรณี ๆ ไป

โดยแต่ละประเทศจะกำหนดกฎระเบียบในการกำกับดูแลและประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพตามหลักเกณฑ์ขององค์การระดับนานาชาติ โดยแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ

- 1) การใช้กฎหมายเดิมที่มีอยู่ในการกำกับดูแล ได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2) การตรากฎหมายใหม่เป็นการเฉพาะเพื่อใช้ในการกำกับดูแล เช่น สหภาพยุโรป ประเทศญี่ปุ่น ประเทศออสเตรเลีย ประเทศจีน และประเทศอินโดนีเซีย เป็นต้น

ประเทศส่วนใหญ่ใช้กลไกการกำกับดูแลในรูปแบบของการตรากฎหมายใหม่ รายละเอียด ในการบริหารจัดการและการบังคับใช้ขึ้นอยู่กับบริบทของแต่ละประเทศ โดยหลักการสำคัญคือให้มีกระบวนการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพก่อนมีการอนุญาตให้ใช้ประโยชน์

ประเทศไทยยังไม่มีกฎหมายเฉพาะในการกำกับดูแลสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ต้องอาศัยกฎหมายที่มีความใกล้เคียงขยายกรอบการดูแลมาบังคับใช้ได้แก่ พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม ประกาศให้พืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นสิ่งต้องห้ามนำเข้ามายังภายในประเทศ ยกเว้นเพื่อ การทดลองวิจัย และมีการกำหนดกฎเกณฑ์ในการนำเข้ามาเพื่อการวิจัยต้องมีการทดลองที่ ละขั้นตอน รวมถึงต้องมีการศึกษาผลกระทบเพื่อประเมินความเสี่ยงต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้ พระราชบัญญัติ กักพืชมีอำนาจในการกำกับดูแลเฉพาะพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการพัฒนาจากต่างประเทศและประสงค์ จะนำเข้ามายังภายในประเทศเท่านั้น แต่ไม่ครอบคลุมถึงการวิจัยพัฒนาที่เกิดขึ้นภายในประเทศ ทำให้ พระราชบัญญัติกักพืชไม่สามารถบังคับใช้ในกรณีดังกล่าวได้

การดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ของประเทศไทยมีกฎหมายที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

1. กรณีการนำเข้าจากต่างประเทศ

พืชดัดแปลงพันธุกรรม : ประเทศไทยเริ่มมีกฎระเบียบเพื่อการควบคุมพืชดัดแปลง พันธุกรรม เมื่อวันที่ 7 มิถุนายน 2537 อาศัยพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 โดยกรมวิชาการเกษตร เพื่อควบคุมการนำเข้าพืชจากต่างประเทศ โดยการประกาศชื่อพืช ศัตรูพืช หรือพาหะให้เป็นสิ่งต้องห้ามหรือ สิ่งกีดขวาง ห้ามนำเข้าในราชอาณาจักร และควบคุมพืชจุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตที่เป็นประโยชน์ (beneficial organisms) บางชนิด เช่นตัวห้ำ ตัวเบียน ผีเสื้อ ซึ่งเป็นนิยามของคำว่า “พืช” ในกฎหมาย ฉบับนี้พระราชบัญญัติกักพืชได้นำมาใช้ควบคุมการนำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมจากต่างประเทศ แต่ไม่ สามารถควบคุมพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นภายในประเทศได้

พระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 กำหนดให้พืชที่ได้รับการดัดแปลง พันธุกรรม ที่จะขอรับความคุ้มครองเป็นพืชพันธุ์ใหม่ ต้องผ่านการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ ต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพหรือสวัสดิภาพของประชาชน

พระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 ควบคุมพันธุ์พืช (การจำหน่ายเมล็ดพันธุ์พืชจากการ ดัดแปลงพันธุกรรม)

จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม : ในส่วนจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมโดยทั่วไป ยังไม่มี กฎระเบียบเฉพาะในการดูแลการนำเข้า แต่หากเป็นจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมที่เป็นเชื้อโรคจะอาศัย อำนาจของพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2525 จะต้องมิใบอนุญาตจากอธิบดีกรม วิทยาศาสตร์ การแพทย์ก่อนที่จะมีการดำเนินการกับเชื้อโรคนั้น โดย พรบ. ฉบับปัจจุบัน ยกเว้นให้กับ ห นั ว ย ง า น ข อ ง ร ัฐ ไม่ต้องทำการขออนุญาต แต่ยังคงปฏิบัติตามแนวทางปฏิบัติ แต่ฉบับที่อยู่ระหว่างการปรับปรุงใหม่ หน่วยงานของรัฐจะต้องทำการขออนุญาตด้วย

กรณีการวิจัยในห้องปฏิบัติการ

พืชดัดแปลงพันธุกรรม : ดำเนินการตามแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ สำหรับการดำเนินการเกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่หรือพันธุวิศวกรรม (เล่มสาม, 2559) ที่จัดทำขึ้น โดยคณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ (Technical Biosafety Committee – TBC) แต่อย่างไรก็ตามแนวทางปฏิบัติดังกล่าวเป็นการดำเนินงานในลักษณะสมัครใจ (voluntary)

พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่นำเข้าเพื่อศึกษาทดลองหรือวิจัย : จะต้องปฏิบัติตาม พระราชบัญญัติกักพืช ซึ่งกรมวิชาการเกษตรได้ออกประกาศเรื่อง กำหนดแนวทางปฏิบัติในการขอ อนุญาตนำเข้า หรือนำผ่านซึ่งสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขแล้ว (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2544 กำหนดให้ผู้ประสงค์จะนำพืชดัดแปลงพันธุกรรมเข้ามาศึกษาทดลองในประเทศไทย ทำ การขออนุญาตตามขั้นตอนโดยมีการออก “คู่มือในการขออนุญาตนำเข้าและศึกษาทดลองพืชดัดแปลง พันธุกรรม” สำหรับปฏิบัติตาม

จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม : ดำเนินการตามแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทาง ชีวภาพสำหรับการดำเนินการเกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่หรือพันธุวิศวกรรม และแนวทางปฏิบัติ เพื่อ ความปลอดภัยทางชีวภาพ สำหรับการใช้จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมในสภาพควบคุมเพื่อใช้ ในระดับโรงงานต้นแบบและอุตสาหกรรม ที่จัดทำขึ้นโดยคณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทาง ชีวภาพ (TBC) แต่อย่างไรก็ตามแนวทางปฏิบัติดังกล่าวเป็นการดำเนินงานในลักษณะสมัครใจ (voluntary)

แต่อย่างไรก็ตามการวิจัยเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรมทั้งจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ จะดำเนินการตามแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการดำเนินการเกี่ยวกับ เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่หรือพันธุวิศวกรรม โดยผ่านกระบวนการของคณะกรรมการความปลอดภัย ทางชีวภาพระดับสถาบัน (IBC)

กรณีการทดสอบในภาคสนาม

การทดสอบในภาคสนามของพืชดัดแปลงพันธุกรรมและจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมจะ ใช้กฎระเบียบเช่นเดียวกับการวิจัยทดลองในห้องปฏิบัติการ

มติคณะรัฐมนตรีที่สำคัญ

- 3 เมษายน 2544 คณะรัฐมนตรีมีมติให้ยุติการทดสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมในระดับ ภาคสนาม
- 31 สิงหาคม 2547 กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ได้รับมอบหมายให้ จัดทำร่างกฎหมายความปลอดภัยทางชีวภาพ
- 25 ธันวาคม 2550 คณะรัฐมนตรีมีมติให้สามารถขยายการทดลองวิจัยพืชดัดแปลง พันธุกรรมไปสู่ระดับภาคสนามได้ โดยให้ดำเนินการในพื้นที่ของราชการ มีการระบุพื้นที่และชนิดพืชให้ ชัดเจน มีมาตรการควบคุมเข้มงวด ต้องจัดให้มีการรับฟังความคิดเห็นของประชาชนและผู้มีส่วนได้เสีย แล้วจึงนำเสนอคณะรัฐมนตรีเพื่อขออนุมัติเป็นรายการ

กรณีการใช้ในเชิงการค้า

พืชดัดแปลงพันธุกรรม : ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่อนุญาตให้มีการปลูกพืชดัดแปลง พันธุกรรมในเชิงการค้า ซึ่งจะอาศัยอำนาจของพระราชบัญญัติกักพืช แต่ยกเว้นให้มีการนำเข้าข้าวโพด

และ ตัวเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมได้ โดยต้องมีการติดฉลากผลิตภัณฑ์ตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ภายใต้พระราชบัญญัติอาหาร

จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม : ยังไม่มีกฎหมายที่ควบคุมดูแลโดยตรง แต่มีแนวทางปฏิบัติ เพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการใช้จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมในสภาพควบคุมเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม

นอกจากนี้ยังมีมาตรฐาน หรือ ประกาศต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่อีกหลายฉบับ

เอกสารอ้างอิง

จิต อินปรา และ ณัฐา โพธารณณ์. 2552. การผสมข้ามชนิดและการผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้.

วารสารพืชสวน.25(2): 101-108.

เดชา ทรงต่อศรีสกุล. 2556. ความมีชีวิตและการงอกของเรณูกล้วยไม้สกุลหวายที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆในช่วงระยะเวลา 3 เดือน. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หนึ่งฤทัย เดชสังกรานนท์.2556. สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชักนำการงอกของเรณูกล้วยไม้สกุลหวายบางสายพันธุ์. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Beckie H.J., S. I. Warwick, L. M. Hall and K. N. Harker. 2012. Pollen-mediated gene flow in wheat fields in western Canada. The Journal of Agrobiotechnology Management and Economics 15:36-43.

Bowen, G.D. and A. D. Rovira. 1991. The rhizosphere, the hidden half of the hide Half, In Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi, Eds. Plant Roots, The Hidden Half. Marcel Dekker, Inc. New York. 641-659.

Bruseti, L., Francia, P., Bertolini, C., Pagliuca, A., Borin, S., Sorlini, C., Abruzzese, A., Sacchi, G., Viti, C., Giovannetti, L., Giuntini, E., Bazzicalupo, M., Daffonchio, D. 2004. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic *Bt* 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. Plant Soil 266: 11-21.

Daniell, H., B. Muthukumar, and S.B. Lee. 2001. Marker free transgenic plants: Engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. Current Genetics 37: 109-116.

Dunfield, K. E., and J.J. Germida. 2001. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root-interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. FEMS Microbiology Ecology 38:1-9.

Dunfield, K. E., and J.J. Germida. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*.) Applied and Environmental Microbiology 69: 7310-7318.

- FAO. 2011. Biosafety Resource Book: Module B Ecological Aspects., Rome, Italy. ISBN 978-92-5-106718-5
- Fang, M., Motavalli, P.P. and Davis, G. 2005. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4132-4136.
- Gao, C., X. Ren, A. S. Mason, H. Liu, M. Xiao, J. Li and D. Fu. 2014. Horizontal gene transfer in plants. *Function and Integrative Genomics* 14: 23-29.
- Ge, Y., C. Fu, H. Bhandari, J. Bouton, E. C. Brummer and Z.Y. Wang. 2011. Pollen viability and longevity of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Crop Science* 51: 2698-2705.
- Gebhard, F., and K. Smalla. 1999. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 261-271.
- Griffiths, B.S., K. Ritz, N. Ebbelwhite and G. Dobson. 1999. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry*. 1: 145-153.
- Griffiths, B.S., Heckmann, L.H., Caul, S., Thompson, J., Scrimgeour, C., and P.H. Krogh. 2007. Varietal effects of eight paired lines of transgenic *Bt* maize and near-isogenic non-*Bt* maize on soil microbial and nematode community structure. *Plant Biotechnology Journal* 5: 60-68.
- Gynamfi, S., U. Pfeifer, M. Stierschneider, and A. Sessitsch. 2002. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 41: 181-190.
- Hotopp, J.C.D. 2011. Horizontal gene transfer between bacteria and animals. *Trends Genetics* 27(4): 157-163.
- Jaeger, III, C. H., S.E. Lindow, W. Miller, E. Clark and M. K. Firestone. 1999. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2685-2690.
- Larsem, C., P. Burns and W. Kosiratana. 2011. Effects of transgenic papaya resistant to papaya ringspot virus on rhizosphere bacterial Community. *Agricultural Science Journal* 42: 61-73.
- Lim, C.Y., D.S. Kim, K.J. Lee, K. A. Hwang, Y.K Choo and K. Ko. 2014. Optimization of storage temperature for the pollen viability of transgenic plants that express the

- anti-breast cancer monoclonal antibody mAb BR55. *Plant Omics Journal* 7: 403-409.
- Lynch, J. M. and J. M. Whipps. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129: 1-10.
- Matveeva, T.V. and L. A. Lutova. 2014. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-11.
- Mc Ginty S.E., Rankin D.J. and S.P. Brown. 2011. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial cooperation. *Evolution* 65: 21-32.
- Nielsen, K.M., K. Smalla and J. D. Van Elsas. 2000. Natural transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 206-212.
- Schmalenberger, A., and C.C. Tebbe. 2002. Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar biosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 40: 29-37.
- Sylvia, D.M., J.F. Jeffry and A.Z. David. 1998. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. 8th ed. Prentice Hall Publ. Upper Saddle River. Inc., New Jersey.
- Widmer, F., R.J. Seidler, and L.S. Watrud. 1996. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Molecular Ecology* 6: 1-7.
- Windels, P., S. De Buck and A. Depicker. 2008. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation: pattern of T-DNA integration into the the host genome. pp. 441-481. *In* Tzfira V. and V. Citovsky. *Agrobacterium from Biology to Biotechnology*. Springer. New York.



บทที่ 5

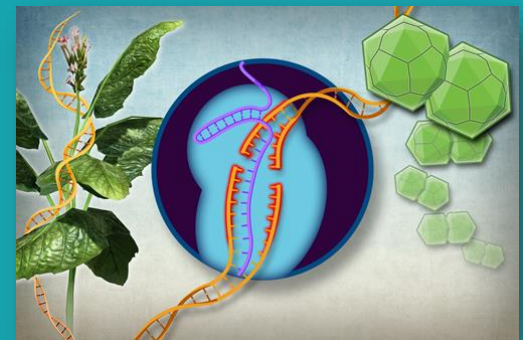
การตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025



เรียบเรียงโดย ชูติรัตน์ อัครมงคลศิริ

กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรมวิชาการเกษตร 2565

ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมา พืชและจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในหลายประเทศทั่วโลก โดยมีพื้นที่เพาะปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงพาณิชย์ขยายตัวอย่างรวดเร็วในหลายประเทศ รวมไปถึงประเทศในกลุ่มอาเซียน (ASEAN) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทั้งด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตร เช่น วัคซีนโควิด-19 ชนิดสารพันธุกรรม หรือวัคซีนชนิดเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA vaccine) จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถผลิตเอนไซม์เชิงอุตสาหกรรม พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่เพิ่มผลผลิตและทนทานต่อโรคและแมลง เป็นต้น การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีตามการเปลี่ยนแปลงของโลกเพื่อให้สอดคล้องกับการสร้างเสริมสุขภาพที่แข็งแรง และมีความมั่นคงทางอาหาร (Food security) ให้ทุกคนสามารถเข้าถึงอาหารที่เพียงพอปลอดภัย และมีคุณค่าทางโภชนาการ และมีเสถียรภาพด้านอาหาร



ประเทศไทย พร้อมที่จะเปิดกว้าง
ด้านพืชดัดแปลงพันธุกรรมแล้วหรือยัง

1. กฎระเบียบที่เกี่ยวข้องกับสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม

การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม ในการตัดต่อสารพันธุกรรมของพืช ยังเป็นที่ถกเถียงทางการค้า โดยหลายประเทศ เช่น ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปและประเทศญี่ปุ่น ได้ออกกฎ ระเบียบ ข้อบังคับ การติดฉลากในผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสม หรือได้จากวัตถุดิบที่เป็นพืชตัดต่อสารพันธุกรรม ดังนั้นสินค้าเกษตรและอาหารต่าง ๆ ที่ส่งออกไปยังประเทศปลายทาง จะต้องได้รับการตรวจสอบและรับรองว่า “เป็นหรือมีส่วนประกอบจากพืชที่ได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรมหรือไม่” ซึ่งประเทศไทยมีแนวทางกำกับดูแลพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับด้านการนำเข้า-ส่งออก ดังนี้



หากต้องการนำเข้า
หรือส่งออก
พืช หรือสินค้าเกษตร

ต้องดำเนินการ
ด้านพืชดัดแปลงพันธุกรรม
อย่างไร



1.1 ด้านการนำเข้า

- ➡ พืชที่ได้รับการติดต่อสารพันธุกรรมจากทุกแหล่งเป็นสิ่งต้องห้าม “ห้ามนำเข้ามาในราชอาณาจักร ยกเว้นเพื่อการทดลองหรือวิจัย” ซึ่งต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ที่กำหนด (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้นและเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 10) พ.ศ. 2553 ลงวันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2553)
 - การนำเข้าหรือนำผ่านเพื่อการทดลองหรือวิจัย ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับ
 - การนำเข้าหรือนำผ่านเพื่อการค้า หรือเพื่อกิจการอื่นตามที่อธิบดีประกาศกำหนด โดยคำแนะนำของคณะกรรมการ จะต้องมีการรับรองสุขอนามัยพืชกำกับ
- ➡ การนำเข้าพืชอื่น ๆ ที่มีความเสี่ยง เช่น เมล็ดพันธุ์พืช เจ้าหน้าที่จากด่านนำเข้าสินค้าเกษตร จะสุ่มตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร หากพบมีการปะปนพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะแจ้งผู้นำเข้า आयัด และควบคุมการทำลาย
- ➡ สามารถนำเข้าพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ ตามข้อยกเว้นและเงื่อนไขดังนี้ (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้นและเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 10) พ.ศ. 2553 ลงวันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2553)
 - อาหารสำเร็จรูป
 - ข้าวโพดใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ หรืออาหารสำหรับมนุษย์ หรือเพื่อใช้ในการอุตสาหกรรม (ต้องมีใบรับรองปลอดศัตรูพืชจากประเทศผู้ส่งออกกำกับ)
 - ถั่วเหลืองใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ หรืออาหารสำหรับมนุษย์ หรือเพื่อใช้ในการอุตสาหกรรม (ต้องมีใบรับรองปลอดศัตรูพืชจากประเทศผู้ส่งออกกำกับ)
- ➡ การนำเข้า ซื่อ-ขาย พืชที่ได้รับการติดต่อสารพันธุกรรม ซึ่งไม่ปฏิบัติตามที่กฎหมายกำหนด (พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 มาตรา 21)
 - ผู้ใดไม่ปฏิบัติตามมาตรา 8 มาตรา 11 มาตรา 15 ทวิ วรรคสอง หรือมาตรา 15 ฉ หรือฝ่าฝืนมาตรา 14 ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกิน 1 ปี หรือปรับไม่เกิน 20,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

1.2 ด้านการส่งออก



- สำหรับพันธุ์พืชที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพืชที่ไม่ได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรม ตามแนบท้ายประกาศจำนวน 157 ชนิด ไม่ต้องนำพืชดังกล่าวมาตรวจสอบ โดยสามารถออกหนังสือรับรอง Certificate of non-GM plant in Thailand จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้ประกอบในการส่งออก (ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องการรับรองพืชที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพืชที่ไม่ได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรม พ.ศ. 2543 ลงวันที่ 23 สิงหาคม พ.ศ. 2543 และประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องการรับรองพืชที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพืชที่ไม่ได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรม (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2555 ลงวันที่ 11 มกราคม พ.ศ. 2555)
- พืช หรือสินค้าเกษตรอื่น ๆ ทำการส่งตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรม จากห้องปฏิบัติการทดสอบ ตามการควบคุมมาตรฐานสินค้าเกษตรที่กำหนด หรือดำเนินการตามข้อกำหนดของประเทศคู่ค้า
 - หลักการของการผลิตเกษตรอินทรีย์ ไม่รวมการใช้สิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม ผลผลิตและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการดัดแปลงพันธุกรรม และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยการดัดแปลงพันธุกรรม ยกเว้นผลิตภัณฑ์ยาสัตว์ (มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9000 – 2564 ลงวันที่ 11 ตุลาคม 2564)
 - ผู้ที่ประสงค์จะส่งออกพืชและสินค้าพืชไปยังประเทศอินเดีย รายการตามประกาศแนบท้ายจำนวน 26 รายการ ต้องออกหนังสือรับรอง Certificate for Non-GM Origin and GM Free Status จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ซึ่งประเทศไทยได้เจรจากับหน่วยงานกำกับดูแลความปลอดภัยด้านอาหารของอินเดีย (Food safety and standard authority of India; FSSAI) และสามารถออกหนังสือรับรองได้ ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2564 เป็นต้นไป (Department of Agriculture, 2021; FDA Bhawan, 2020)
- มะละกอบ้างเป็นพืชควบคุมเฉพาะ ต้องส่งตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรม จากห้องปฏิบัติการทดสอบ และขอใบรับรองสุขอนามัยก่อนส่งออกไปยังประเทศปลายทาง (ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการขอและออกใบรับรองสุขอนามัยสำหรับการส่งออกมะละกไปยังสหภาพยุโรป นอร์เวย์ สมาพันธรัฐสวิส สาธารณรัฐไอซ์แลนด์ จีน และญี่ปุ่น พ.ศ. 2559 ลงวันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2559)



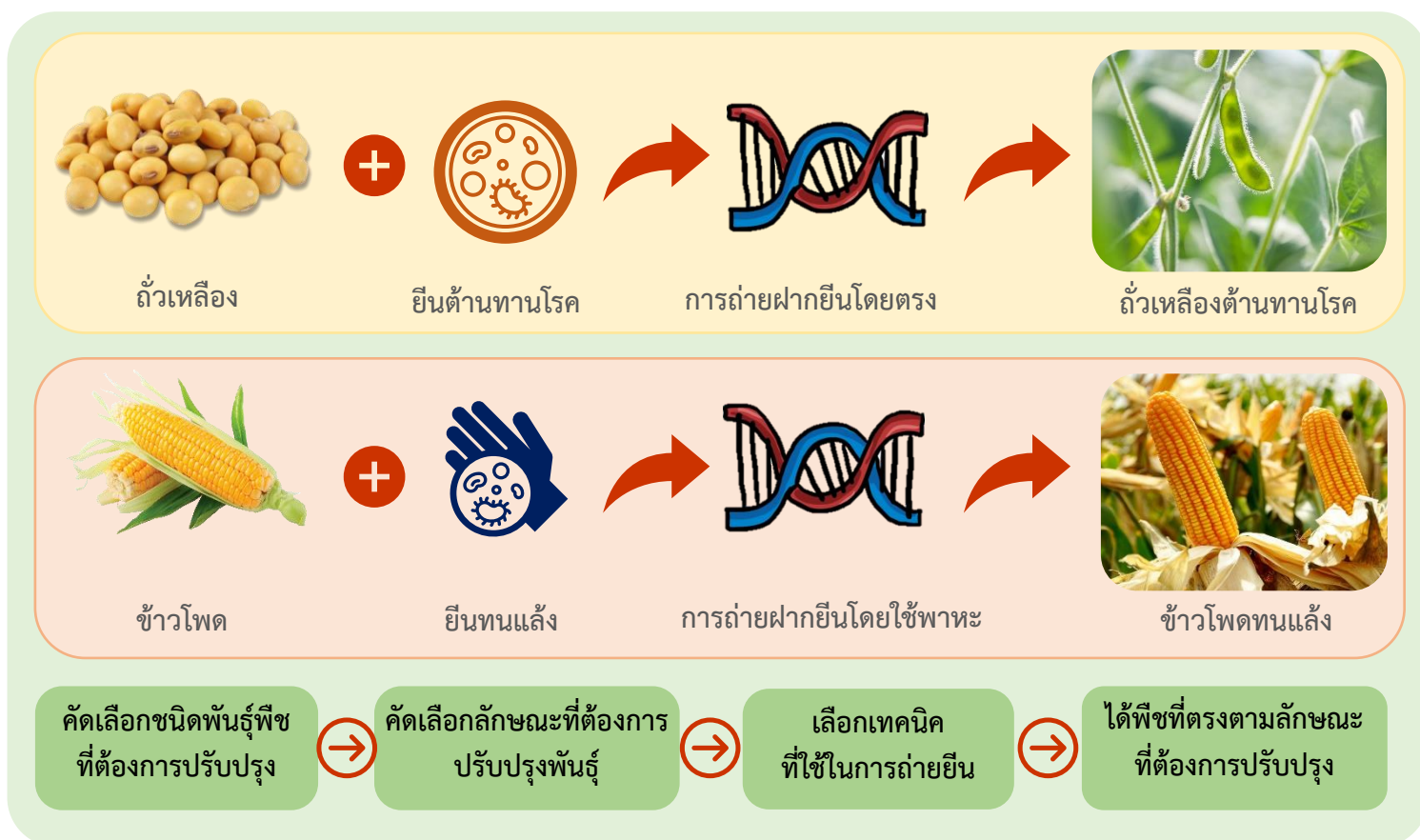
ควรเลือกแนวทางการดำเนินงาน และประเภทของหนังสือรับรองให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์การนำไปใช้ประโยชน์

- คุณสมบัติของผู้ขอใบรับรองสุขอนามัยคือ ต้องจดทะเบียนเป็นผู้ส่งออกกับกรมวิชาการเกษตร และต้องได้รับการรับรองมาตรฐานระบบการจัดการคุณภาพทางการปฏิบัติการเกษตรที่ดีสำหรับพืช (Good Agriculture Practices หรือ GAP) หรือมาตรฐานที่กรมวิชาการเกษตรยอมรับ
- มาตรการกักกันแมลงศัตรูพืชและต้นกล้ามะละกอที่นำเข้าจากไทยเพื่อส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น มีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2565 เป็นต้นไป ผู้ฝ่าฝืนมีโทษปรับไม่เกิน 500,000 บาท (สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ ประจำกรุงโตเกียวบันทึกข้อความ กษ .0211.7/131 ลงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2565 (



2. หลักการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม

หากต้องการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมนั้น ต้องเข้าใจหลักในการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมก่อนซึ่งเริ่มจากการถ่ายฝากยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเข้าไปในพืช เพื่อให้พืชมีลักษณะใหม่เกิดขึ้น โดยยีนที่ถ่ายฝากเข้าไปจะมีส่วนของยีนเครื่องหมาย (Marker gene) แล้วจะแสดงออกโดยการถอดรหัสเป็นสายอาร์เอ็นเอ (RNA) และส่วนใหญ่จะมีการแปลรหัสเป็นโปรตีน ซึ่งอาจทำให้เกิดลักษณะ (Phenotypes) ใหม่โดยตรง หรืออาจเป็นเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ซึ่งหลักในการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมดังแสดงใน **ภาพที่ 4.1** ดังนั้นการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมจึงทำได้โดยการตรวจหายีน หรือดีเอ็นเอ (DNA) ที่ถ่ายฝากเข้าไปในพืช หรือการตรวจหาโปรตีนชนิดใหม่ที่เกิดจากการแปลรหัสจากยีนที่พืชได้รับ หรือถ้าโปรตีนนั้นเป็นเอนไซม์อาจตรวจหาสารที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้น แต่อย่างไรก็ตามการเลือกวิธีการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมวิธีใดวิธีหนึ่งนั้น ต้องคำนึงถึงความจำเพาะของวิธีการ ความไว ความยากง่าย ความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติ การทำซ้ำต้องได้ผลคงที่ และค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบต้องไม่แพงจนเกินไป ในกรณีการทดสอบในตัวอย่างที่มีปริมาณมาก (สุรินทร์, 2548) โดยทั่วไปนิยมตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมโดยให้หลักการตรวจหาโปรตีน และตรวจหาดีเอ็นเอ



ภาพที่ 5.1 แสดงหลักการในการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรม

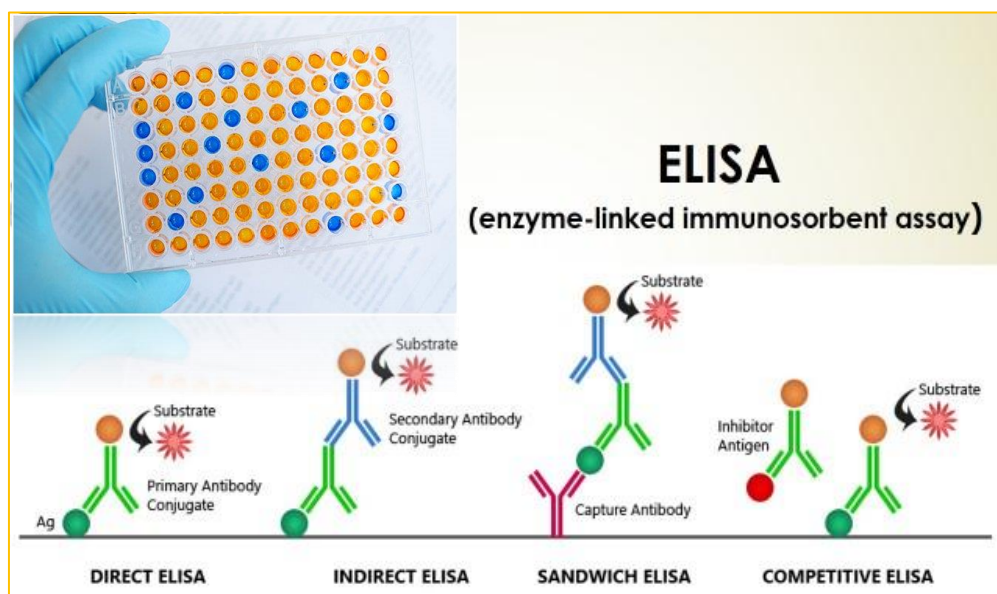
2.1 การตรวจหาโปรตีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรม

วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาโปรตีนซึ่งเป็นผลผลิตของยีนที่ถูกถ่ายฝากเข้าไปในพืชดัดแปลงพันธุกรรมคือ วิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ทำได้โดยการสกัดโปรตีน แล้วนำไปเกาะติดกับเพลทพลาสติก จากนั้นใส่แอนติบอดี (Antibody) ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนดังกล่าว ซึ่งบนแอนติบอดีจะมีเอนไซม์ชนิดหนึ่ง ๆ อยู่ด้วย เมื่อใส่สับสเตรท (Substrate) ของเอนไซม์ลงไปจะเกิดการทำปฏิกิริยาแล้วได้ผลผลิตที่มีสี ซึ่งแสดงถึงผลการตรวจสอบที่เป็นบวก คือตรวจพบโปรตีนจากพืชดัดแปลงพันธุกรรม (ภาพที่ 4.2) ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ครั้งละหลายๆ (สุรินทร์, 2548) แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ

- 1) แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อผลผลิตของยีนเครื่องหมาย (Marker gene) มีอย่างจำกัด ส่วนมากมีเพียงแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อยีน *EPSP synthase*
- 2) ตรวจสอบได้เฉพาะโปรตีนที่ยังไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปมากนัก เนื่องจากกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรต่าง ๆ ทำให้โปรตีนเสียสภาพจนทำให้ไม่สามารถตรวจสอบได้
- 3) โปรตีนที่จะทำการตรวจสอบมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ไม่เท่ากัน ในกรณีที่ตรวจในส่วนหนึ่งของเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของโปรตีนน้อยอาจทำให้ตรวจไม่พบ (ผลลบลง)

เลือกวิธีการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม

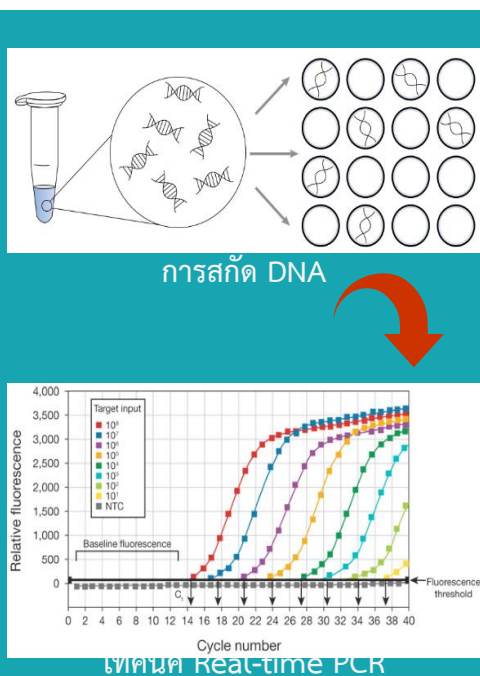
- ✓ มีความจำเพาะ
- ✓ ตรวจได้เร็ว
- ✓ ง่าย
- ✓ การทำซ้ำได้ผลคงที่
- ✓ ค่าใช้จ่ายถูก
- ✓ ทดสอบได้ปริมาณมาก



ภาพที่ 5.2 การตรวจหาโปรตีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbent assay ในรูปแบบต่าง ๆ (<https://www.biosciencenotes.com/elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay/>)

2.2 การตรวจหาดีเอ็นเอในพืชดัดแปลงพันธุกรรม

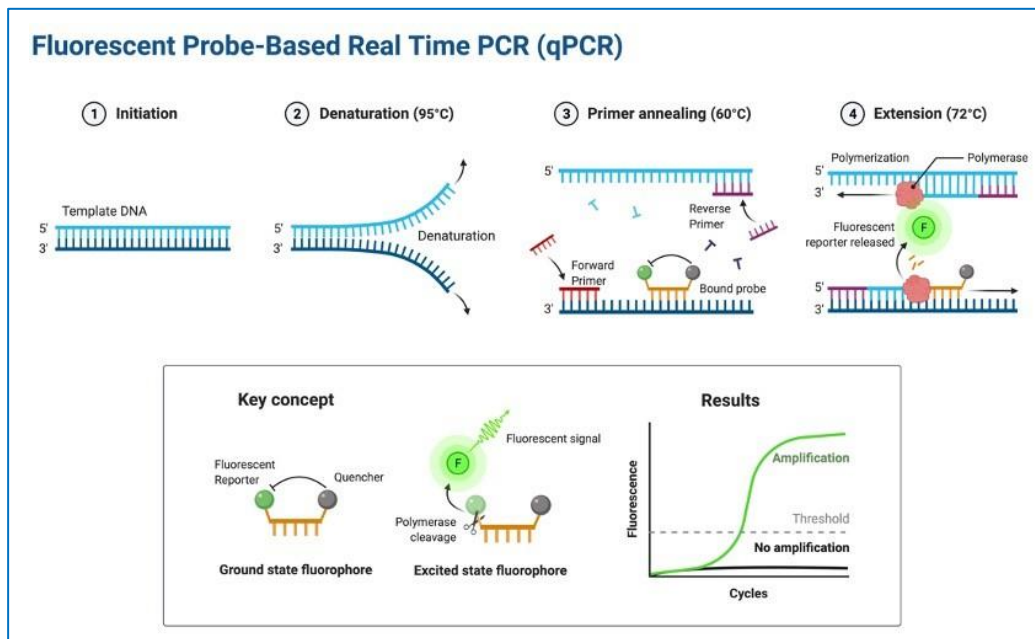
ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid; DNA) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความคงตัวมากกว่าโปรตีน และสามารถตรวจพบได้แทบจะทุกส่วนของพืช จึงนิยมใช้ในการตรวจหาชิ้นที่ถูกถ่ายฝากเข้าสู่พืช โดยอาจตรวจหาจากส่วนของโปรโมเตอร์ (Promoter) หรือเทอร์มิเนเตอร์ (Terminator) ของยีนเป้าหมาย ซึ่งห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์นิยมนำยีน *CaMV35S promoter* ที่ได้จากไวรัสพืช *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) และยีน *Nos terminator* ที่ได้จากแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* เนื่องจากเป็นยีนที่นิยมตัดต่อในพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Bak and Emerson, 2019) จากนั้นเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่เพริเมอร์เลส (Polymerase chain reaction; PCR) แล้วนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) และย้อมสีดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นการตรวจวัดดีเอ็นเอในเชิงคุณภาพ (สุรินทร์, 2548)



ปัจจุบันสามารถตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Real-time PCR (RT-PCR) ซึ่งเป็นการตรวจวัดทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ กลไกการทำงานของ RT-PCR จะมีการใช้ฟลูออเรสเซนซ์โพรบ (TaqMan probe) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ โดยที่ปลาย 5' ติดฉลาก Reporter dye ทำหน้าที่เปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ส่วนปลาย 3' ติดฉลาก Quencher dye ทำหน้าที่ควบคุมไม่ให้ Reporter dye เปล่งแสง ดังนั้นในช่วงเริ่มต้นที่ TaqMan probe เกาะอยู่กับ PCR product จะยังไม่มี การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เนื่องจาก Reporter dye ถูก Quencher ควบคุม อยู่ แต่เมื่อเกิดการกระบวนกร Annealing ทำให้ดีเอ็นเอแยกจากสายคู่ เป็นสายเดี่ยว ขณะเดียวกับที่ Taq polymerase ไปตัดสายของ TaqMan probe ขาด ทำให้ Reporter dye และ Quencher หลุดออกจากกัน จึงเกิดการเปล่งแสงขึ้น ซึ่งสัญญาณของฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจได้จะมีปริมาณสูงขึ้นตามปริมาณของ PCR product ที่มากขึ้น ซึ่งหลักในการทำงานดัง แสดงในภาพที่ 4.3

การตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการยอมรับตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 นิยมตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR อาจตรวจจำแนกแต่ละยีนในแต่ละปฏิกิริยา (Simplex real-time PCR) หรือตรวจจำแนกยีนหลายชนิดในปฏิกิริยาเดียว (Multiplex real-time PCR) ซึ่งมีการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย เช่น ในถั่วเหลืองดัดแปลง พันธุกรรม (ฐิติรัตน์ และคณะ, 2565; Koppel et al., 2012; Grohmann et al., 2017) มะละกอ ดัดแปลงพันธุกรรม (ปิยนุช และคณะ 2563) ข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรม (Huang and Pan, 2004; ปิยนุช และคณะ 2561; ปิยนุช และคณะ, 2562) ข้าวดัดแปลงพันธุกรรม (Lu et al., 2016) ข้าวสาลีดัดแปลงพันธุกรรม (Pitaksaringkarn et al., 2021) หรือในผลิตภัณฑ์อาหารที่มี ส่วนประกอบของพืชดัดแปลงพันธุกรรมอื่น ๆ (Bahrdt et al., 2010; Eugster et al., 2014; Bak and Emerson, 2019) เป็นต้น





ภาพที่ 5.3 หลักการตรวจหาดีเอ็นเอในพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Real-time PCR
(<https://researchtweet.com/qpcr-real-time-polymerase-chain-reaction/>)

3. ขั้นตอนการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม

ขั้นตอนการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมนั้นเริ่มตั้งแต่การสุ่มตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ และนำไปตรวจสอบยืนยันดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพ

3.1 การสุ่มตัวอย่าง

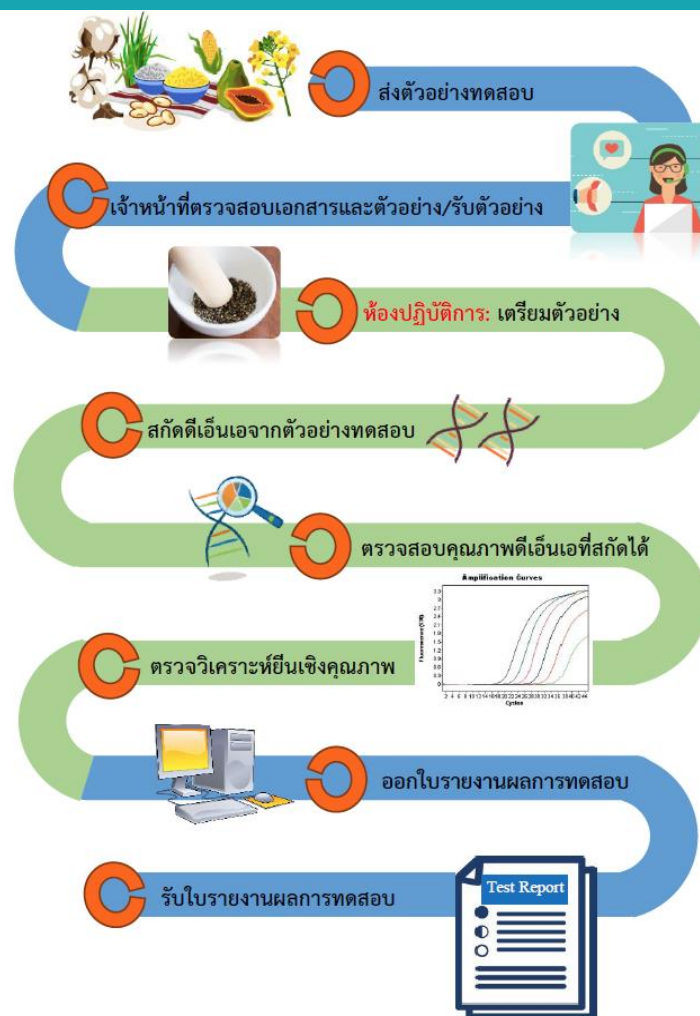
การสุ่มตัวอย่างที่มีแผนการสุ่มและการจัดการตัวอย่างที่ดี ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและสร้างความเชื่อมั่นในการตรวจวิเคราะห์การปะปนของสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม โดยวิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างสินค้าพืชอยู่ภายใต้การกำกับดูแลของเจ้าหน้าที่จากกรมวิชาการเกษตร หรือผู้ใดประสงค์ส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทดสอบ สามารถปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ตามมาตรฐานที่กำหนด (ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องการรับรองพืชหรือสินค้าพืชที่ได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรม พ.ศ. 2544 ลงวันที่ 21 มีนาคม พ.ศ. 2544) ทั้งนี้สามารถศึกษารายละเอียดการสุ่มตัวอย่างเพิ่มเติมได้จาก คู่มือการให้บริการตรวจสอบและออกใบรับรองคุณภาพสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก (2560) และการสุ่มตัวอย่างพืชเพื่อตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อน GMOs (2561) โดยกรมวิชาการเกษตร



มาตรฐานที่เกี่ยวข้องการสุ่มตัวอย่าง

- 1) สินค้าพืชลักษณะเป็นเมล็ดพันธุ์ (Seed) ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างตามมาตรฐานของ International Seed Testing Association (ISTA)
- 2) สินค้าพืชลักษณะเป็นเมล็ด (Grain) ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างตามมาตรฐานของ The Grain and Feed Trade Association (GAFTA) Sampling Rules No. 124 หรือ ISO 950:1979 Cereals - Sampling (as grain)
- 3) สินค้าพืชลักษณะเป็นผลิตภัณฑ์ (Product) คงรูปในแบบต่าง ๆ ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างตามมาตรฐานของ FAO/WHO Codex ซึ่งสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้นำมาปรับใช้เป็นมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมในการสุ่มตัวอย่าง มอก .456-2027
- 4) ตัวอย่างพืชสดจากแปลง หรือตัวอย่างภาคสนาม จะใช้หลักการสุ่มที่ดัดแปลงจากมาตรฐาน European Joint Enforcement Group on Deliberate Release of GMOs (EEP-DR)

โดยทั่วไปการเริ่มต้นในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม จนกระทั่งได้รับใบรายงานผลทดสอบ มีแนวทางในการดำเนินงานดังแสดงในภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 แสดงขั้นตอนในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม



3.2 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่สำคัญสำหรับการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อให้ได้ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวแทนของพืชหรือผลิตภัณฑ์พืชที่ส่งมาทดสอบจากผู้ให้บริการ นอกจากนี้ยังมีการเก็บตัวอย่างอ้างอิงและตัวอย่างสำรองเพื่อช่วยประกันความเสี่ยงในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ หากผลการทดสอบไม่เป็นไปตามที่กำหนด ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างดังนี้ (กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม, 2563a)



1) ตรวจสอบความถูกต้องของตัวอย่าง

เจ้าหน้าที่ตรวจสอบความถูกต้องของตัวอย่าง เช่น จำนวนตัวอย่าง น้ำหนัก ประเภท และสภาพของบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น ให้ตรงตามรายละเอียด กรณีพบว่าไม่เป็นไปตามที่กำหนดให้บันทึกรายละเอียดความผิดปกติ และแจ้งผู้รับบริการเพื่อแก้ไขหรือส่งตัวอย่างให้ถูกต้อง จากนั้นจึงเข้าสู่การเตรียมตัวอย่างต่อไป

2) การเก็บรักษาตัวอย่างอ้างอิง และตัวอย่างสำรอง

เมื่อรับตัวอย่างเสร็จสิ้น ทำการเก็บรักษาตัวอย่างอ้างอิงโดยแบ่งเก็บจากตัวอย่างทดสอบที่ผู้รับบริการส่งตรวจวิเคราะห์ และเก็บรักษาตัวอย่างสำรองโดยแบ่งเก็บจากตัวอย่างทดสอบที่ผ่านกระบวนการเตรียมให้ตัวอย่างมีความละเอียดและเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ซึ่งการเก็บรักษาตัวอย่างดังกล่าวเพื่อเป็นการประกันความเสี่ยงในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์หากผลการทดสอบไม่เป็นไปตามที่กำหนด

3) การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

หลักในการเตรียมตัวอย่างคือการผสมตัวอย่างทั้งหมดเข้าด้วยกัน และทำการบดตัวอย่างให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวแทนที่เหมาะสมสำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป ด้วยการสับพืชดัดแปลงพันธุกรรมเป็นการตรวจวิเคราะห์ในระดับยีน ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังในการเตรียมตัวอย่างไม่ให้เกิดการผสมข้าม เพื่อป้องกันการปนเปื้อนในตัวอย่างแต่ละชนิดที่ทำการตรวจวิเคราะห์ที่อาจส่งผลกระทบต่อขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกัน จึงมีวิธีการเตรียมตัวอย่างตามความเหมาะสม ซึ่งมีขั้นตอนการจัดการตัวอย่างโดยสังเขปดังแสดงในตารางที่ 4.1

4) การทำความสะอาดอุปกรณ์

เมื่อใช้งานอุปกรณ์เสร็จแล้ว ต้องล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ในการบดตัวอย่างให้สะอาด เช่น ล้างด้วยสารละลายสำหรับทำความสะอาด แล้วล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า



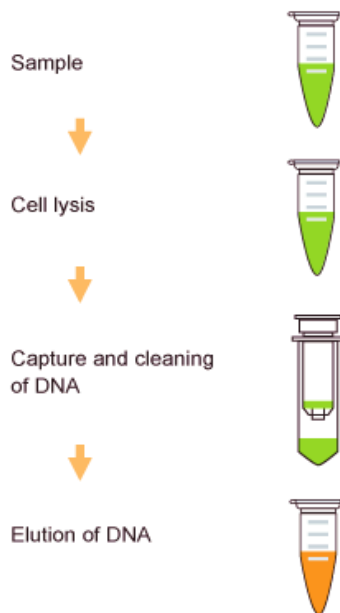
ตารางที่ 5.1 สรุปการเตรียมตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์

ประเภทการเตรียมตัวอย่าง	การเตรียมตัวอย่างแบบแห้ง	การเตรียมตัวอย่างแบบเปียก	การเตรียมตัวอย่างแบบของเหลว	การเตรียมตัวอย่างมะละกอ
ชนิดตัวอย่าง	เมล็ดพันธุ์ต่าง ๆ แบ่งชนิดต่างๆ เกรดข้าวโพด กากถั่วเหลือง และเส้นก๋วยเตี๋ยว เป็นต้น	ข้าวโพดฝักอ่อน ข้าวโพดฝักสด พริกสด ผลมะเขือเทศ เนื้อมะพร้าว และเมล็ดข้าวโพด บรรจุกระป๋อง เป็นต้น	นมถั่วเหลือง ซอสถั่วเหลือง น้ามะพร้าว นมข้าวโพด ซอสพริก ซีอิ๊วดำ และซอสมะเขือเทศ เป็นต้น	ใบมะละกอ และ ผลมะละกอ
วิธีการเตรียมตัวอย่างให้ละเอียด	ผสมตัวอย่างทั้งหมดเข้าด้วยกันให้ทั่ว และบดตัวอย่างด้วยโถปั่นแบบแห้ง	ใช้เฉพาะเนื้อตัวอย่างโดยผสมตัวอย่างทั้งหมดเข้าด้วยกันให้ทั่ว ผสมน้ำกลั่นเล็กน้อยเพื่อการปั่นมีประสิทธิภาพ และบดตัวอย่างด้วยโถปั่นแบบเปียก	ผสมตัวอย่างทั้งหมดเข้าด้วยกันให้ทั่ว และแบ่งตัวอย่างเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอได้โดยไม่ต้องทำการปั่นตัวอย่าง	นำตัวอย่างมะละกอใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีลูกเหล็ก (Steel ball) บรรจุอยู่ในหลอด แล้วนำมาบดตัวอย่างด้วยเครื่องบดเซลล์
การจัดการตัวอย่างที่มีลักษณะพิเศษ	1) ตัวอย่างที่มีการเคลือบสารเคมีหรือสารที่เป็นพอลิเมอร์ กำจัดสารดังกล่าวออกตามความเหมาะสม เช่น ล้างพอลิเมอร์ที่เคลือบเมล็ดออกด้วยการแช่ 10% Clorox เป็นเวลา 30 นาที แล้วตามด้วยการแช่ 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำเปล่าที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และผึ่งให้แห้ง	1) ตัวอย่างที่มีสารยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำจัดสาร เช่น Phenolic compound หรือ Tannin ในถั่วเขียวเปลือกดำ โดยการนำเมล็ดแช่ในน้ำเปล่า 2-3 ชั่วโมง จากนั้นล่อนให้เปลือกของเมล็ดหลุดออกแล้วนำไปปั่นด้วยโถปั่นเปียก 2) ตัวอย่างที่มีเปลือก ในตัวอย่างที่มีเปลือกแข็ง ให้ทำการเอาเปลือกออกก่อน ใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อ หากเนื้อมีความแข็งให้หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปปั่นด้วยโถปั่นเปียก	1) ผลิตภัณฑ์ที่เหลวและมีการกระจายตัว ผสมและเทตัวอย่าง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ 2) ผลิตภัณฑ์ที่หนืดและการกระจายตัวไม่ทั่วถึง ผสมตัวอย่างกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5 (ตัวอย่าง:น้ำกลั่น) เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ	1) ใบมะละกอ ในกรณีที่มีหนึ่งตัวอย่างทดสอบมีใบมะละกอตั้งแต่ 2 ใบ ขึ้นไป ให้เก็บตัวอย่างจากมะละกอทุกใบ เพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่าง แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียด 2) ผลมะละกอ หั่นผลมะละกอออกให้เห็นเนื้อด้านใน แล้วทำการขูดเนื้อมะละกอด้านในของผล ในกรณีที่หนึ่งตัวอย่างที่ทำการทดสอบมีมะละกอตั้งแต่ 2 ผล ขึ้นไป ให้ขูดเนื้อมะละกอจากทุกผลรวมกัน
ปริมาณตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์	0.2 - 0.3 กรัม/หลอด	0.2 - 0.3 กรัม/หลอด	1) ตัวอย่างเหลว 25 มิลลิลิตร/หลอด 2) ตัวอย่างหนืด 30 มิลลิลิตร/หลอด (ตัวอย่าง: น้ำกลั่น = 5:25 มล.)	0.2 - 0.3 กรัม/หลอด



3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอนั้นเป็นขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นตอนหนึ่ง เนื่องจากดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่สกัดได้ จะถูกนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับใช้ในการตรวจสอบว่ามีการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมหรือไม่ ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ๆ (ไบโอเอนทิสท์, มปป.) คือ



1) ทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) เป็นการทำให้ผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายหรือแยกออกมา เพื่อให้สารพันธุกรรมหลุดออกมาจากเซลล์ ซึ่งสามารถทำให้เซลล์แตกได้หลายวิธี เช่น การใช้สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอ การแช่แข็งสลับละลาย หรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เป็นต้น

2) การกำจัดสารโมเลกุลใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน เพื่อเป็นการกำจัดสารยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ และได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ เช่น การใช้สารละลาย Protease-K สำหรับย่อยส่วนประกอบโปรตีน การใช้สารละลาย EDTA ในการยับยั้งการทำงานของ DNAase หรือการใช้สาร Beta-mercaptoethanol ในการทำลาย RNAases เป็นต้น

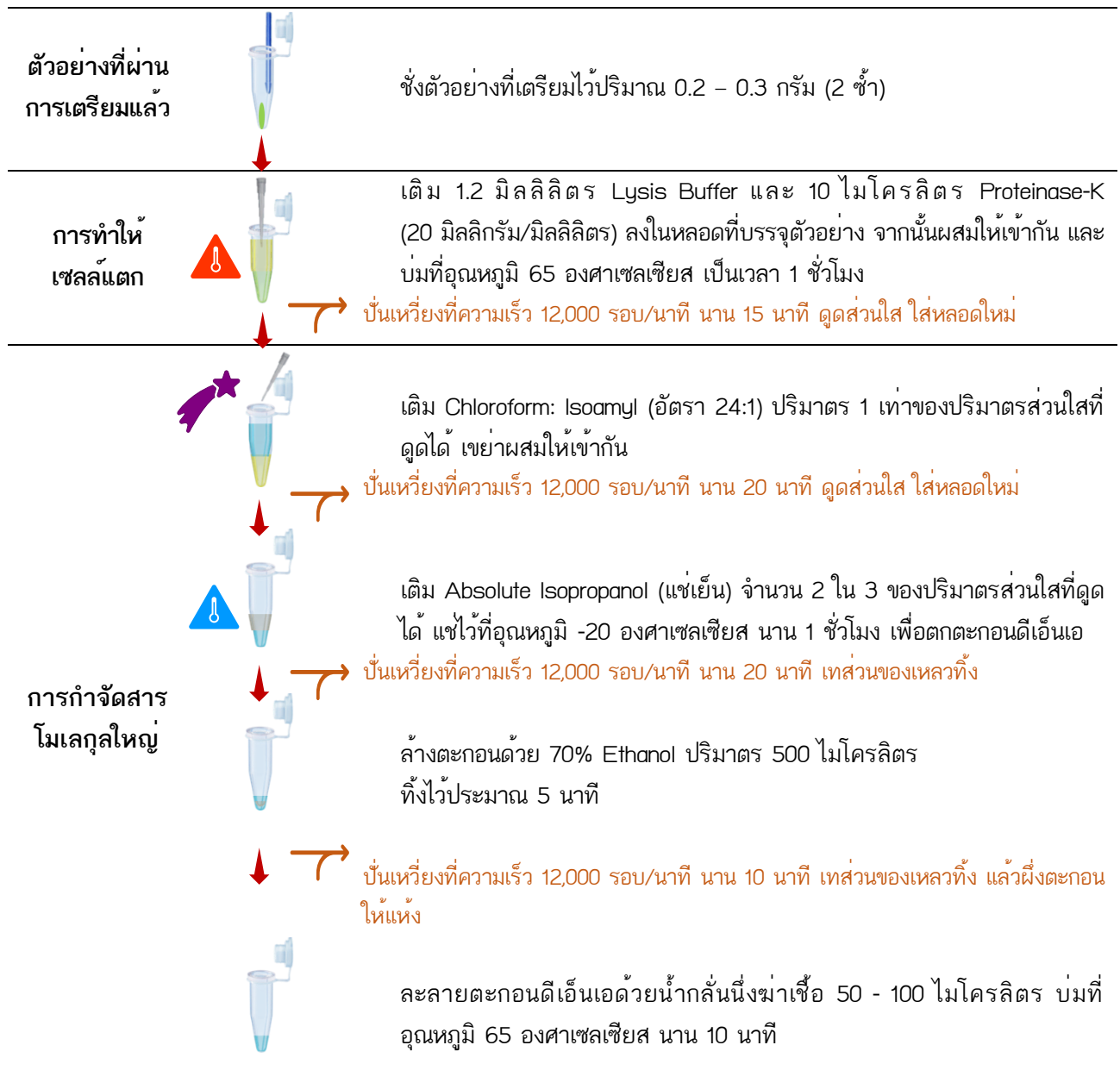
3) การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ เป็นการช่วยเพิ่มการดูดซับกรดนิวคลีอิก และทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น



อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอนั้นมีหลายวิธี แต่ในที่นี้ยกตัวอย่างการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์พืช สำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี Lysis buffer และการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย Wizard™ Minicolumn (ISO21571, 2005; Rogers and Bendich, 1985; ขนิษฐา และคณะ, 2548)

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Lysis buffer

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Lysis buffer เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีแป้งหรือโปรตีนเป็นองค์ประกอบปริมาณมาก เช่น แป้งข้าวโพด แป้งข้าว แป้งมันสำปะหลัง น้ำมันหอย ซอสถั่วเหลือง และผลิตภัณฑ์เส้นจากแป้งชนิดต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้



การสกัดดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Wizard™ Minicolumn

การสกัดดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Wizard™ Minicolumn เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีแป้งหรือโปรตีนเป็นองค์ประกอบปริมาณน้อย เช่น ข้าวโพดกระป๋อง ใบและต้นสดของพืชทุกชนิด และ เมล็ดพันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่าง และขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก มีรายละเอียดเช่นเดียวกับการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Lysis buffer ซึ่งรายละเอียดอื่น ๆ ที่แตกต่างกันมีขั้นตอนดังนี้

การกำจัดสารโมเลกุลใหญ่		เติม Chloroform: Isoamyl (อัตรา 24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนของ DNA ที่ดูดได้ เขย่าผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใส ใส่หลอดใหม่ (ทำซ้ำเพิ่มอีกรอบจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Lysis buffer)
การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์	 	เติม Miniprep DNA Purification Resin ลงในสารละลายดีเอ็นเอส่วนใสที่ดูดได้ ในอัตราส่วนปริมาตร 1:1 ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ใส่ Minicolumn เข้าที่ด้านปลายของ Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร (ดึง Plunger ออกจากตัว Syringe ก่อน) จากนั้นประกอบเข้ากับชุดเครื่องดูดสารละลาย (Vacuum pump) เปิดเครื่องเพื่อดูดสารละลาย รอจนสารละลายไหลออกจนหมด
		เติม 80% Isopropanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เปิดเครื่องดูดสารละลายหรือถ้าสารละลายไม่ไหลให้ใช้ Plunger ช่วยดันสายละลายที่อยู่ใน Syringe
		ย้าย Minicolumn โดยนำไปวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 2-3 นาที เพื่อกำจัด Isopropanol ที่ตกค้าง
		ย้าย Minicolumn โดยนำไปวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (65 °C) ลงใน Minicolumn ปริมาตร 50 – 10 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อให้ได้สารละลายดีเอ็นเอ
การตรวจวัดคุณภาพดีเอ็นเอ		ตรวจวัดคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A260/280 นาโนเมตร ระหว่างรอทดสอบ สามารถเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 8 °C

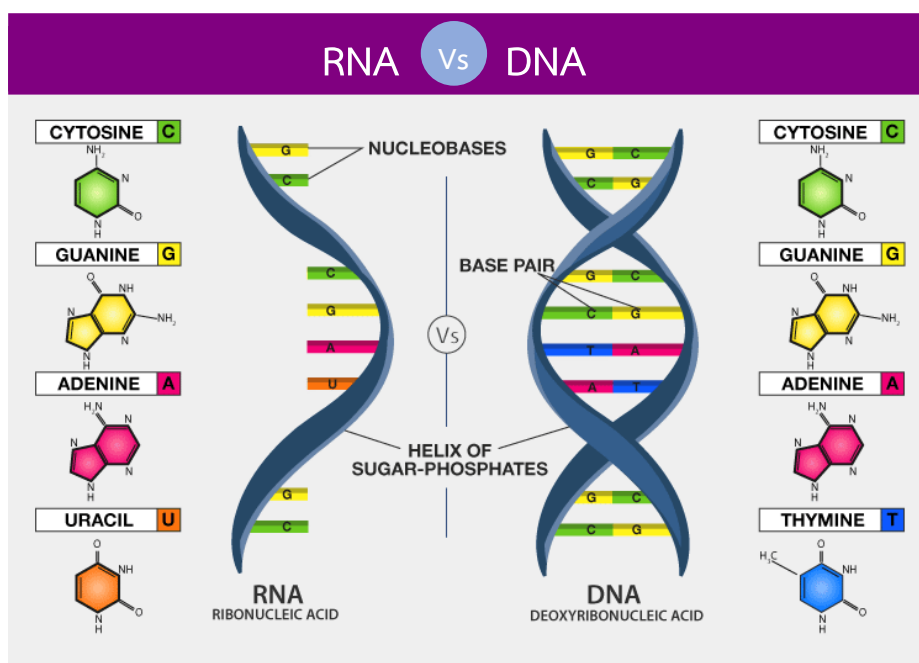
3.4 การวัดและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

โดยทั่วไปเราสามารถตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ 2 วิธี คือ การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และการทดสอบการปนเปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการจะเลือกวิธีการใดนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะการนำไปงาน หรือวัตถุประสงค์การนำผลการตรวจสอบไปใช้ประโยชน์ ซึ่งแต่ละวิธีมีขั้นตอน หรือเกณฑ์การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอดังนี้

4.4.1 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

กรดนิวคลีอิกแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ 1) ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid; DNA) ซึ่งประกอบด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 เส้น พันกันเป็นเกลียวคู่ และ 2) อาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid; RNA) ซึ่งเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์เส้นเดียว โดยกรดนิวคลีอิกมีองค์ประกอบของสารไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) ได้แก่ ไพริมิดีน (Pyrimidine; เบส C, U, T) และเพียวรีน (Purine; เบส A, G) ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ซึ่งไนโตรจีนัสเบสเป็นสารประกอบอะโรมาติก (Aromatic compound) สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 260 – 280 นาโนเมตรได้ดี โดยที่ช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร สามารถดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว หรืออาร์เอ็นเอ ได้ดีกว่าดีเอ็นเอเส้นคู่

จากคุณสมบัตินี้จึงสามารถวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิก โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอในสารละลายได้ (นวลณี, 2549)



ภาพที่ 5.5 แสดงความแตกต่างของกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ

(<https://cdn1.bjrus.com/wp-content/uploads/2017/11/Difference-Between-DNA-and-RNA.png>)

จุดเด่นของวิธี

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง เหมาะสำหรับการวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

ในตัวอย่างงานบริการทดสอบที่มีปริมาณมาก หรืองานที่อ้างอิงวิธีสกัดดีเอ็นเอตามมาตรฐาน ซึ่งมีการทดสอบความใช้ได้ของวิธี หรือมีผลการทดสอบแล้วว่าเป็นวิธีการซึ่งสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ดี

เกณฑ์การประเมินคุณภาพดีเอ็นเอ

➤ ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณเพียงพอต่อการทดสอบ เช่น มีความเข้มข้น 20 - 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แต่ในตัวอย่างที่ผ่านการแปรรูปซึ่งดีเอ็นเอถูกทำลายไปแล้ว อาจมีความเข้มข้นน้อยกว่าแต่ยังสามารถใช้ทดสอบได้

➤ พิจารณาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จากค่าการดูดกลืนแสงที่ $A_{260}/A_{280} \geq 1.7$ ซึ่งมักจะพบในตัวอย่างพืชคงรูปที่สามารถสกัดได้ง่าย เช่น ใบมะละกอสด ข้าวโพด พืชสด เป็นต้น

➤ พิจารณาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จากค่าการดูดกลืนแสงที่ $A_{260}/A_{280} \geq 1.2$ ซึ่งมักจะพบในตัวอย่างที่สกัดได้ยาก เช่น เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดธัญพืช ผลิตภัณฑ์แปรรูปต่าง ๆ เป็นต้น

ค่ามาตรฐานการประเมินของวิธี

วิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความสำคัญ เนื่องจากมีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้และส่งผลกระทบต่อผลลัพธ์สุดท้ายของการทำปฏิกิริยา RT-PCR (Houge et al., 2017)

โดยปกติอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} ควรอยู่ระหว่าง 1.8 - 2.0

ซึ่งหากมีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีการเจือปนของโปรตีน หรือสารประกอบฟีนอลบางส่วนจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และถ้า A_{260}/A_{280} มีค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่าอาจมีการเจือปนของอาร์เอ็นเอ (Fraga et al., 2014; Lucena-Aguilar et al., 2016)



UV-Vis Spectrophotometers



Multiskan GO UV/Vis microplate Spectrophotometer



NanoDrop Spectrophotometer

4.4.2 การทดสอบการปนื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้

ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) เนื่องจากในระหว่างการสกัดดีเอ็นเออาจมีสารยับยั้งปฏิกิริยา (PCR inhibitors) ต่างๆ เกิดขึ้น เช่น สารประกอบโพลีแซ็กคาไรด์จากพืช คอลลาเจนจากเนื้อเยื่อ โปรตีนและแคลเซียมไอออนจากนม ดีเอ็นเอไม่มีคุณภาพ หรือมีสารตกค้างที่เกิดจากการสกัดดีเอ็นเอ เป็นต้น ซึ่งสารยับยั้งปฏิกิริยาเป็นอุปสรรคต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยจะไปรบกวนการทำงานของดีเอ็นเอ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) หรือยับยั้งการเข้าจับของสารแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) กับดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ทำให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์มีประสิทธิภาพลดลง (Bessetti, 2007) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมลดลงตามไปด้วย

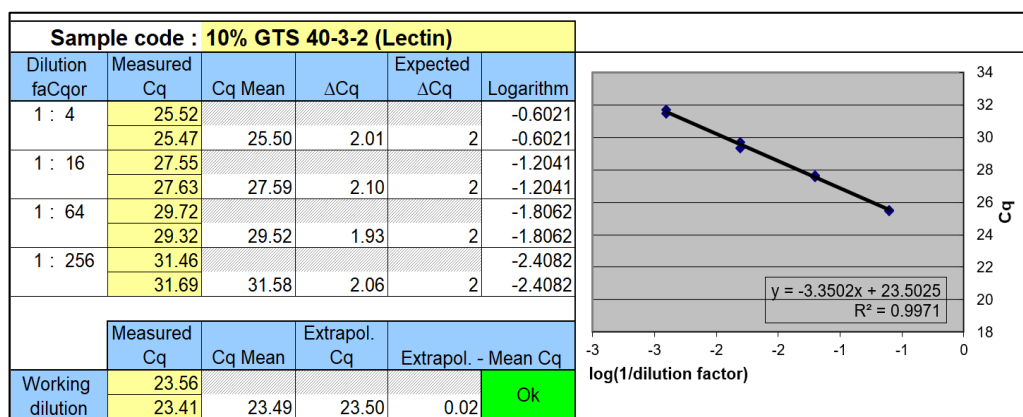
การทดสอบการปนื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยา โดยเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัสดุอ้างอิงรับรองที่ระดับการปะปน 10% ให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางวัสดุอ้างอิงรับรองด้วยน้ำบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:0, 1:4, 1:16, 1:64, และ 1:256 และทดสอบการตรวจยีนอ้างอิงพืช หรือยีนเป้าหมายที่ต้องการด้วยเทคนิค RT-PCT ด้วยวิธีปฏิกิริยาแบบ Simplex หรือ Multiplex real-time PCR บันทึกค่าสัญญาณเรืองแสงเริ่มต้น (Threshold cycle; C_t หรือ Crossing point; C_p) วิเคราะห์ผลค่าความต่างของค่า C_t (ΔC_t extrapolated) ค่าความชันของกราฟ

ค่าประสิทธิภาพ PCR (PCR efficiency) และค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Coefficient; R^2) โดยร้อยละค่า PCR efficiency คำนวณได้จากสมการที่ 1 (Hougs et al., 2017) ซึ่งการทดสอบการปนื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาดังแสดงในภาพที่ 4.6

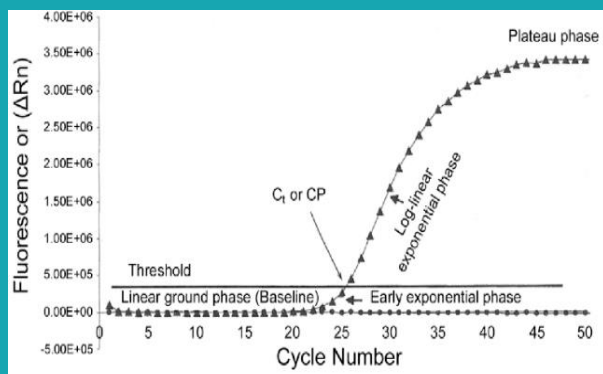
$$\text{PCR efficiency (\%)} = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

(สมการที่ 1)

Where: Slope = the slope of the standard curve, plotted with the y axis as C_t and the x axis as log



ภาพที่ 5.6 แสดงตัวอย่างผลทดสอบการปนื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาในการตรวจยีน *Lectin* ของวัสดุอ้างอิงรับรองถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรมสายพันธุ์ GTS 40-3-2 เมื่อสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Lysis buffer



Amplification curve of
real-time RT-PCR of log fluorescence



CFX Opus 96 Real-Time PCR System



The LightCycler®
480 Real-Time PCR System

จุดเด่นของวิธี

การทดสอบการปนเปื้อนของสารยับยั้งปฏิกิริยาในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ เหมาะสำหรับการตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอในการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการทดสอบใหม่ๆ การดัดแปลงวิธีการทดสอบ หรือการทดสอบตัวอย่างที่ไม่เคยสกัดดีเอ็นเอมาก่อน เพื่อสามารถพิสูจน์ได้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีคุณภาพ ไม่มีสารยับยั้งปฏิกิริยาที่จะส่งผลกระทบต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในการตรวจสอบพืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม

ค่ามาตรฐานการประเมินของวิธี

- ผลต่างของค่า ΔC_t extrapolated ที่ได้จากการคำนวณการตรวจจับสัญญาณของฟลูออเรสเซนซ์ (C_t) มีค่า $\Delta C_t \leq 2$
- ค่าความชันของกราฟที่ได้จากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า C_t และ ค่า $\log (1/\text{dilution factor})$ ควรมีความชันอยู่ระหว่าง $-3.1 \geq \text{Slope} \geq -3.6$
- ค่า PCR efficiency สำหรับการตรวจวัดด้วยวิธี Simplex Real-time PCR ควรอยู่ในช่วง %110 – 90 (Life technologies, 2012; Fraga et al., 2014)
- ค่า PCR efficiency สำหรับการตรวจวัดด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ควรอยู่ในช่วง 81 – 102% (Bak and Emerson, 2019; Bustin et al., 2009) โดยหากมีค่าเกินกว่า 120% เป็นการบ่งชี้ว่ามีสารยับยั้งเกิดขึ้นในปฏิกิริยา เช่น คุณภาพดีเอ็นเอไม่ดี หรือปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบสูงเกินไป ซึ่งสามารถแก้ไขได้ด้วยการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นให้เหมาะสม ในทางตรงข้ามหากค่า PCR efficiency ต่ำกว่า 80% อาจมีสาเหตุจากความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาไม่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นของไพรเมอร์ โพรบ แมกนีเซียม หรือ DNA polymerase เป็นต้น

3.5 การตรวจสอบยีนดัดแปลงพันธุกรรม เชิงคุณภาพ

การตรวจสอบยีนดัดแปลงพันธุกรรมโดยการตรวจดีเอ็นเอ เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบัน และเป็นวิธีการที่ห้องปฏิบัติการทดสอบในประเทศไทยและต่างประเทศให้การยอมรับ อีกทั้งยังได้รับการยอมรับจาก European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF) ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงของสหภาพยุโรปสำหรับอาหารดัดแปลงพันธุกรรมและอาหารสัตว์ ที่ได้รับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบตามข้อกำหนด ISO 17025 และผ่านการรับรองมาตรฐานการจัดทำวัสดุอ้างอิงรับรองมาตรฐานตามข้อกำหนด ISO 17043 (EURL GMFF, 2022) และยังเป็นแหล่งรวมข้อมูลการตรวจวิเคราะห์พืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อให้ห้องปฏิบัติการทดสอบทั่วโลกนำไปประยุกต์ทดสอบ และใช้เป็นวิธีการอ้างอิงอีกด้วย โดยทั่วไปพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะมีการแทรกชุดของยีน (Gene cassette) เข้าไปในพืชดั้งเดิม ซึ่งมีการแทรกยีนที่สำคัญแบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือ

1) **ยีนควบคุม (Regulatory gene)** ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (Promoter) และเทอร์มิเนเตอร์ (Terminator) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ช่วยควบคุมการเริ่มต้นและยุติการทำงานของยีนตามลำดับ โดยยีนที่นิยมใช้ในการดัดแปลงพืช ได้แก่ ยีน *CaMV35S promoter* และยีน *Nos terminator* เป็นต้น

2) **ยีนคัดเลือก (Selectable maker gene)** เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะอื่นๆ ช่วยในการคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนมากเป็นยีนที่มีคุณสมบัติในการต้านทานสารปฏิชีวนะ (Antibiotic resistant marker gene) เช่น ยีน *Neomycin phosphotransferase II (nptII)* ยีน *hygromycin phosphotransferase II (hptII)* เป็นต้น



Accreditation ISO 17043
Certificate N. 268-PT

Accreditation ISO 17025
Certificate N. 268-TEST



ข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่ระยะ V12
(ไม่ได้รับสารกำจัดวัชพืช)



ข้าวโพดต้านทานสารกำจัดวัชพืชที่ระยะ V12
(ได้รับสารกำจัดวัชพืช Atrazine)

(<https://cropwatch.unl.edu/2018/pre-emergence-herbicides-influence-critical-period-weed-removal-roundup-ready-corn>)

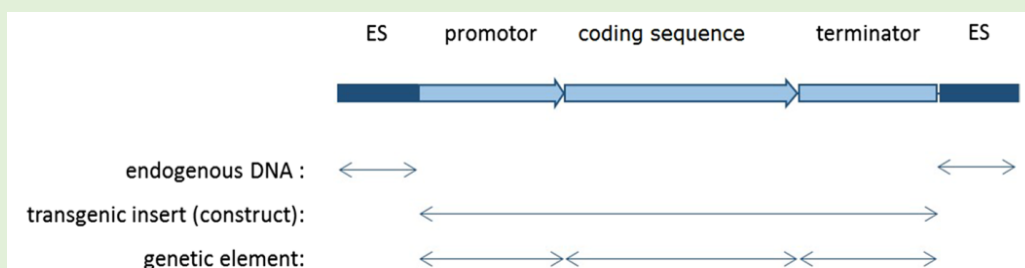
3) ยีนเป้าหมาย (Target gene) หรือยีนจำเพาะ (Event specific gene) เป็นยีนที่ต้องการศึกษาและทำให้พืชมีลักษณะเฉพาะตามที่ต้องการ เช่น ยีนต้านทานวัชพืช ยีนทนแล้ง ยีนต้านทานโรคหรือแมลงศัตรูพืช เป็นต้น (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550)

การตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพสามารถตรวจการแทรกของยีนได้ทั้ง 3 แบบ คือ ยีนควบคุม ยีนคัดเลือก และยีนเป้าหมาย ขึ้นอยู่กับลักษณะการนำผลทดสอบไปใช้ประโยชน์ อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการทดสอบที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 นิยมตรวจยีนคัดกรอง (Screening test) เพื่อตรวจหาชิ้นส่วนของโปรโมเตอร์ คือ *CaMV35S promoter (Cauliflower mosaic virus)* และเทอร์มิเนเตอร์ คือ *Nos terminator (Nopaline Synthase)* ซึ่งทั้งสองยีนนี้มีการรายงานว่าเป็นยีนนิยมตัดต่อในพืชดัดแปลงพันธุกรรมมากถึงร้อยละ 90

แต่พืชดัดแปลงพันธุกรรมบางชนิดไม่มีการตัดต่อยีนดังกล่าว จึงจำเป็นต้องตรวจยีนคัดกรองชนิดอื่นๆ เช่น ยีน *pat* (ต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนต) ยีน *cry1Ac* (ต้านทานหนอนผีเสื้อแมลง) ยีน *cp4 epsps* (ต้านทานสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท) เป็นต้น ซึ่งการตรวจยีนคัดกรองจะสามารถบ่งบอกได้ว่าพืชมีการดัดแปลงพันธุกรรม แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิดใดจนกว่าจะมีการตรวจหายีนเป้าหมายแบบจำเพาะ (Event specific gene) หรือมีรูปแบบในการตรวจยีนที่เฉพาะเจาะจงต่อไป โดยภาพที่ 4.7 เป็นตัวอย่างการแทรกยีนดัดแปลงพันธุกรรมอย่างง่าย ซึ่งดีเอ็นเอลูกผสมที่มีองค์ประกอบทางพันธุกรรม (Genetic element) ต่างๆ เช่น ส่วน Promoter, ส่วน Coding sequence และส่วนของ Terminator เป็นต้น จะรวมกันเป็นโครงสร้าง (Transgenic construct) ที่มีความจำเพาะในพืชดัดแปลงพันธุกรรมแต่ละชนิด และถูกแทรกเข้าไปในจีโนมโดยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นการรวมเข้ากับส่วนของยีนอ้างอิงพืช (Endogenous sequence, ES) ในชนิดนั้นๆ

จะเลือกตรวจยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรมแบบใด เพื่อให้ตรงกับวัตถุประสงค์การนำไปใช้ประโยชน์

- ยีนควบคุม (Regulatory gene)
- ยีนคัดเลือก (Selectable marker gene)
- ยีนจำเพาะ (Event specific gene)



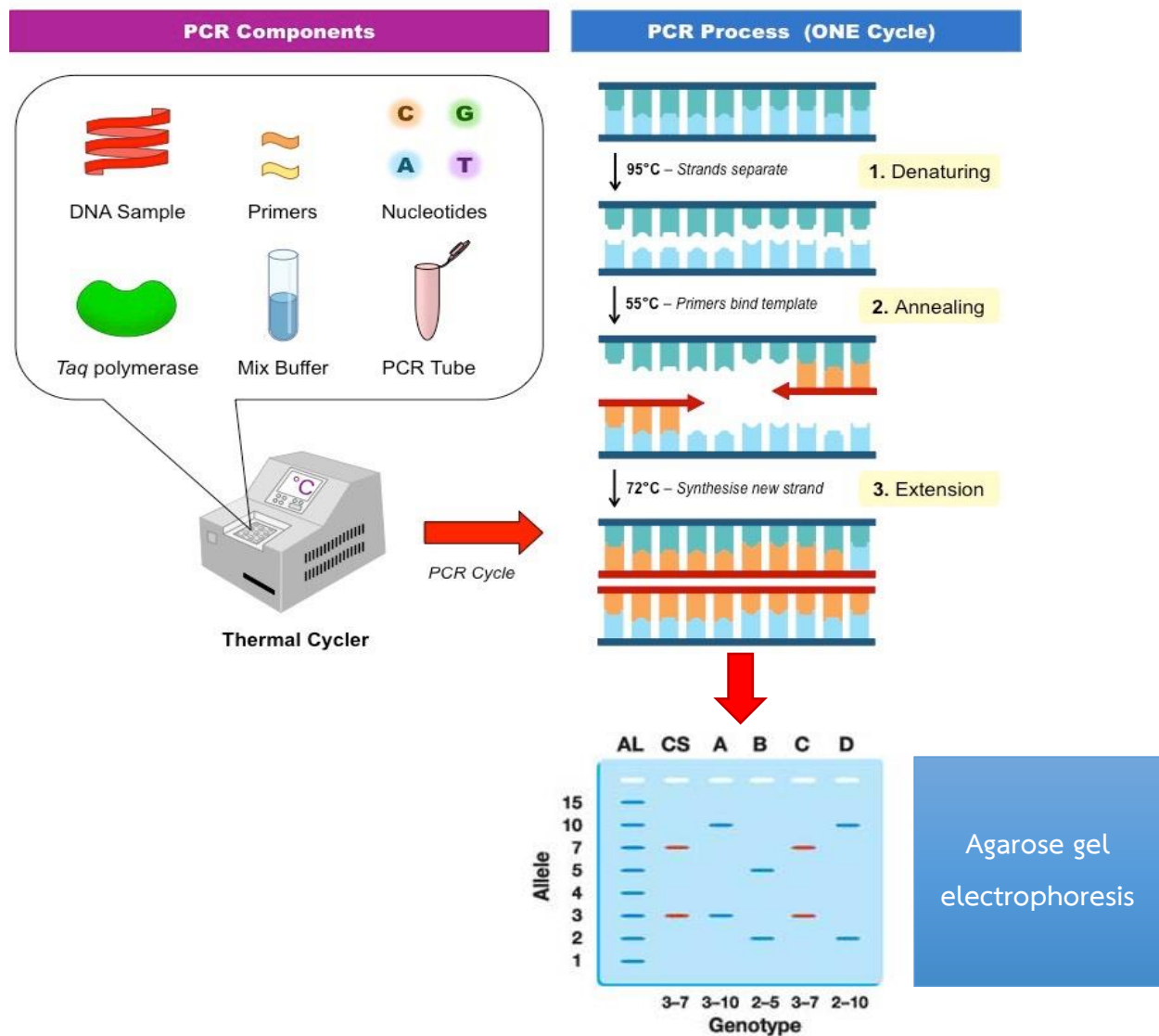
ภาพที่ 5.7 ตัวอย่างการแทรกยีนดัดแปลงพันธุกรรมอย่างง่าย (Adamse et al, 2021)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันเป็นวงจรหลายๆ รอบ (Cycle) เรียกว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

1) **Denaturing:** เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส

2) **Annealing:** เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้บริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม

3) **Extension:** เป็นขั้นตอนการสร้าง หรือสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ ไปในทิศทาง 5' ไป 3' โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 70 – 75 องศาเซลเซียส (นวลฉวี, 2549)



ภาพที่ 5.8 กระบวนการตรวจยืนยันเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และ agarose gel electrophoresis (ปรับปรุงจาก <https://blogs.baylor.edu/cili-cure-spring2017/2017/04/30/lab-13-posters-and-pcr-3/>)

4.5.1.2 วิธีการตรวจสอบยืนยันเชิงคุณภาพด้วยวิธี PCR

1) การเตรียมปฏิกิริยา PCR

- ทำการเตรียมสารเคมี และไพรเมอร์ ให้ได้ตามความเข้มข้นและปริมาณถูกต้องตรงตามชนิดยีนที่ตรวจ เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 4.2)
- ปิเปิด Master mix ที่เตรียมไว้ลงในหลอดพีซีอาร์ จากนั้นจึงปิเปิดตัวอย่างดีเอ็นเอ (DNA template) ลงในหลอดพีซีอาร์ ที่มี Master mix อยู่แล้ว จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ ไปหมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 0.5 - 1 นาที
- นำหลอดพีซีอาร์ เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม พร้อมกับเลือกอุณหภูมิและจำนวนรอบการทำงาน ให้ถูกต้องตรงตามชนิดยีนที่ตรวจ ตามสภาวะการทำงาน เช่น ตัวอย่างในตารางที่ 4.3 (ISO 21569:2005)

ตารางที่ 5.2 แสดงสารเคมี และไพรเมอร์สำหรับการตรวจจำแนกยีน *Lectin* และ *Papain* ด้วยเทคนิค PCR

รายการ	ความเข้มข้นสุดท้าย/ปฏิกิริยา (1X)
Sterile water	-
5X buffer GoTaq	1X
25 mM MgCl ₂	3.0 mM
10 mM dNTPs	0.4 mM
Forward primer (50 µM)	2.0 µM
Reverse primer (50 µM)	2.0 µM
Taq polymerase	-
DNA (10 - 50 ng/ µl)	50 - 250 ng
Total volume	25 µl

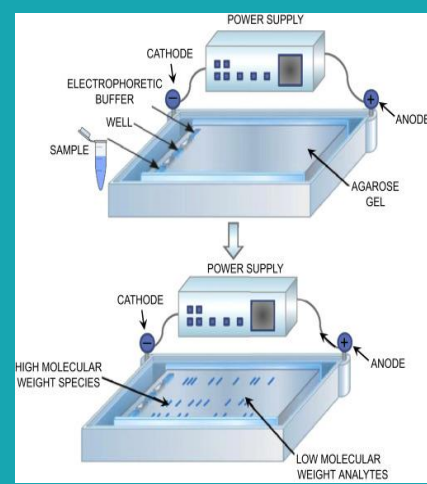
หมายเหตุ: *Lectin* เป็นยีนอ้างอิงของถั่วเหลือง และ *Papain* เป็นยีนอ้างอิงของมะละกอ

ตารางที่ 5.3 สภาวะการทำงานการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับการตรวจจำแนกยีน *Lectin* ด้วยเทคนิค PCR

ขั้นการทำปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	5 นาที	1
Amplification	Denaturation	94	20 วินาที
	Annealing	57	40 วินาที
	Extension	72	60 วินาที
Final Extension	72	7 นาที	1

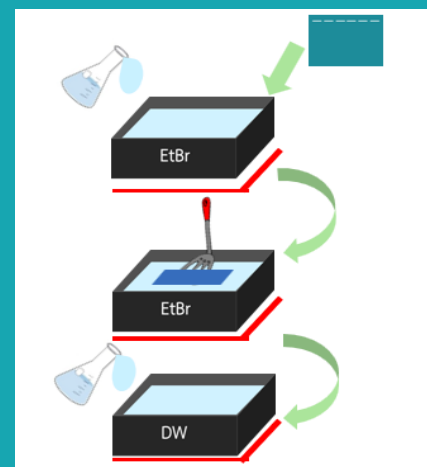
2 กระบวนการเจลอเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

- เตรียม 2% Agarose โดยชั่งผง Agarose ปริมาณ 3 กรัม และเติมสารละลาย 1 X TBE buffer ปริมาตรมิลลิลิตร ลงใน 150 ฟลasks แล้วนำไปอุ่นด้วยไมโครเวฟจนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- เทสารละลายเจลลงในถาดสำหรับเตรียมและรอให้เจลแข็งตัว ประมาณ นาที แล้ว 20 ค่อย ๆ ดึงหรือออกจากแผ่นเจล จากนั้นย้ายถาด เจลลงในกล่องที่มี 0.5X TBE buffer ท่วมสูงกว่าเล็กน้อย
- เตรียมการทำเจลอเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ปีเปตดูดดีเอ็นเอ มาตรฐานที่ทราบขนาด (DNA marker) ปริมาตร 2 - ไมโครลิตร 4 (แล้วแต่ขนาดของหลุมที่ใส่) ลงในหลุมที่กำหนดไว้สำหรับเป็น DNA ladder
- ใช้ปีเปตดูด PCR product ที่ผสมกับ Gel loading dye แล้ว ปริมาตรตัวอย่างละ 2 - 4 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่กำหนดไว้
- ตั้งความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ แล้วกดปุ่มเดินเครื่องเป็น เวลา 30 - 60 นาที (แถบดีเอ็นเอเคลื่อนที่ใกล้ขอบด้านล่างเจล)
- แช่เจลในถาดที่บรรจุสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์นาน 10 นาที แล้วย้ายเจลออกมาแช่ในถาดที่บรรจุน้ำกลั่น 10 นาที (การเตรียมอาจ แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดสารเรืองแสงที่เลือกใช้)
- เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ นำเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation System)
- ตัวอย่างยีน *Lectin* ในถั่วเหลือง มีขนาดดีเอ็นเอ 181 bp ดังแสดงในภาพที่ 4.9



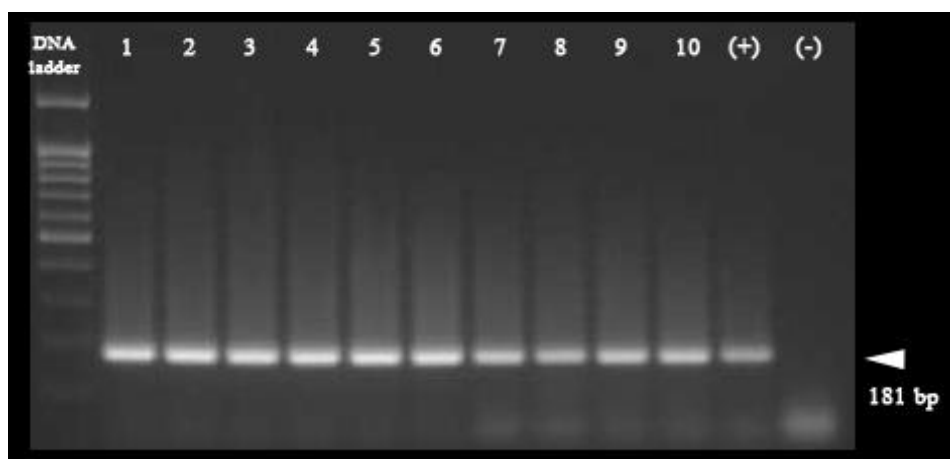
ตัวอย่างการทำ

Gel electrophoresis



ตัวอย่างการย้อมเจลด้วย

เอทธิเดียมโบรไมด์



ภาพที่ 5.9 แสดงการตรวจยีน *Lectin* จากเมล็ดถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 50 ng/μl บนเจลอะกาโรส ด้วยวิธี Gel electrophoresis: 1-10 = ตัวอย่าง, (+) = Positive control, (-) = Negative control

4.5.2.1 หลักการ

เทคนิค Real-time PCR (RT-PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะและสามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกๆ รอบของการเพิ่มจำนวนในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (Real-time detection) โดยใช้สายดีเอ็นเอไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ร่วมกับตัวตรวจจับที่มีการติดสีฟลูออเรสเซนต์ (Probe) ที่ถูกออกแบบเป็นสายสั้นๆ ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนเป้าหมาย (Target gene) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2563) ซึ่งค่าที่วัดได้จะแสดงเป็นค่า Threshold cycle (C_t) หรือ Crossing point (C_p) หลังจากกระบวนการ RT-PCR เสร็จสิ้นลง ค่า C_t ซึ่งเป็นสัญญาณเรืองแสงเริ่มต้นนั้นมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น ซึ่งตามทฤษฎีปริมาณของผลิตภัณฑ์ (PCR product) จะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในแต่ละรอบของปฏิกิริยาช่วง Exponential phase ซึ่งทำให้แสดงผลเป็นกราฟรูปตัว S (S-shape/ Sigmoid curve) (อินทัย, 2549; Life technologies, 2012) ในกรณีที่ต้องการคำนวณหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์สามารถทำได้โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Positive control) ที่ทราบปริมาณมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR ควบคู่ไปกับการตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องทราบปริมาณการปะปนในตัวอย่าง

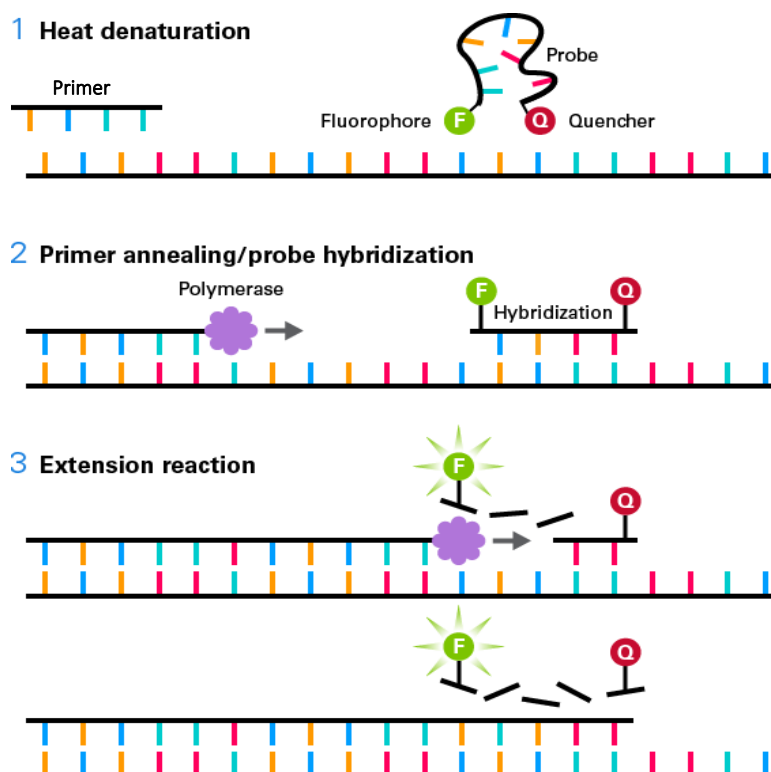
การวัดการเพิ่มจำนวนของ PCR product ในเทคนิค RT-PCR มีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดคือการใช้ Hydrolysis probe (TaqMan probe) ซึ่งเป็นชนิด Dual-labeled probe ซึ่งมีทั้งตัวระบุสัญญาณ (Quencher) และตัวที่มีสารเรืองแสง (Reporter Fluorophore) อยู่บน Probe เส้นเดียวกัน โดยมีหลักการทำงานดังนี้ (แสดงในภาพที่ 4.10)

1) Denaturing: เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส

2) Amplification: เป็นการรวมขั้นตอน Annealing และ Extension โดยลดอุณหภูมิลงมาประมาณ 55 – 65 องศาเซลเซียส ซึ่งโพรบ (Probe) และไพรเมอร์ (Primers) จะเข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ไปในทิศทาง 5' ไป 3' โดยเอนไซม์ DNA polymerase จะสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ไปจนชนโพรบ ซึ่งจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายบนเส้นเดียวกัน เมื่อมีการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย (Target gene sequence) เพิ่มขึ้น เอนไซม์ DNA polymerase จะย่อยสลายเส้นโพรบ ทำให้เกิดการแยกตัวของ Reporter และ Quencher สามารถตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ของ Reporter ได้ และบันทึกปริมาณแสงที่เกิดขึ้นไว้อย่างรอบ จวนครบรอบการทำปฏิกิริยา (40 - 45 รอบ)

ทั้งนี้สามารถตรวจสอบพีชดัดแปลงพันธุกรรมแบบการตรวจยืนยันเดียวต่อปฏิกิริยา (Simplex real-time PCR) และการตรวจยืนยันหลายชนิดในปฏิกิริยาเดียวกัน (Multiplex real-time PCR) โดยออกแบบฉลากสีโพรบที่แตกต่างกันเพื่อลดการซ้อนทับของช่วงคลื่นการดูดกลืนแสง ทำให้

สามารถแยกการตรวจจับยีนพีซีดีแปลงพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีฉลากสีโฟรและ Quencher ช่วงแสงที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดสอบ เช่น FAM/BHQ1, Hex/BHQ1, Cy5/BHQ3 และ TxRd/BHQ2 ซึ่งมีการปลดปล่อยสเปกตรัมสูงสุดเท่ากับ 515, 555, 603 และ 674 นาโนเมตร ตามลำดับ เป็นต้น



ภาพที่ 5.10 หลักการทำงานของเทคนิค RT-PCR โดยการใช้หลักการ Hydrolysis probe (<https://www.takarabio.com/learning-centers/real-time-pcr/overview/one-step-rt-qpcr-kits>)

4.5.2.2 วิธีการตรวจสอบยีนดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพด้วยวิธี Real-time PCR

2) การเตรียมปฏิกิริยา Real-time PCR (RT-PCR)

- ทำการเตรียมสารเคมี ไพรเมอร์ และโพรบ ตามความเข้มข้นและปริมาตรถูกต้องตรงตามชนิดยีนที่ตรวจ เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 4.4 (กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม, 2563b)

- ปิเปต Master mix ที่เตรียมไว้ลงในเพลท (Real-time PCR plate) จากนั้นจึงปิเปตตัวอย่างดีเอ็นเอ (DNA template) และวัสดุอ้างอิงมาตรฐานลงไปในกลุ่มตัวอย่างที่ทดสอบ แล้วปิดเพลทด้วย Sealing foil ให้แนบสนิท จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

- นำเพลทเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบ RT-PCR พร้อมกับเลือกอุณหภูมิและจำนวนรอบการทำงาน ให้ถูกต้องตรงตามชนิดยีนที่ตรวจ ตามสภาวะการทำงาน เช่น ตัวอย่างในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 5.4 แสดงสารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยการตรวจยีน *CaMV35S* promoter *Nos* terminator และ Endogenous gene ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

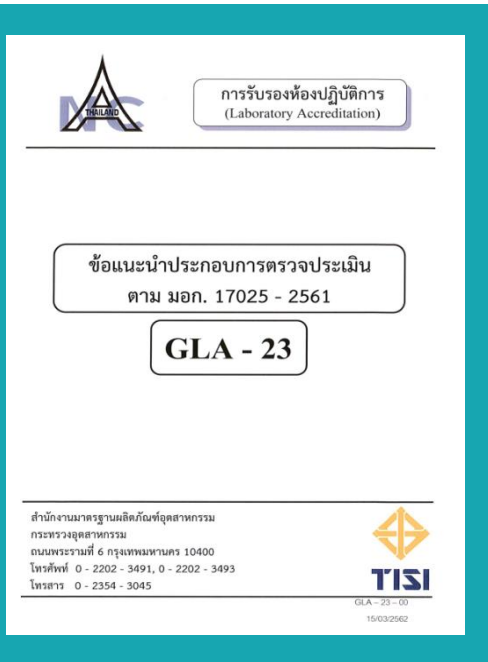
รายการ	ความเข้มข้นสุดท้าย/ปฏิกิริยา (1X)
Sterile water	-
2X master mix	1X
35S-F primer	0.1 μ M
35S-R primer	0.1 μ M
35S-Probe	0.1 μ M
Nos-F primer	1.0 μ M
Nos-R primer	1.0 μ M
Nos-Probe	0.2 μ M
Endogenous F primer	0.05 μ M
endogenous R primer	0.05 μ M
endogenous Probe	0.025 μ M
DNA (10 - 40 ng/ μ l)	50 - 200 ng
Total volume	20 μ l

หมายเหตุ: 1. Multiplex Real-time PCR โดยทดสอบยีน 3 ชนิด ได้แก่ *CaMV35S* promoter (โพรบติดฉลาก 5'FAM-3'BHQ), *Nos* terminator (โพรบติดฉลาก 5'HEX-3'BHQ) และ Endogenous gene (โพรบติดฉลาก 5'Cy5-3'BHQ) ในปฏิกิริยาเดียวกัน

2. ปริมาณสุดท้ายของดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Standards) และตัวอย่างดีเอ็นเอ (DNA Sample) เท่ากับ 100 นาโนกรัม ยกเว้นในกรณีพืชหรือสินค้าพืชที่สกัดได้มีความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำกว่า 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ตารางที่ 5.5 สภาวะการทำงานการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับการตรวจยีน *CaMV35S* promoter, *Nos* terminator และ Endogenous gene ด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	10 นาที	1
Denaturation	95	15 วินาที	40
Amplification	60	1 นาที	
Annealing and extension	60	1 นาที	
Cooling	40	-	1



3.6 การประกันคุณภาพในการตรวจสอบพืชตัดแปลงพันธุกรรม

การประกันคุณภาพผลการทดสอบ คือ แผนและการดำเนินการอย่างมีระบบ เพื่อควบคุมคุณภาพผลการทดสอบให้ได้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ และน่าเชื่อถือ ป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทดสอบทุกขั้นตอน โดยเผื่อระวังความเข้าใจของวิธีการทดสอบ เพื่อให้ผู้ใช้บริการมั่นใจในคุณภาพผลการทดสอบ และเชื่อมั่นว่าการบริการเป็นไปตามข้อกำหนดด้านคุณภาพ และตามมาตรฐานของห้องปฏิบัติการทดสอบ ISO/IEC17025

โดยการควบคุมคุณภาพเพื่อเผื่อระวังผลการทดสอบ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การควบคุมคุณภาพภายนอก (External Quality Control) และการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control; IQC) (วรวิทย์, 2564)

3.6.1 การควบคุมคุณภาพภายนอก (External Quality Control)

เป็นการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์จากภายนอก เพื่อให้เกิดความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ โดยการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ โดยการควบคุมคุณภาพภายนอกของห้องปฏิบัติการทดสอบ นิยมดำเนินการควบคุมคุณภาพ 2 รูปแบบดังนี้

1) การเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ (Proficiency Testing; PT)

เป็นการประเมินความสามารถของห้องปฏิบัติการในการทดสอบ/สอบเทียบภายใต้หลักเกณฑ์ที่กำหนดโดยใช้วิธีการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ โดยหน่วยงานที่เป็นผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (PT Provider) ทำการแจกจ่ายตัวอย่างให้กับห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโปรแกรมเพื่อวิเคราะห์และส่งผลการทดสอบกลับภายในระยะเวลาที่กำหนด จากนั้นผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญทำการประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการและส่งรายงานผลการทดสอบ โดยในการรายงานผลจะมีการบ่งชี้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโปรแกรมโดยรหัสเพื่อรักษาความลับของห้องปฏิบัติการ (สุดา, 2550)

2) การร่วมเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison, ILC)

เป็นการดำเนินงานและการประเมินผลการวัดบนเครื่องมือ/ตัวอย่างที่เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันในการทดสอบ/สอบเทียบ ตั้งแต่ 2 ห้องปฏิบัติการขึ้นไป ภายใต้สภาวะที่กำหนด (อุทุมพร, 2556)



3.6.2 การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control; IQC)

การควบคุมคุณภาพภายในเป็นการดำเนินการเพื่อเฝ้าระวังกระบวนการทดสอบและผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการให้มีความน่าเชื่อถือก่อนการรายงานผล โดยห้องปฏิบัติการที่ตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมทั่วไป มีการควบคุมคุณภาพภายในดังนี้ (กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรม, 2563c)

1) สารมาตรฐานที่ได้รับการรับรอง

(Certified Reference Materials; CRM)

มีการใช้วัสดุหรือสารอ้างอิงมาตรฐานที่ได้รับการรับรองที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ มีหนังสือรับรอง และสามารถสอบกลับ (Traceability) ไปยังมาตรฐานระหว่างประเทศ (International Standard, SI unit) ได้ การวิเคราะห์ CRM เพื่อเป็นการทวนสอบให้มั่นใจว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมต่าง ๆ มีความถูกต้อง และอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับในการใช้งาน (วรวิทย์, 2564)

2) การทดสอบตัวควบคุมแบบบวก และตัวควบคุมแบบลบ

- **ตัวควบคุมแบบบวก (Positive Control)** คือตัวอย่างที่ทราบผลการตรวจวิเคราะห์แน่ชัดว่ามีการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม (GMO target gene) หรือทราบแน่ชัดว่ามีอินทรีย์พีชเป้าหมายที่ต้องการตรวจ (Endogenous target gene) ตัวอย่างตัวควบคุมบวก เช่น ตัวอย่างวัสดุอ้างอิงรับรองที่มีการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม (CRM: GMO) ตัวอย่างที่ทราบผลว่ามีการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม (GMO material) หรือ ตัวอย่างอินทรีย์พีชที่เป็นบวก (Positive endogenous control) เป็นต้น โดยต้องตรวจพบยีนเป้าหมาย (Target gene) ในการตรวจสอบทุกครั้ง (Detected) ได้แก่ ยีนดัดแปลงพันธุกรรม และยีนอินทรีย์พีช โดยรายงานการตรวจพบที่ความไวในการตรวจขั้นต่ำ (Limited of detection: LOD) 0.1%

- **ตัวควบคุมแบบลบ (Negative Control)** คือตัวอย่างที่ทราบผลการตรวจวิเคราะห์แน่ชัดว่าไม่มีการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม ตัวอย่างตัวควบคุมลบ เช่น น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (Non template control) วัสดุอ้างอิงรับรองที่ไม่มีการปะปนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม (CRM: non-GMO) ตัวอย่างอินทรีย์พีชที่เป็นลบ (Negative endogenous control) และตัวอย่างควบคุมที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทน ตัวอย่างในการสกัดดีเอ็นเอ (Extraction blank control) เป็นต้น โดยต้องตรวจไม่พบยีนเป้าหมายในการตรวจสอบทุกครั้ง (Not-detected) เนื่องจากตัวควบคุมลบเหล่านี้ไม่มีดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายในการตรวจวิเคราะห์ หากมีการตรวจพบยีนเป้าหมายเมื่อใช้ตัวควบคุมลบดังกล่าวแสดงว่ามีการปนเปื้อนในกระบวนการทดสอบ จำเป็นต้องหาสาเหตุการปนเปื้อน แก้ไข และดำเนินการควบคุมงานทดสอบที่ไม่เป็นไปตามข้อกำหนด



AOCS Certified Reference Material Product: MON 810 Maize Lot: 1017-359-2344 Fax: +1-217-351-8091			
Certificate of Analysis AOCS 0809-B2, MON 810 Maize OECD Unique ID MON-810-7			
Certified Presence	Certified Value	Measurement Uncertainty	Test Method
MON 810 Maize present	> 996 g/kg	2 g/kg	event-specific real-time PCR
Description: This is the second batch of MON 810 Maize CRM prepared by AOCS for Monsanto Company. It was produced in June, 2020. The certified value is based on a sample purity of 100% (720 out of 720 seeds tested positive for MON 810). With 95% confidence, the true value is > 996 g/kg. The measurement uncertainty is the expanded uncertainty with a coverage factor of 1.65 and confidence level of 95%. This material is for limited purposes only: see "Intended Use" and "Terms and Conditions."			

3) การตรวจสอบสมรรถนะของเครื่องมือ

เพื่อให้มั่นใจว่าเครื่องมือที่มีผลกระทบต่อการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ และเพื่อยืนยันว่าเครื่องมือสามารถใช้งานได้ และมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยทั่วไปมีการตรวจสอบสมรรถนะของเครื่องมือดังนี้

- **การตรวจสอบประจำวัน (Daily check):** เป็นการตรวจสอบสถานะของเครื่องมือในทุกๆ วัน ก่อนมีการใช้งาน ว่าเครื่องมือดังกล่าวสามารถทำงานได้ตามปกติหรือไม่ โดยทั่วไปสามารถตรวจสอบได้จากสัญญาณไฟที่บ่งบอกสถานะการทำงานของเครื่อง ตัวเลขที่ระบุไว้ของเครื่อง เสียงที่เกิดจากการทำงานของเครื่อง เป็นต้น

- **การตรวจสอบระหว่างใช้งาน (Intermediate check):** เป็นการทวนสอบเครื่องมือในระหว่างการใช้งาน เพื่อให้มั่นใจว่าเครื่องมือสามารถใช้งานได้เป็นไปตามเกณฑ์กำหนด โดยวิธีการตรวจสอบเครื่องมือระหว่างใช้งานขึ้นอยู่กับลักษณะการทำงานของเครื่องมือชนิดนั้นๆ เช่น การทวนสอบ pH meter โดยใช้สารละลาย pH buffer การทวนสอบเครื่องชั่งน้ำหนักโดยใช้ตุ้มน้ำหนักมาตรฐาน การทวนสอบเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายมาตรฐานดีเอ็นเอ การทวนสอบเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) โดยใช้สารบ่งชี้ทางชีวภาพ (Bio-indicator) ดำเนินการทวนสอบเครื่อง Real-time PCR โดยใช้ตัวอย่างวัสดุอ้างอิงรับรอง เป็นต้น ซึ่งเครื่องมือแต่ละประเภทในงานทดสอบต่างๆ มีเกณฑ์ยอมรับการใช้งานที่แตกต่างกัน และความถี่ในการทดสอบขึ้นอยู่กับผลกระทบต่องานทดสอบและระดับความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้น เช่น การทวนสอบทุกๆ 3 เดือน หรือ 6 เดือน เป็นต้น

- **การสอบเทียบ (Calibration):** เป็นการเปรียบเทียบค่าการวัดของเครื่องมือที่ใช้งานกับค่ามาตรฐาน เพื่อให้แน่ใจว่าเครื่องมือที่ใช้งานมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับและเชื่อถือได้ โดยคัดเลือกหน่วยบริการสอบเทียบเครื่องมือจากหน่วยสอบเทียบที่ได้รับการรับรองความสามารถตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025 ในกรณีที่ไม่มีหน่วยสอบเทียบที่ได้รับการรับรอง ให้ใช้บริการกับหน่วยสอบเทียบที่สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ (สมป.) ยอมรับ หรือใช้บริการจากหน่วยงานที่เป็นผู้ผลิต หรือตัวแทนเครื่องมือชิ้นนั้นๆ และสามารถสอบกลับได้ของการวัดไปยังมาตรฐานระหว่างประเทศได้

จะเป็นอย่างไร

ถ้าไม่สอบเทียบเครื่องมือ

ผมไม่เคยสอบเทียบเครื่องมือ
ตอนนี้เลยเจอแต่ปัญหา

- ☹️ เครื่องมือแสดงผลไม่แม่นยำ
- ☹️ ตวงสินค้าผิดเพี้ยน ส่วนผสมเปลี่ยน
- ☹️ ขายไม่ดี รสชาติไม่เหมือนเดิม



www.centralabthai.com Central Lab Thai

เครื่องมือผมแม่นยำ

เพราะสอบเทียบทุกปี

- 😊 เครื่องมือได้รับการรับรองตามมาตรฐาน
- 😊 ใช้งานได้ดี แสดงผลเที่ยงตรง แม่นยำ
- 😊 ผลิตได้สินค้ามีคุณภาพ ตรงตามสูตร



บริษัท ออโต้แล็บไทย (ประเทศไทย) จำกัด
CENTRAL LAB THAI

เครื่องมือวัด (SI Unit) ทุกๆ 1 ปี
เพื่อให้เครื่องมือใช้งานได้ตามมาตรฐาน
ค่าไม่เพี้ยน เที่ยงตรง แม่นยำ

4) การวิเคราะห์ซ้ำ

เป็นการประเมินความแม่นยำของการวิเคราะห์ ประกันคุณภาพผลการทดสอบด้วยการทำซ้ำ แบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลักๆ ซึ่งความแตกต่างของประเภทการวิเคราะห์ซ้ำดังแสดงในตารางที่ 4.6

- การทำซ้ำของการทดสอบ (Replication)

ดำเนินการตรวจจำแนกยีนดัดแปลงพันธุกรรมและยีนอ้างอิงพืช ด้วยเทคนิค Real-time PCR ทำการทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ทุกครั้งที่มีการตรวจวิเคราะห์และในกรณีที่ตรวจพบยีนดัดแปลงพันธุกรรมและยีนอ้างอิงพืช สำหรับการทำ 2 ซ้ำ โดยให้ค่า C_p ที่ได้ระหว่าง การทำซ้ำของการทดสอบ ต้องใกล้เคียงกัน ไม่ต่างกันเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด สามารถสรุปผลว่า “ผ่านเกณฑ์” หากผลการทำซ้ำให้ค่า C_p ระหว่างการทำซ้ำของการทดสอบ ต่างกันเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ถือว่า “ไม่ผ่านเกณฑ์”

- การทดสอบซ้ำในช่วงการทดสอบ (Duplication test)

ดำเนินการตรวจจำแนกยีนดัดแปลงพันธุกรรมและยีนอ้างอิงพืช ด้วยเทคนิค Real-time PCR ดำเนินการทดสอบซ้ำ (2 Duplicate, 4 Replicate) จากตัวอย่างที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการโดยกำหนดความถี่การทดสอบซ้ำในช่วงการทดสอบ เพื่อเป็นการประกันคุณภาพผลการทดสอบ เช่น 1 สัปดาห์/ครั้ง 2 สัปดาห์/ครั้ง หรือตามแต่ห้องปฏิบัติการกำหนด เป็นต้น โดยมีเกณฑ์ในการพิจารณาดังนี้

- ค่า C_p ภายในแต่ละการทำซ้ำของการทดสอบ (Replicate) ของแต่ละการทดสอบซ้ำ ในช่วงการทดสอบ (Duplicate) ต้องใกล้เคียงกัน ไม่ต่างกันเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด
- ค่า C_p ระหว่างการทดสอบซ้ำ (Duplicate) ต้องใกล้เคียงกัน ไม่ต่างกันเกินกว่าเกณฑ์ที่กำหนด และต้องสรุปผลไปในทิศทางเดียวกัน เช่น Detected หรือ Not detected อย่างใดอย่างหนึ่ง
- หากผลการทดสอบดังกล่าวให้ผลไม่ครบเงื่อนไขถือว่า “ไม่ผ่านเกณฑ์”

- การทดสอบซ้ำภายหลังการทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพ (Traceability)

ดำเนินการสุ่มตัวอย่างทดสอบที่เก็บไว้หลังจากทดสอบซึ่งทราบผลการทดสอบแล้ว นำมาทดสอบซ้ำด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยกำหนดความถี่การทดสอบซ้ำในช่วงการทดสอบ เช่น เมื่อจำนวนตัวอย่างครบทุก ๆ 200, 300, หรือ 400 ตัวอย่าง หรือตามแต่ห้องปฏิบัติการกำหนด เป็นต้น เพื่อควบคุมคุณภาพภายหลังการทดสอบ โดยมีเกณฑ์ในการพิจารณาดังนี้

- ค่า C_p ภายในแต่ละการทำซ้ำของการทดสอบ (Replicate) ของการทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพภายหลังการทดสอบ ต้องใกล้เคียงกันไม่ต่างกันเกิน 2 รอบ (± 2 Cycles) โดย ค่า C_p ระหว่างการทดสอบครั้งแรกกับการทดสอบเพื่อควบคุมคุณภาพภายหลังการทดสอบไม่จำเป็นต้องใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมที่ต่างกันของการดำเนินการทดสอบ
- ผลสรุปการทดสอบซ้ำ (Traceability) ต้องให้ผลการทดสอบเหมือนการทดสอบครั้งแรก กล่าวคือ Detected หรือ Not detected อย่างใดอย่างหนึ่ง
- หากผลการทดสอบดังกล่าวให้ผลครบ 2 ข้อที่กล่าวถึงถือว่าผ่านเกณฑ์

ตารางที่ 5.6 การเปรียบเทียบความแตกต่างของประเภทการวิเคราะห์ซ้ำ

ขั้นตอน	การวิเคราะห์ซ้ำ		
	การทำซ้ำของการทดสอบ (Replication)	การทดสอบซ้ำในช่วงการทดสอบ (Duplication test)	การทดสอบซ้ำภายหลังการทดสอบ เพื่อควบคุมคุณภาพ (Traceability)
ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่ทดสอบ (รายวัน)	ตัวอย่างที่ทดสอบ (รายสัปดาห์)	นำตัวอย่างเดิมกลับมาทดสอบใหม่
การสกัดดีเอ็นเอ	สารละลายดีเอ็นเอ 1 หลอด	สารละลายดีเอ็นเอ 2 หลอด	สารละลายดีเอ็นเอ 1 หลอด (ไม่ได้สกัดดีเอ็นเอใหม่)
การตรวจยืนยันเชิงคุณภาพด้วยวิธี Real-time PCR	Result 1 Result 2	Result 1 Result 3 Result 2 Result 4	Result 1 Result 2
ความสัมพันธ์	ผลที่ได้ต้องใกล้เคียงกัน		
	↑ ผลสรุปการทดสอบซ้ำ (Traceability) ให้ผลเหมือนการทดสอบครั้งแรก		

5) การเทียบเคียงความสามารถของเจ้าหน้าที่ทดสอบ

เป็นการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบผลระหว่างผู้ทดสอบ 2 คนขึ้นไป เพื่อควบคุมความสามารถของเจ้าหน้าที่ทดสอบ และเพื่อให้มีเจ้าหน้าที่ทดสอบที่มีความสามารถเพียงพอในการปฏิบัติงานทดแทนกัน ทำการทดสอบตัวอย่างเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นตัวอย่างที่เคยทดสอบแล้วและมีผลการทดสอบเดิม หรือเป็นตัวอย่างที่ได้รับจากโปรแกรมการทดสอบความชำนาญร่วมกับหน่วยงานภายนอก หรือตัวอย่างมาตรฐานอ้างอิง เป็นต้น และเปรียบเทียบค่าทดสอบของผู้ทดสอบแต่ละคนกับค่าจริง หรือกับผลการทดสอบเดิม โดยใช้สถิติที่เหมาะสม

6 การอ่านและตีความใบรายงานผลการทดสอบพืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม

ใบรายงานผลการทดสอบต้องมียอดประกอบครบถ้วนตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025 (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2562) มีความถูกต้อง แสดงผลชัดเจน ไม่คลุมเครือ และสามารถสอบกลับได้ โดยองค์ประกอบและการตีความใบรายงานผลการทดสอบพืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งตัวอย่างของใบรายงานผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 4.11 (กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม, 2564) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

- 1) Test report: หัวเรื่อง รายงานผลการทดสอบ
- 2) Laboratory name and address: ชื่อ ที่อยู่ และสถานที่ดำเนินกิจกรรมของห้องปฏิบัติการ
- 3) การอ้างอิงเครื่องหมายการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบจากหน่วยรับรองสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ (สมป.) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พร้อมกับหมายเลขที่ได้รับการรับรอง (Accreditation No.) โดยตัวอย่างทดสอบที่อยู่ในขอบข่ายที่ได้รับการรับรอง จะมีเครื่องหมายการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบจาก สมป.
- 4) Report No.: เลขที่ใบรายงานผลการทดสอบ
- 5) Sample code: รหัสตัวอย่างทดสอบ
- 6) Issue Date: วันเดือนปี ที่ออกรายงานผลทดสอบ
- 7) Customer name and address: ชื่อ ที่อยู่ และข้อมูลติดต่อของลูกค้า
- 8) Sample description: รายละเอียดและการขึ้นตัวอย่างทดสอบ
- 9) Received date: วันเดือนปี ที่รับตัวอย่างทดสอบ
- 10) Date of Analysis: วันเดือนปี ที่ทำกิจกรรมโดยห้องปฏิบัติการ
- 11) End date of Analysis: วันเดือนปี ที่ทดสอบแล้วเสร็จ
- 12) Test Item: การตรวจสอบชนิดยีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรม
- 13) Results and LOD (%): ผลการทดสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรมเชิงคุณภาพ
 - Detected คือ ตรวจพบยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิด...
 - Not detected คือ ตรวจไม่พบยีนพืชดัดแปลงพันธุกรรมชนิด...
 - รายงานผลที่ระดับการตรวจวิเคราะห์ขั้นต่ำ (Limit of Detection: LOD) 0.1%
- 14) Method: วิธีทดสอบที่ใช้
- 15) Remark: หมายเหตุเพิ่มเติม หรือการยกเว้นจากที่ระบุไว้
- 16) Reported and approved by: การระบุตัวบุคคลผู้มีอำนาจหน้าที่ในการออกรายงาน
- 17) This report is certified only on the sample tested: ข้อความที่ระบุว่ารายงานนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น
- 18) This report shall not be reproduced, except in full, without prior approval of the laboratory: ข้อความที่ระบุว่าห้ามทำสำเนาเฉพาะบางส่วน ยกเว้นทำทั้งฉบับ โดยไม่ได้รับการอนุมัติจากห้องปฏิบัติการ



2 Research and Development of Genetically Modified Plant and Microbe Detection Group,
Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture,
GMOs analysis Lab: 50 Phaholyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900. THAILAND
Tel: (662) 579 1534 Fax: (662) 579 1533 Email: gmolab@doa.in.th

1 TEST REPORT




3 Accreditation No. 1275/59

4 Report No. :

5 Sample code :

6 Issue Date :

7 Customer Name :

8 Sample Description :

9 Received Date :

10 Date of Analysis :

11 End Date of Analysis :

12 Test Item	13 Result	LOD (%)	14 Method
GMOs qualitative			
Target gene test 1	Detected	0.1	T7.2-02 based on ISO 21569: 2005/Amd.1: 2013 by Real Time PCR
Target gene test 2	Not detected	0.1	T7.2-02 based on ISO 21569: 2005/Amd.1: 2013 by Real Time PCR

15 Remark:

LOD : Limit of Detection

16 Reported by:

()
Agricultural Scientist/Analyst

Approved by:

()
Director of Research and Development of Genetically
Modified Plant and Microbe Detection Group.

17 This report is certified only on the sample tested.

18 This report shall not be reproduced, except in full, without prior approval of the laboratory.

F7.8-01(Rev.0)/4 JUN 2019/P.1/1

ภาพที่ 5.11 ตัวอย่างและองค์ประกอบของใบรายงานผลการทดสอบพืชและสินค้าพืชดัดแปลงพันธุกรรม

เอกสารอ้างอิง:

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2550. การตรวจวิเคราะห์ DNA ในอาหาร. เข้าถึงจาก <http://bqsfdm.dmsc.moph.go.th/bqsfdmWeb/wp-content/uploads/2017/Publish/สารละลาย/dna.pdf>. เข้าถึงเมื่อ 4 เมษายน 2565.
- กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. การสุ่มตัวอย่างพืชเพื่อตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อน GMOs. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟรี-วัน; 2561.
- กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. 2563a. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน เรื่องการเตรียมตัวอย่าง (W7.4-01). ลงวันที่ 15 พฤษภาคม 2563.
- กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. 2563b. วิธีทดสอบ เรื่องการตรวจคัดกรองยีนคุณภาพด้วยวิธี Triplex Real-time PCR (T7.2-02). ลงวันที่ 10 สิงหาคม 2563.
- กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. 2563c. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน เรื่องการประกันคุณภาพผลการทดสอบ (P7.7). ลงวันที่ 1 กันยายน 2563.
- กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. 2564. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน เรื่องการรายงานผลการทดสอบ (P7.8). ลงวันที่ 1 กันยายน 2564.
- กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร. คู่มือการให้บริการตรวจสอบและออกใบรับรองคุณภาพสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2560.
- ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ พยุงศักดิ์ รวยอารี ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ ประสาน สืบสุข อัญชลี ศรีสุวรรณ กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร. 2548. การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป. สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. 72 หน้า
- จิตรัตน์ อัสวมงคลศิริ, สุธานันท์ นาคประนอม, พงศกร สรรค์วิทยากุล, ศิริพร เสนดำ, ปิยนุช ศรีชัย, วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2565. การตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้วย Tetraplex Real-time PCR เพื่อรับรองการนำเข้าสินค้าเกษตร. วารสารแก่นเกษตร. 50: 1353 – 1372.
- นวลฉวี เวชประสิทธิ์. ปฏิบัติการพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง; 2549.

ไบโอเอนทิสต์. (มปป.). การสกัดสารพันธุกรรม (Nucleic Acid Isolation). เข้าถึงจาก

<https://bioentist.com/blog/%E0%B8%9E%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%99%E0%B8%90%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%AA%E0%B8%81%E0%B8%B1%E0%B8%94-dna-%E0%B8%94%E0%B9%89%E0%B8%A7%E0%B8%A2-magnetic-dna-purification-3/>

เข้าถึงเมื่อ 9 มีนาคม 2565.

ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการขอและออกใบรับรองสุขอนามัย สำหรับการส่งออกมะละกอไปยังสหภาพยุโรป นอร์เวย์ สมาพันธรัฐสวิส สาธารณรัฐไอซ์แลนด์ จีน และญี่ปุ่น พ.ศ. 2559 (2559, 28 มกราคม) ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 133 ตอนพิเศษ 24 ง.

ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องการรับรองพืชที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพืชที่ไม่ได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรม พ.ศ. 2543. ลงวันที่ 23 สิงหาคม พ.ศ. 2543.

ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องการรับรองพืชที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพืชที่ไม่ได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรม (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2555 ลงวันที่ 11 มกราคม พ.ศ. 2555.

ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องการรับรองพืชหรือสินค้าพืชที่มีการได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรม พ.ศ. 2544 ลงวันที่ 21 มีนาคม พ.ศ. 2544.

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้นและเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 10) พ.ศ. 2553 (2553, 17 พฤษภาคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 127 ตอนพิเศษ 60 ง.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 431) พ.ศ. 2565 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่องอาหารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม. (2565, 7 มิถุนายน) ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 139 ตอนพิเศษ 127 ง.

ปิยนุช ศรชัย, ณัฐวดี บุญทองดี, จุติรัตน์ อัสวมงคลศิริ, ปริญดา สองเมืองสุข, วีระศักดิ์ พิทักษ์ศฤงคาร และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2563. การพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรอง *CaMV35S* promoter *Nos* terminator ยีน *Npfl* ร่วมกับยีนอ้างอิงมะละกอในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Tetraplex Real-time PCR. น. 85 – 96. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 17 เรื่องเกษตรกำแพงแสน ตามรอยพ่อ สานต่อศาสตร์แผ่นดิน 2-3 ธันวาคม 2563. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ปิยนุช ศรชัย, อีระ ชูแก้ว, ณัฐวดี บุญทองดี, จุติรัตน์ อัสวมงคลศิริ และ ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. 2562. การตรวจสอบความใช้ได้ของการตรวจจำแนกยีน Event Specific Mon810 และ NK603 และยีนอ้างอิงพืชด้วยเทคนิค Multiplex Real-time PCR. วารสารวิชาการเกษตร. 3: 224-237.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์, ปิยนุช ศรชัย, จุติรัตน์ อัสวมงคลศิริ และพงศกร สรรค์วิทยากุล. 2561. การพัฒนาเทคนิค Triplex Real-Time PCR เพื่อตรวจคัดกรองข้าวโพดดัดแปลงพันธุกรรมตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025. วารสารวิชาการเกษตร. 36: 316-331

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551.

- วรวิทย์ จันทรสุวรรณ. 2564. การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบสำหรับห้องปฏิบัติการ. เข้าถึงจาก [https://web.rmutp.ac.th/woravith/?page_id=7572#:~:text=%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%81%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%84%E0%B8%B8%E0%B8%93%E0%B8%A0%E0%B8%B2%E0%B8%9E%E0%B8%9C%E0%B8%A5%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3,\(Quality%20Control%3A%20QC\)%20%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0](https://web.rmutp.ac.th/woravith/?page_id=7572#:~:text=%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%81%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%84%E0%B8%B8%E0%B8%93%E0%B8%A0%E0%B8%B2%E0%B8%9E%E0%B8%9C%E0%B8%A5%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3,(Quality%20Control%3A%20QC)%20%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0). เข้าถึงเมื่อ 30 มิถุนายน 2565.
- สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ ประจำกรุงโตเกียว. บันทึกข้อความที่ กษ. 0211.7/131 เรื่อง การมีผลบังคับใช้ของมาตรการกักกันเมล็ดพันธุ์และต้นกล้ามะละกอที่นำเข้าจากประเทศไทย. ลงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2565.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. ข้อเสนอแนะตามการตรวจประเมินตาม มอก. 17025-2561 (GLA-23). กรุงเทพฯ: 2562.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. เกษตรอินทรีย์: การผลิต การแปรรูป การแสดงฉลาก และการจำหน่ายผลผลิตและผลิตภัณฑ์อินทรีย์. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9000 – 2564. กรุงเทพฯ: 2564.
- สุดา นันทวิทยา. 2550. การรับรองความสามารถผู้จัดโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ. สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. เข้าถึงจาก https://www.dss.go.th/images/st-article/bla_12_2550_PT-Provider.pdf. เข้าถึงเมื่อ 1 กรกฎาคม 2565.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2548.
- อโณทัย โภคาธิกรณ์. 2549. Basic Real-time PCR. ใน: การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Introduction to Real time-PCR and its applications. 16-17 พฤศจิกายน 2549. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- อุทุมพร แก้วน้ำดี. 2556. การรับรองห้องปฏิบัติการ นโยบายการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ หรือการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ. เข้าถึงจาก https://www.tisi.go.th/data/stories/lab/pdf/seminar_6Sep13/attachment_PT_2.pdf. เข้าถึงเมื่อ 1 กรกฎาคม 2565.
- Adamse, P., E. Dagand, K. Bohmert-Tatarev, D. Wahler, M. Miranda, E.J. Kok and J. Bendiek. 2011. GMO Genetic Elements Thesaurus (GMO-GET): a controlled vocabulary for the consensus designation of introduced or modified genetic elements in genetically modified organisms. BMC Bioinformatics. 22:48. Available: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12859-020-03880-0.pdf>. Accessed April. 12, 2022.

- Bahrdf, C., A.B. Krech, A. Wurzf, and D. Wulff. 2010. Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 396: 2103–2112.
- Bak, A., and J.B. Emerson. 2019. Multiplex quantitative PCR for single-reaction genetically modified (GM) plant detection and identification of false-positive GM plants linked to *Cauliflower mosaic virus (CaMV)* infection. *BMC Biotechnology*. 73: 1-12.
- Bessetti, J. 2007. An Introduction to PCR Inhibitors. Available: <https://www.promega.es/-/media/files/resources/profiles-in-dna/1001/an-introduction-to-pcr-inhibitors.pdf?la=es-es>. Accessed Mar. 28, 2022.
- Bustin, SA., V. Benes, JA. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, MW. Pfaffl, GL. Shipley, J. Vandesompele, and CT. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55: 611–622.
- Department of Agriculture. No. 0915/3579 Subject: Submit Thailand’s Certificate for non-genetically organisms for Exported Food Products from Thailand to India. 31 August, B.E. 2564 (2021).
- Eugster, A., P. Murmann, A. Kaenzig, and A. Breitenmoser. 2014. Development and validation of a P-35S, T-nos, T-35S and P-FMV Tetraplex Real-time PCR screening method to detect regulatory genes of genetically modified organisms in food. *Food Analysis*. 68: 701–704.
- European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF). 2022. What we do. Available: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>. Accessed April. 4, 2022.
- FDA Bhawan. Food safety and stanardard authority of India (FSSAI): 1-1764/FSSAI/Imports/2018 (Part1). Requirement of Non-GM cum GM free certificate accompanied with imported food consignment-reg. New Delhi: 2020.
- Fraga, D., T. Meulia, and S. Fenster. 2014. Real-Time PCR. Current protocols essential laboratory techniques. Available: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470089941.et1003s08>. Accessed Sep. 2, 2021.
- Grohmann, Lutz., A. Belter, B. Speck, O. Goerlich, P. Guertler, A. Angers-Loustau, and A. Patak. 2017. Screening for six genetically modified soybean lines by an event-specific multiplex PCR method: Collaborative trial validation of a novel approach for GMO detection. *J Consum Prot Food Saf*. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00003-016-1056-y>. Accessed Aug. 6, 2021.

- Hougs, L., F. Gatto, O. Goerlich, L. Grohmann, K. Lieske, M. Mazzara, F. Narendja, J. Ovesná, N. Papazova, I. Scholtens, and J. Žel. 2017. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods (Version 2). EUR 29015 EN. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Huang, H.Y., and T.M. Pan. 2004. Detection of genetically modified Maize Mon810 and NK603 by Multiplex and Real-Time polymerase chain reaction methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.52: 3264–3268.
- ISO 21569: 2005. Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods.
- ISO 21571: 2005. Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction.
- Koppel, R., F. Velsen, N. Felderer, and T. Bucher. 2012. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from four transgenic soy Mon89788, A5547-127, Roundup Ready, A2704-12 and lectin. *Eur Food Res Technol*. Available: <https://www.researchgate.net/publication/257372901>. Accessed Aug. 6, 2021.
- Life technologies. 2012. Real-time PCR handbook. Available: <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>. Accessed Sep.2, 2021.
- Lu, J., G.Z. Ji, G. Li, Y.F. Wu, J. Yang, S.L. Lin, D.L. Yang, J.N. Zhao, and W.M. Xiu. 2016. Development of a multiplex event-specific PCR assay for detection of genetically modified rice. *Cereal Research Communications*. 44: 47–56.
- Lucena-Aguilar, G., M.S-L. Ana, B-A. Cristina, A.C. Jose', A.L-G. Jose'and A-Q. Rocio. 2016. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and Biobanking*. 14: 264-270.
- Pitaksaringkarn, W., T. Assawamongkholsiri, P. Sornchai, and P. Thammakijawat. 2021. Development of the In-House genetically modified wheat Mon71800 reference plasmid for qualitative detection by Tetraplex Real-Time PCR. pp. 512 - 519. In *Proceedings of RSU International Research Conference 30 April 2021*. Pathum Thani, Thailand.
- Rogers, S.O. and Bendich, A.J. 1985. Extraction of DNA from Milligram Amounts of Fresh, Herbarium and Mummified Plant Tissues. *Plant Molecular Biology*. 5:69-76.
- Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification System. Revised 12/09.



เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การประเมินความปลอดภัย การตรวจสอบ และกำกับดูแล

- เผยแพร่ครั้งแรก : กันยายน 2565
- แหล่งเผยแพร่ : E-book (online)
- : กรมวิชาการเกษตร (คลังเอกสารความรู้) Website <https://www.doa.go.th/share/>
- : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (การจัดการความรู้: KM Learning)
Website <https://www.doa.go.th/biotech/>
- จัดทำและเผยแพร่ : กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร