

ความก้าวหน้าของงานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรค
ของกรมวิชาการเกษตร

Biotechnology Research Progress in Plant Breeding for Disease Resistance
of Department of Agriculture

จิราพร แก่นทรัพย์^{1/*} มัลลิกา นวลแก้ว^{2/} ภาณุวัฒน์ มุลจันทร์^{3/} สุวลักษณ์ ศันสนีย์^{3/} รัชณี โสภา^{4/} อ้อยทิน ผลพานิช^{4/}
Jeeraporn Kansup^{1/*} Mallika Nualkaew^{2/} Phanuwat Moonjuntha^{3/} Suwaluk Sansanee^{3/}
Ratchanee Sopha^{4/} Auytin Polpanit^{4/}

Received 28 Dec. 2024/Revised 13 Mar. 2025/Accepted 13 Mar. 2025

ABSTRACT

The infestation and outbreak of plant diseases, such as viruses, bacteria, and fungi, is one of many causes that reduces the quantity and quality of agricultural products and poses a threat to food security. Plant breeding for disease resistance is one of the essential methods to minimize crop losses and sustain high productivity. This review gives a brief overview of the biotechnology used to develop plant disease-resistant crop varieties, including marker-assisted selection, genomic selection, genetic modification, and genome editing. These modern biotechnologies offer more precise, efficient, and faster procedures in producing disease-resistant varieties. However, each technology has its own advantage and limitation. Thus, the selection of biotechnology for use in the experiment must be based on various aspects, including plant types, regulations, laboratory readiness, and knowledge. Furthermore, this review also discusses research conducted by the Department of Agriculture on improving disease-resistant plant varieties using biotechnology to facilitate selection and development of resistant varieties in economic crops of Thailand.

Keywords: disease resistance; marker-assisted selection; genomic selection; genetic modification; genome editing

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

^{1/} Biotechnology Research and Development Office, Thanya Buri, Pathum Thani 12110, Thailand

^{2/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี 76120

^{2/} Phetchaburi Agricultural Research and Development Center, Cha-am, Phetchaburi 76120, Thailand

^{3/} ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง อ.เมือง จ.ระยอง 21150

^{3/} Rayong Field Crops Research Center, Mueang, Rayong 21150, Thailand

^{4/} ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

^{4/} Chiang Mai Field Crops Research Center, San Sai, Chiang Mai 50290, Thailand

* Corresponding author: jkansupthdoa@gmail.com

บทคัดย่อ

การระบาดของเชื้อราทำลายพืชจากโรคพืช เช่น ไวรัส แบคทีเรีย และรา เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตเกษตรลดลง ส่งผลกระทบต่อความมั่นคงด้านอาหาร การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานโรคพืชเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาได้ ในบทความนี้มีเนื้อหาเกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อโรคพืช ประกอบด้วย การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ การคัดเลือกจีโนม การดัดแปลงพันธุกรรม และการปรับแต่งจีโนม การใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่เหล่านี้ช่วยทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชมีความแม่นยำมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ได้พันธุ์ต้านทานโรคตรงตามเป้าหมายรวดเร็วกว่าเดิม อย่างไรก็ตาม แต่ละเทคโนโลยีมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้จึงต้องพิจารณา ทั้งชนิดพืช กฎระเบียบ ความพร้อมของห้องปฏิบัติการและองค์ความรู้ที่มีอยู่ เนื้อหาในบทความยังกล่าวถึงความก้าวหน้าในการดำเนินการของกรมวิชาการเกษตรในการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรคโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพในพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย ซึ่งทำให้การคัดเลือกและพัฒนาพันธุ์พืชต้านทานโรคประสบความสำเร็จ

คำสำคัญ: ความต้านทานโรค; การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกพันธุ์; การคัดเลือกจีโนม; การดัดแปลงพันธุกรรม; การปรับแต่งจีโนม

บทนำ

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้ และมี

บทบาทสำคัญในการพัฒนาพันธุ์พืชมาตั้งแต่อดีต โดยมีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) ซึ่งมีขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ และคัดเลือกพันธุ์ที่มีความเสถียรพร้อมใช้งาน เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง มีความปลอดภัย อีกทั้งไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์จำเพาะที่มีราคาสูง (Figlan and Mwadzingeni, 2022) แต่การปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมมีข้อจำกัด คือ การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการสามารถดำเนินการได้หลังจากที่มีการแสดงออกของลักษณะที่ต้องการเท่านั้น ซึ่งการรอให้พืชมีการแสดงออกต้องใช้เวลา (Rajendra and Charitha, 2024) อีกทั้งลักษณะบางอย่างต้องทำการคัดเลือกในสภาพแวดล้อมที่มีความจำเพาะเท่านั้นพืชจึงมีการแสดงออกได้ เช่น ความต้านทานโรค ความทนทานต่อสภาพเครียด ซึ่งการจัดเตรียมให้เกิดสภาพแวดล้อมที่มีความจำเพาะอาจทำได้ยาก นอกจากนี้ ต้องมีการปลูกและตรวจสอบประชากรพืชจำนวนมากในหลายรุ่นเพื่อคัดเลือกลักษณะที่มีการแสดงออกหรือฟีโนไทป์ (phenotype) ที่ต้องการ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้เวลานานและใช้แรงงานมาก จึงได้มีการพัฒนาโดยนำเทคโนโลยีใหม่ ๆ มาช่วย เพื่อให้การปรับปรุงพันธุ์สามารถดำเนินการได้เร็วขึ้น (Figure 1) การนำเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่นำความรู้ทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตหรือชิ้นส่วนของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ เพื่อพัฒนาหรือปรับปรุงให้มีลักษณะที่ดีขึ้น มาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้น ต้องคำนึงถึงข้อดี ข้อเสียของแต่ละเทคโนโลยี ข้อจำกัดของการใช้งาน ความพร้อมของหน่วยปฏิบัติ ความคุ้มค่า รวมถึงความปลอดภัยทางชีวภาพต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

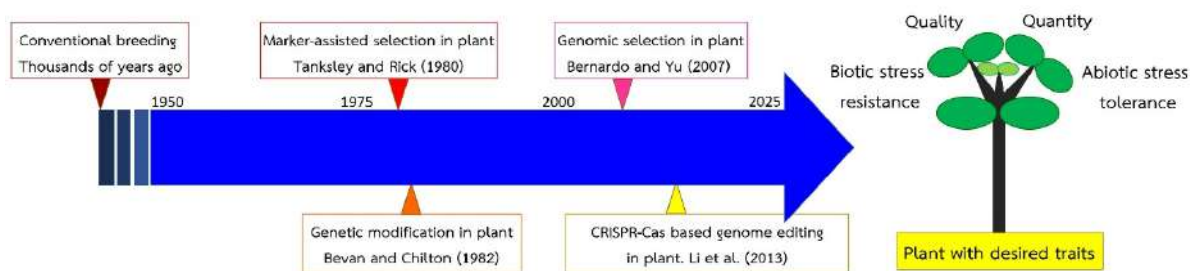


Figure 1 Plant breeding has a long history, beginning thousands of years ago with conventional breeding, with advancements in genetic research, DNA-based technologies were subsequently developed, leading to more precise breeding methods including marker-assisted selection, genetic modification, genomic and CRISPR/Cas9 based genome editing

เทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรค

เทคโนโลยีชีวภาพที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคพืชในระยะเวลาที่รวดเร็วถ้าลักษณะที่ต้องการคัดเลือกมีปรากฏอยู่ในกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ วิธีการที่ใช้อาจเน้นไปที่การใช้เทคโนโลยีที่สามารถคัดเลือกพืชเป้าหมายที่มีลักษณะที่ต้องการจากประชากรลูกผสม แต่ถ้าไม่มีลักษณะที่ต้องการคัดเลือกในพันธุ์กรรมของพืชนั้น ๆ วิธีการที่ใช้จำเป็นต้องทำให้เกิดการปรับเปลี่ยนหรือตัดแปลงจึงได้ประมวลความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่นำมาในงานปรับปรุงพืชเพื่อให้ได้พันธุ์ต้านทานโรค รวมถึงข้อจำกัด และข้อเสนอแนะในการนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดตามวัตถุประสงค์ของแต่ละวิธีการดังต่อไปนี้

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ที่สังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งในดีเอ็นเอจีโนมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจเป็นตำแหน่งที่ไม่จำเพาะแต่มีกระจายอยู่ทั่วจีโนม หรือเป็นตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อลักษณะเป้าหมายหรือยีนเป้าหมาย ดังนั้น เครื่องหมาย

โมเลกุลจึงใช้บ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ หรือใช้ในการคัดเลือกพันธุ์หรือลูกผสมที่มีลักษณะตามต้องการ หรือติดตามการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมหรือยีนที่เชื่อมโยงกัน เครื่องหมายโมเลกุลสามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ (marker-assisted selection, MAS) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์พืชจากการคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะที่ต้องการไว้ ทำให้ลดพื้นที่ปลูก แรงงาน และค่าใช้จ่าย รวมถึงระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ได้ (Jonah et al., 2011)

MAS มีความน่าเชื่อถือสูง เนื่องจากสามารถคัดเลือกพืชที่มีสารพันธุกรรมหรือจีโนไทป์โดยตรง จึงไม่ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยแวดล้อม สามารถคัดเลือกพืชได้ตั้งแต่พืชอายุน้อย สามารถคัดเลือกลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนด้อยได้ ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมทำได้ยาก (Rajendra and Charitha, 2024) ใช้ตรวจสอบยีนในการรวมลักษณะทางการเกษตรหลายลักษณะในพันธุ์เดียวหรือพีระมิดยีน (gene pyramiding) ได้ (Figlan and Mwadzingeni, 2022) อีกทั้งสามารถใช้ตรวจคัดเลือกหลายลักษณะพร้อมกันโดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอเดียว

ตัวอย่างความสำเร็จของการใช้ MAS ช่วยคัดเลือกพืชในการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรค เช่น การพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองต้านทานโรคราสนิมโดยการใส่ยีน *Resistance against Phakopsora pachyrhizi (Rpp2, Rpp4 และ Rpp5* (Lemos et al., 2011) การพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะต้านทานโรคใบไหม้จากแบคทีเรีย (bacterial leaf blight) และต้านทานโรคไหม้ (blast) (Subburaj et al., 2024) เป็นต้น การใช้ MAS มีความก้าวหน้าอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการค้นพบเครื่องหมายชนิดสนิปที่เป็นการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หนึ่งเบส (single nucleotide polymorphism, SNP) และกระจายตัวทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคนิคการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ (next generation sequencing, NGS) ซึ่งมีความสามารถในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็วภายในครั้งเดียวและมีประสิทธิภาพ ทำให้สามารถสร้างแผนที่จีโนมที่มีข้อมูลของเครื่องหมายโมเลกุลหนาแน่นและช่วยให้คัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้แม่นยำยิ่งขึ้น

ด้านข้อจำกัดของ MAS คือการมีค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับห้องปฏิบัติการค่อนข้างสูง ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญเฉพาะด้าน และเครื่องมือวิทยาศาสตร์จำเพาะที่มีราคาสูง ส่วนในด้านเทคนิคพบว่า MAS ยังมีข้อด้อยบางประการที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพ อาทิ เช่น การเกิดผลบวกลวงจากกระบวนการรวมตัวกันใหม่ทางพันธุกรรม (recombination) หลังจากการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่ส่งผลต่อระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับยีนที่สนใจ ทำให้เกิดความผิดพลาดในการรายงานผลโดยเฉพาะอย่างยิ่งหากใช้วิธีการตรวจรูปแบบการเรียงตัวของตำแหน่งซันดิเอ็นเอ (DNA pattern) รูปแบบที่ได้ อาจแตกต่างจากที่ควรจะเป็น ทำให้เกิดเป็นผลบวกหรือลบลง

MAS แม้จะมีศักยภาพในการปรับปรุงลักษณะเชิงคุณภาพ (qualitative traits) ที่ควบคุมโดยยีนหลักจำนวนน้อยยีน เช่น ความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง (cassava mosaic disease, CMD) ที่มียีนเกี่ยวข้อง 3 ยีน ได้แก่ *cassava mosaic disease (CMD)1* (Fregene et al., 2001) *CMD2* (Akano et al., 2002) และ *CMD3* (Okogbenin et al., 2012) แต่ประสบความสำเร็จน้อยในการคัดเลือกลักษณะเชิงปริมาณที่ซับซ้อนซึ่งควบคุมโดยยีนรองหลายยีน (Zhao et al., 2014) เช่น ความทนทานต่อสภาพเครียดต่าง ๆ ซึ่งการคัดเลือกอาจต้องพิจารณาใช้เทคนิคอื่นที่เหมาะสมกว่า

ข้อจำกัดของ MAS อีกประการหนึ่ง คือ บางเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนามาจากการวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait locus, QTL) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความแปรผันแบบต่อเนื่อง (continuous variation) และควบคุมโดยยีนจำนวนมาก การหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์เพื่อระบุตำแหน่งบนโครโมโซมหรือยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณในประชากรจากคู่ผสมพ่อแม่หนึ่งอาจไม่สามารถใช้คัดเลือกลักษณะนั้นในประชากรคู่ผสมพ่อแม่อื่นได้ เนื่องจากมีความจำเพาะกับพื้นฐานทางพันธุกรรมของประชากรที่ทำการทดสอบ ดังนั้นจึงต้องปรับเปลี่ยนวิธีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจากการวิเคราะห์ QTL มาเป็นการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอ (DNA variants) กับลักษณะทางพันธุกรรม (traits) แทน ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ marker-trait association เพื่อการหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์เพื่อระบุตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะทางการเกษตรที่สนใจในประชากรที่มีพันธุกรรมหลากหลาย โดยสมาชิกในประชากรไม่มีความสัมพันธ์

ทางพันธุกรรมกัน จะช่วยให้เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ได้กับประชากรที่หลากหลายกว่า

การคัดเลือกจีโนม

จีโนม หรือข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต Meuwissen et al. (2001) ได้พัฒนาการคัดเลือกจีโนม (genomic selection, GS) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือกลักษณะเชิงปริมาณที่ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง โดยที่แต่ละยีนมีอิทธิพลน้อยต่อลักษณะปรากฏหรือฟีโนไทป์ GS นำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชครั้งแรกในข้าวโพด (Bernardo and Yu, 2007) โดยการเก็บข้อมูลจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่กระจายทั่วจีโนมและนำมาประมวลเข้ากับข้อมูลฟีโนไทป์ของลักษณะทางการเกษตรที่สนใจในประชากรอ้างอิงหรือประชากรที่ใช้ในการฝึก (training population) เพื่อสร้างแบบจำลองการทำนาย (prediction model) สำหรับนำไปใช้เพื่อหาค่าความสามารถทางพันธุกรรมจีโนมหรือค่าการผสมพันธุ์จีโนม (genomic estimated breeding value, GEBV) ในประชากรที่ผสมพันธุ์ทั้งหมด (breeding population) หรือประชากรที่ต้องการศึกษาและพยากรณ์ว่าจะมีฟีโนไทป์เป็นอย่างไร โดยประมวลผลจากข้อมูลจีโนไทป์ทั้งหมดของแต่ละต้น ซึ่ง GEBV เป็นตัวเลขหรือคะแนนที่สร้างขึ้นทางสถิติที่ใช้ประเมินศักยภาพทางพันธุกรรม ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถพยากรณ์ต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีและมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์หรือสำหรับใช้ในการพัฒนาพันธุ์ต่อไป แตกต่างจาก MAS ที่มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพียงไม่กี่ตำแหน่งที่สัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะในการคัดเลือก

ตัวอย่างการใช้ GS ในการพัฒนาพันธุ์พืชที่มีความต้านทานโรค เช่น โรคราสนิมในข้าวสาลี โรคใบไหม้จากเชื้อรา (*Fusarium head blight*) ในข้าวสาลี

และข้าวบาร์เลย์ และโรคใบไหม้ในข้าวโพดจากเชื้อ *Setosphaeria turcica* เป็นต้น (Poland and Rutkoski, 2016) ปัจจุบัน GS มีการบูรณาการเข้ากับการใช้เทคโนโลยีการสร้างจีโนไทป์ปริมาณงานสูง (high-throughput genotyping technology) เช่น การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ยุคใหม่ (NGS) เพื่อศึกษาข้อมูลจีโนไทป์จำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นลง รวมถึงมีการพัฒนาแบบจำลองทางสถิติเพื่อให้การคัดเลือกจีโนมมีความแม่นยำยิ่งขึ้น

จุดเด่นของ GS คือ ความสามารถในการทำนายลักษณะเชิงปริมาณที่ซับซ้อนได้อย่างแม่นยำ แม้จะเป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนรองหลายยีน (Zhao et al., 2014) สามารถดำเนินการได้ตั้งแต่พืชอายุน้อย ลดความจำเป็นในการตรวจคัดกรองฟีโนไทป์ ทำให้ลดเวลา แรงงาน และทรัพยากรของการปรับปรุงพันธุ์ลง ซึ่งส่งผลให้มีความก้าวหน้าทางพันธุกรรม (genetic gain) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Das et al., 2020) อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดในการใช้ GS คือ ขนาดประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่ใช้ในการฝึกต้องมีจำนวนมากพอ รวมถึงต้องมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่ใช้ในการฝึกกับประชากรที่ผสมพันธุ์ทั้งหมด อีกทั้ง GS จำเป็นต้องมีเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเพาะสำหรับใช้ศึกษา วิเคราะห์จีโนไทป์และฟีโนไทป์ ที่มีราคาสูง ดังนั้นการพิจารณาเลือกใช้ GS ควรคำนึงถึงความคุ้มค่าด้วย

การดัดแปลงพันธุกรรม

เทคโนโลยีการดัดแปลงพันธุกรรม (genetic modification, GM) ได้รับการพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1973 โดยนักชีวเคมี Herbert Boyer และ Stanley Cohen โดยการแทรกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งเข้าไปในแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่ง (Raman, 2017) เพื่อใช้ดัดแปลงหรือเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของ

สิ่งมีชีวิตให้มีลักษณะตามต้องการ ด้วยการนำยีนหรือ ดีเอ็นเอที่ต้องการเข้าสู่สิ่งมีชีวิตเป้าหมาย ซึ่งยีนนั้น จะถูกเชื่อมเข้ากับพลาสมิดตัวพา (plasmid vector) ที่มีชุดยีนควบคุมการแสดงออกในเซลล์เป้าหมาย รวมถึงยีนเครื่องหมาย (marker gene) ที่ใช้ในการ คัดเลือกพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณ จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสม จากแบคทีเรียแล้วจึงทำการถ่ายทอดเพื่อนำยีนนั้น เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เพื่อให้เซลล์เจ้าบ้าน สามารถสร้างโปรตีนที่ต้องการหรือเซลล์เจ้าบ้าน มีการดัดแปลงทางพันธุกรรม สำหรับในพืชมีรายงาน การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมครั้งแรกในยาสูบ (Bevan and Chilton, 1982)

คณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัย ทางชีวภาพ (2554) ได้ให้ความหมายของ สิ่งมีชีวิต ดัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified organisms, GMOs) คือ สิ่งมีชีวิตใดก็ตามที่มีการตัดต่อ ตัดแต่ง ดัดแปลง หรือเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม หรือ ผสมผสานสารพันธุกรรมใหม่ เพื่อให้มีลักษณะตามที่ ต้องการ ซึ่งไม่สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ หรือเกิดขึ้นได้แต่ใช้เวลานานและไม่จำเพาะเจาะจง ทำนองเดียวกับพืชดัดแปลงพันธุกรรมจะใช้เทคนิค การถ่ายยีนให้แทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์ใหม่ (ชาลินีและจินตนา, 2554) ทำให้มีดีเอ็นเอแปลกปลอม (foreign DNA) เข้าไปในจีโนม GM ช่วยให้สามารถ แลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมข้ามสายพันธุ์ได้ เพื่อ ปรับปรุงลักษณะทางการเกษตรที่ต้องการ อาทิเช่น มะละกอต้านทานโรคใบด่างจุดวงแหวนที่ได้รับการ ถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein, cp) ของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน (papaya ring spot virus, PRSV) ทำให้มะละกอสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรค (Fitch et al., 1992) และมันฝรั่งต้านทานโรคใบไหม้ (late blight) ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora*

infestans โดยการถ่ายยีนต้านทาน (R gene) 3 ยีน ประกอบด้วยยีน *RB* และยีน *Rpi blb2* จาก *Solanum bulbocastanum* และยีน *Rpi-vnt1.1* จาก *Solanum venturi* (Bubolz et al., 2022) นอกจากนี้ มีวิธีการ ดัดแปลงพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RNA interference (RNAi) ที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วย โมเลกุลขนาดเล็กของ RNA ทำให้ยีนมีการแสดงออก ลดลง (Younis et al., 2014) นวัตกรรมที่ต่อยอดจาก การดัดแปลงพันธุกรรมอันหนึ่ง คือ เทคนิคชีววิทยา สังเคราะห์ (synthetic biology, SynBio) ซึ่งเป็นการ ผสมผสานการดัดแปลงพันธุกรรม การปรับแต่งจีโนม หรือเทคนิคอื่นๆ เพื่อสร้างระบบทางชีวภาพ (biological systems) และองค์ประกอบทางชีวภาพ (biological components) ใหม่ ๆ เพื่อให้เซลล์เกิดการทำงาน ในรูปแบบใหม่ หรือพัฒนาไปในทางที่ดีขึ้น เช่น การ พัฒนาสิ่งมีชีวิตที่มีวิถีเมแทบอลิซึมใหม่เพื่อการผลิต เชื้อเพลิงชีวภาพ การออกแบบเซลล์เพื่อการบำบัดรักษา เป็นต้น (Garner, 2021)

จุดเด่นของ GM ได้แก่ สามารถปรับปรุง คุณภาพและปริมาณของพืชได้โดยการถ่ายยีนจากพืช หรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีลักษณะเฉพาะไปยังพืชเป้าหมาย ทำให้ได้พันธุ์พืชที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ต้องการ ภายในจำนวนรุ่นที่น้อยกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบเดิม ซึ่งลดการใช้แรงงานและทรัพยากรลง อย่างไรก็ตาม GM มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ การที่พืช GM มีดีเอ็นเอ แลกปลอม เช่น ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นยีน ที่ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม หลงเหลือในจีโนมพืช ทำให้พืช GM ไม่ได้รับการยอมรับ จากผู้บริโภคและผู้กำหนดนโยบาย (Figlan and Mwadzingeni, 2022) ดังเช่น กรณีของมะละกอ GM ต้านทานโรคใบด่างจุดวงแหวนของประเทศไทย (Davidson, 2008)

ประเทศไทยยังไม่มีกฎหมายเฉพาะเพื่อควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม การกำกับดูแลจึงอาศัยกฎหมายที่มีอยู่และใช้ระเบียบอื่น ๆ โดยอาศัยอำนาจพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม ดังนั้น พืชดัดแปลงพันธุกรรมจึงจัดเป็นสิ่งต้องห้าม โดยห้ามนำเข้าประเทศ ยกเว้นการนำเข้าเพื่อเป็นอาหารสำเร็จรูป เป็นวัตถุดิบในภาคอุตสาหกรรม เช่น ข้าวโพดและถั่วเหลืองดัดแปลงพันธุกรรม หรือ เป็นการนำเข้ามาเพื่อการทดลองหรือวิจัย โดยการนำเข้าต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไขที่กำหนด และการปลูกพืชดัดแปลงพันธุกรรมในงานวิจัยสามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนที่ได้มาตรฐานตามแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพเท่านั้น ไม่สามารถปลูกภาคสนามได้ จนกว่าจะมีกฎหมายว่าด้วยความปลอดภัยทางชีวภาพ แม้มติ ครม. เมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2550 ผ่อนผันให้มีการขยายการทดลองวิจัยพืช GM ให้ไปสู่ระดับแปลงทดลองของราชการได้ โดยให้มีการระบุพื้นที่และชนิดของพืช และมีมาตรการควบคุมอย่างเข้มงวด รวมทั้งจัดให้มีกระบวนการรับฟังความเห็นของประชาชน และผู้มีส่วนได้เสีย (บรรพต, 2554) เห็นได้ว่า การดำเนินการที่เกี่ยวข้องกับพืช GM มีความเข้มงวดอย่างมากเนื่องจากข้อกังวลด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมได้รับการพัฒนาขึ้นทำให้สามารถลดข้อกังวลเกี่ยวกับการมีถิ่นแปลงปลอมหลงเหลือในจีโนมพืชได้ จึงทำให้นักวิจัยหันมาใช้เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมมากขึ้น

การปรับแต่งจีโนม

การปรับแต่งจีโนม (genome editing, GEd) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการปรับเปลี่ยนและแก้ไขรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีความจำเพาะและแม่นยำ

หรือให้ได้ยีนที่มีลักษณะตามต้องการ เช่น แก้ไขยีนบกพร่องที่อาจก่อให้เกิดโรคร้ายแรงที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่าง ๆ (คณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ, 2559) ได้รับการพัฒนาขึ้นในช่วงปลายทศวรรษปี 1900 (Carroll, 2017) GEd แบ่งตามกลไกเอนไซม์ในกลุ่มนิวคลีเอส (site-directed nuclease technology: SDN) (Podevin et al., 2013) ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น 3 แบบ ได้แก่ SDN1 (deletion: การขาดหายไป) SDN2 (substitution: การแทนที่) และ SDN3 (insertion: การแทรกเข้าไป) เทคนิคที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชมีหลายวิธี เช่น วิธี clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR-associated protein 9 (Cas9) หรือ CRISPR-Cas9 (Mojica et al., 2009) เป็นระบบที่มีอาร์เอ็นเอนำพา (guide RNA, gRNA) เป็นตัวนำเข้าไปจับกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายและใช้โปรตีน Cas9 ในการตัดเส้นดีเอ็นเอสายคู่ ณ ตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย เพื่อให้เกิดการปรับแต่งยีน วิธี transcription activator-like effector nucleases (TALENs) เป็นระบบที่มีโปรตีนที่เรียกว่า TALE เข้าไปจับกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายและใช้โปรตีน FokI ในการตัดเส้นดีเอ็นเอทำให้เกิดการปรับแต่งยีน สำหรับวิธี zinc-finger nucleases (ZFNs) เป็นระบบที่มีโปรตีนที่เรียกว่า zinc-finger เข้าไปจับกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายและใช้โปรตีน FokI ในการตัดเส้นดีเอ็นเอทำให้เกิดการปรับแต่งยีน เป็นต้น ในบรรดาวิธีเหล่านี้ CRISPR-Cas9 ได้รับความนิยมในการปรับแต่งจีโนมพืชมากที่สุด

การใช้ GEd ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้ต้านทานโรค ส่วนใหญ่เป็นการปรับแต่งยีน susceptible factor หรือยีน S ของพืชเจ้าบ้านที่อำนวยความสะดวกในการติดเชื้อสาเหตุโรค โดยการยับยั้งยีน S

จะช่วยสร้างความต้านทานโรคในพืชได้ ซึ่งมีตัวอย่างความสำเร็จ เช่น การปรับแต่งยีน *novel cap-binding protein (nCBP)-1* และยีน *nCBP-2* เพื่อให้เกิดความต้านทานต่อโรคหัวเน่าสีน้ำตาลในมันสำปะหลัง (Gomez et al., 2019) การปรับแต่งยีน *Triticum aestivum MILDEW-RESISTANCE LOCUS (TaMLO)* เพื่อความต้านทานโรคราแป้งในข้าวสาลี (Wang et al., 2014) การปรับแต่งยีน *Powdery Mildew Resistance 4 (PMR4)* เพื่อความต้านทานโรคราแป้งในมะเขือเทศ (Santillán et al., 2020) และการปรับแต่งยีน *Oryza sativa ethylene responsive factor (OsERF) 922* เพื่อความต้านทานโรคไหม้ในข้าว (Wang et al., 2016) เป็นต้น เทคนิค GEd มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เช่น เบส เอดิทิง (base-editing) และไพรม์ เอดิทิง (prime editing) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมขั้นสูงที่พัฒนามาจาก CRISPR-Cas9 โดยมีความแม่นยำสูงกว่า สามารถแก้ไขยีนในระดับเบสเฉพาะจุดโดยไม่จำเป็นต้องสร้างรอยตัดที่สายดีเอ็นเอสองเส้น (Kaya, 2024)

ข้อดีของ GEd คือ สามารถแก้ไขลำดับเบสของยีนเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ รวดเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ GM ทั้งสามารถปรับปรุงคุณภาพและปริมาณของพืชได้โดยไม่มีการใส่ยีนแปลกปลอมจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ทำให้มีการยอมรับอย่างต่อเนื่อง แม้ GEd จะมีความแม่นยำสูง แต่ยังคงมีความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นได้ เช่น อาจเกิดการปรับแต่งยีนนอกเป้าหมาย (off-targeting) ทำให้เกิดการแก้ไขยีนขึ้นในตำแหน่งที่ไม่ต้องการได้ ที่อาจนำไปสู่การกลายพันธุ์ที่ไม่พึงประสงค์ และส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์และสิ่งมีชีวิตได้ (Permyakova and Deineko, 2024) นอกจากนี้ ขั้นตอนดำเนินการของ GEd ยังไม่เสถียร จึงต้องได้รับการพัฒนาและปรับปรุงอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งระบบการถ่ายฝากองค์ประกอบเพื่อการ

ปรับแต่งจีโนม (transformation) ได้แก่ การถ่ายฝาก gRNA และโปรตีน Cas9 เข้าสู่พืช และระบบการพัฒนาเป็นต้นใหม่ (regeneration) ยังคงเป็นปัญหาคอขวด ดังนั้น การศึกษาวิจัยระบบการถ่ายฝากองค์ประกอบ และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของพืชแต่ละชนิด ให้รองรับต่อการใช้เทคโนโลยี GEd จึงเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างขาดไม่ได้ อีกทั้งการบูรณาการความร่วมมือระหว่างนักวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม ด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และด้านการประเมินลักษณะ จะช่วยส่งเสริมให้การพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้ GEd ประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้นในอนาคต

ในด้านกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการใช้ GEd ในการพัฒนาพันธุ์พืชนั้น กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ออกประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง การรับรองสิ่งมีชีวิตที่พัฒนาจากเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม เพื่อใช้ประโยชน์ในภาคการเกษตร พ.ศ. 2567 ประกาศลงราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่ 16 กรกฎาคม 2567 และกรมวิชาการเกษตรซึ่งรับผิดชอบกรณีพืชและจุลินทรีย์ ได้ออกประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการรับรองพืชที่พัฒนาจากเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนม พ.ศ. 2567 ประกาศลงราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่ 15 สิงหาคม 2567 ซึ่งประกาศทั้งสองมีวัตถุประสงค์เพื่อยกระดับศักยภาพและความเข้มแข็งภาคการเกษตรของประเทศและส่งเสริมการวิจัยพัฒนาสิ่งมีชีวิตที่ได้จากเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมสู่การใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรคของกรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตรมีการวิจัยและพัฒนาที่นำเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือก (MAS) และปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคในพืชหลายชนิด ดังนี้

โรคยอดเน่าสับประรด (heart rot disease) เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. (Figure 2A) ทำให้ใบอ่อนหยุดการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เกิดรอยโรคที่ฉ่ำน้ำและรอยเน่าที่โคนต้นทำให้ใบหลุดร่วง หากรุนแรงต้นสับประรดตายได้ (Ratti et al., 2018) ปัจจุบันเกษตรกรนิยมปลูกสับประรดพันธุ์ MD2 เพื่อจำหน่ายในรูปผลสด สับประรดพันธุ์นี้มีรสชาติดี ทนทานต่ออาการไส้สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการเก็บรักษาในอุณหภูมิระหว่างการขนส่ง (Figure 2B) แต่มีความอ่อนแอต่อโรคยอดเน่า ดังนั้น กรมวิชาการเกษตรจึงได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคยอดเน่าสำหรับใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสับประรดกลุ่มพันธุ์อ่อนแอต่อโรคเน่า ซึ่งได้แก่ พันธุ์ MD2 และ MG3 กลุ่มพันธุ์ต้านทาน ได้แก่ พันธุ์อินทรีชิตขาว และอินทรีชิตแดง ด้วยวิธีการวิเคราะห์จีโนมไทป์จากการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (genotyping by sequencing, GBS) แล้ววิเคราะห์ค้นหาตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสับประรดทั้งสองกลุ่ม โดยเลือกเฉพาะตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของนิวคลีโอไทด์หนึ่งเบส หรือ สนิป (SNP) ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์และเป็นโฮโมไซกัส คัดกรองตำแหน่งสนิปซึ่งผลจากงานวิจัยพบตำแหน่งสนิปทั้งหมด 12,579 ตำแหน่ง และจากการคัดเลือกตำแหน่งสนิปที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (nonsynonymous coding) พบเครื่องหมายสนิปชนิดนี้ในยีนต้านทานโรค จำนวน 2 ยีน ได้แก่ ยีน *E3 ubiquitin-protein ligase MED25 binding RING-H2 protein 1 (MBR1)* ที่ตำแหน่งสนิป S6_3252739 และยีน *Pathogenesis-related protein-4-like (PR-4)* ที่ตำแหน่งสนิป S15_644992 จึงได้ทำการพัฒนาไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเครื่องหมายสนิป

ที่พบด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR ได้สำเร็จ (จิราพรและคณะ, 2566) เมื่อนำไปทดสอบในประชากรสับประรดลูกผสมที่แสดงฟีโนไทป์ต้านทานโรคในแปลงปลูกในสภาพธรรมชาติ 22 ต้น พบว่า เครื่องหมายสนิป S6_3252739 และ S15_644992 มีความถูกต้อง 100 และ 81.8% ตามลำดับ (มัลลิกาและคณะ, 2568) เทคโนโลยี MAS ด้วยเทคนิค tetra-primer ARMS-PCR สามารถดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลที่มีเครื่องมือพื้นฐานได้ เช่น เครื่องพีซีอาร์ เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวยังต้องมีการทดสอบกับประชากรลูกผสมจำนวนมากขึ้น เพื่อตรวจวิเคราะห์ความแม่นยำของวิธีการในการระบุความต้านทานโรคยอดเน่าในสับประรด ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยทำให้สามารถดำเนินการคัดเลือกสับประรดที่ต้านทานโรคยอดเน่าได้ตั้งแต่พืชอายุน้อย

โรคใบด่างมันสำปะหลัง (CMD) เกิดจากเชื้อไวรัส *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) (IPPC-report, 2019) มีแมลงหริ่งขาวยาสูบเป็นพาหะนำโรค โรคนี้ทำให้พืชแสดงลักษณะใบด่างจนถึงเหลือง ใบเสียรูป ต้นเตี้ย แคระแกร็น และทำให้ผลผลิตลดลงหรือไม่ได้ผลผลิต ยังไม่พบพันธุ์ต้านทานโรคที่เกษตรกรปลูกเพื่อการค้า ดังนั้น กรมวิชาการเกษตรจึงได้ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังลูกผสมให้มีลักษณะต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลังจากพันธุ์ต้านทานที่ได้รับจากมูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย 7 พันธุ์ ได้แก่ TME3 C33 IITA-TMS-IBA920057 IITA-TMS-IBA972205 IITA-TMS-IBA980505 IITA-TMS-IBA980581 และ TME B419 โดยนำพันธุ์เหล่านี้มาใช้ในการสร้างลูกผสม และใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง 11 เครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกลูกผสมที่ต้านทาน

(จีราพรและคณะ, 2563; Kansup et al., 2024) ผลการทดลอง พบว่า สามารถตรวจพบลูกผสมชุดปี 2565-2567 ที่มีเครื่องหมายด้านทานโรคใบต่างครบทั้ง 11 เครื่องหมาย จำนวน 18 สายพันธุ์ เช่น CMR65-96-03 (เกิดจาก C33 x KU50), CMR65-97-02 (C33 x MMAL63), CMR65-99-02 (C33 x Rayong11), CMR66-97-1 และ CMR66-97-22 (MNGA1 x IITA-TMS-IBA 920057 หรือ อิทธิ3) เป็นต้น ซึ่งการทดลองนี้ชี้ว่า MAS ช่วยลดจำนวนต้นของลูกผสมที่ทำการตรวจสอบลักษณะความต้านทานโรคด้วยการปลูกเชื้อสาเหตุโรค ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกเฉพาะลูกผสมต้นที่มีแถบดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคเพื่อนำไปตรวจสอบอาการร่วมกับเชื้อสาเหตุ และประเมินลักษณะทางการเกษตรอื่น ๆ ทำให้ลดการใช้ทรัพยากรและร่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบต่างมันสำปะหลังได้

โรครากปมในมันสำปะหลัง (cassava root knot disease) มีสาเหตุจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* จากรายงานของ อุดมศักดิ์และบัญชา (2555) พบว่า ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง80 ในปี พ.ศ. 2554 ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 70% ซึ่งมันสำปะหลังจะไม่แสดงอาการผิดปกติบนส่วนเหนือดิน ทำให้ไม่ทราบการติดเชื้อจนกระทั่งตอนเก็บเกี่ยว กรมวิชาการเกษตรจึงได้พัฒนาเครื่องหมายสนิปที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรครากปมสำหรับนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ พบว่า เครื่องหมายสนิป S2_5300154 บนโครโมโซมที่ 2 สัมพันธ์กับความต้านทานโรครากปมเมื่อทดสอบกับมันสำปะหลังจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองจำนวน 71 พันธุ์ พบว่า เครื่องหมายสนิปดังกล่าวมีความถูกต้องในการตรวจคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรครากปมถึง 70.4% (มัลลิกาและคณะ, 2565)

โรคราสนิมถั่วเหลือง มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phakopsora pachyrhizi* ทำให้ถั่วเหลืองแสดงอาการใบมีจุดสีน้ำตาลแดง กรมวิชาการเกษตรได้ร่วมกับมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศึกษาหาตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคราสนิมในประชากรถั่วเหลืองช่วงที่ 2 และ 3 จากกลุ่มสมระหว่างพันธุ์ กวก. เชียงใหม่5 กับพันธุ์สุขโขทัย2 โดยการวิเคราะห์ QTL พบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคราสนิม 3 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt472 Satt288 และ Satt012 (สมศักดิ์และคณะ, 2548) เครื่องหมายเหล่านี้มีตำแหน่งบนโครโมโซมอยู่บริเวณเดียวกับยีนต้านทานต่อโรคราสนิมถั่วเหลือง *resistance to P. pachyrhizi* (*Rpp*) 4 และสามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีเชื้อสายมาจากพันธุ์ กวก. เชียงใหม่5 ที่มีความต้านทานโรคราสนิมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (จีราพรและคณะ, 2554) อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุลทั้งสามนี้อาจไม่สามารถใช้คัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่ได้สืบเชื้อสายมาจากพันธุ์ กวก. เชียงใหม่5 เนื่องจากมีความจำเพาะกับพื้นฐานทางพันธุกรรมของประชากรที่ทำการทดสอบ ดังนั้นหากต้องการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ไปใช้กับประชากรกลุ่มอื่นควรทำการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายในการคัดเลือกพันธุ์ในประชากรกลุ่มนั้น ๆ ก่อน

โรคเหี่ยวในสับปะรด (pineapple mealybug wilt) เกิดจากเชื้อไวรัส pineapple mealybug wilt associated virus (PMWaVs) มีผลร้ายแรงเป็นพาหะและมดช่วยแพร่กระจายเชื้อ PMWaVs ระบาดรุนแรงในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหาย กรมวิชาการเกษตรได้ดำเนินการแก้ปัญหาโดยการผลิตหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดโรค โดยตรวจสอบเชื้อ PMWaVs เพื่อเลือกต้นพันธุ์ที่ปลอดโรคเหี่ยวด้วยเทคนิค reverse

transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ก่อนนำไปขยายเพิ่มจำนวน (คณะทำงานโครงการการพัฒนาการผลิตหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการสร้างแปลงต้นแบบการผลิตสับปะรดปลอดโรคเหี่ยวแบบบูรณาการ, 2559) ทำให้ได้หน่อพันธุ์ที่ปลอดโรคอย่างแท้จริง และลดปัญหาการมีไวรัสแฝงในหน่อพันธุ์ อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ต้องมีการตรวจสอบเชื้อก่อนการส่งมอบหน่อพันธุ์ทุกครั้ง ซึ่งใช้ทรัพยากรและเวลาในการตรวจสอบ ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาย่างยั่งยืนควรมีการดำเนินการพัฒนาพันธุ์สับปะรดให้มีความต้านทานต่อโรคเหี่ยว โดยการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคเหี่ยวสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ หรือศึกษาในที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคเหี่ยว และใช้เทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมในการปรับแต่งยีนดังกล่าวเพื่อสร้างความต้านทานโรคให้แก่สับปะรด

โรคใบไหม้ในมันสำปะหลัง (cassava bacterial blight, CBB) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihoti* กรมวิชาการเกษตรได้มีงานวิจัยการประเมินระดับความต้านทานของมันสำปะหลังจากเชื้อพันธุ์กรรมจำนวน 548 พันธุ์ เพื่อหาพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ โดยทำในสภาพโรงเรือนด้วยวิธีการตัดใบ พบมันสำปะหลัง 3 พันธุ์ที่ค่อนข้างต้านทานต่อโรคใบไหม้ ได้แก่ MCUB23 CR19 และ MARG2 (Moonjuntha et al., 2012) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ทดสอบในสภาพโรงเรือนนี้ ใช้วิธีการปลูกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีการตัดใบ ซึ่งแตกต่างจากวิธีการเข้าทำลายในธรรมชาติ จึงควรมีการทดสอบระดับความต้านทานซ้ำด้วยวิธีการปลูกเชื้อที่คล้ายคลึงกับสภาพธรรมชาติ เช่น วิธีการพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อ เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคเข้าทำลายมันสำปะหลังจากช่องเปิดธรรมชาติ รวมถึง

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบไหม้กับมันสำปะหลังพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย สำหรับนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคใบไหม้ตั้งแต่ช่วงแรกของกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ และเพื่อกำหนดคู่ผสมเพื่อสร้างลูกผสมมันสำปะหลังให้ต้านทานโรคใบไหม้ให้แม่นยำมากยิ่งขึ้น

ส่วนเทคโนโลยี GS มีการศึกษาจีโนมของเชื้อไวรัส *Columnnea latent viroid* (CLVd) ในสกุล *Pospiviroid* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคในมะเขือเทศ มะกอก และมะเขือเปราะ ซึ่งจีโนมของ CLVd มีขนาดเล็กประมาณ 367-374 นิวคลีโอไทด์ และได้ศึกษาการกลายพันธุ์และวิวัฒนาการของเชื้อในพืชอาศัยเพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมโรคพืช (ปริเชษฐ์และคณะ, 2567) สำหรับเทคโนโลยี GEd กรมวิชาการเกษตรยังมีงานวิจัยที่อยู่ระหว่างดำเนินการ ซึ่งกองแผนงานและวิชาการ (2567) ได้รวบรวมไว้ เช่น การปรับแต่งยีน *Polyphenol oxidase* (PPO) เพื่อพัฒนาพันธุ์สับปะรดให้ทนทานต่ออาการไส้สีน้ำตาล การปรับแต่งยีน *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E* (eIF4E) เพื่อความต้านทานโรคไวรัสวงแหวนในมะละกอ และการปรับแต่งยีน *Capsicum annuum ethylene responsive factor 28* (CaERF28) เพื่อให้เกิดความต้านทานโรคแอนแทรกโนสในพริก เป็นต้น

บทสรุป

เทคโนโลยีชีวภาพสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อต้านทานโรคโดยใช้ประโยชน์จากจีโนมโทปหรือสารพันธุกรรม ได้แก่ MAS GS GM และ GEd เป็นเทคโนโลยีที่ช่วยให้การพัฒนาพันธุ์พืชต้านทานโรคทำได้รวดเร็วตรงเป้าหมายและมีประสิทธิภาพ สามารถลดข้อจำกัดด้านพื้นที่ทำการทดลอง งบประมาณ และแรงงาน เมื่อเทียบกับวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม

โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เทคโนโลยี MAS และ GS ที่ไม่ได้
รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม ทำให้การคัดเลือกพันธุ์มี
ความแม่นยำ อีกทั้งยังสามารถดำเนินการคัดเลือกได้
ตั้งแต่พืชอายุน้อย รวมทั้งสามารถคัดเลือกหรือ
คัดกรองกลุ่มประชากรลูกผสมที่มีลักษณะเป้าหมาย
ได้จากประชากรลูกผสมที่ได้ทั้งหมดพร้อมกัน ซึ่งเป็น
การเพิ่มโอกาสในการตรวจพบลูกผสมที่มีการเข้าคู่
ของยีนหรือโครโมโซมที่ถูกต้องจากลูกผสมทั้งหมด
ส่วนเทคโนโลยี GM และ GE-d สามารถเปลี่ยนแปลง
สารพันธุกรรมเพื่อพัฒนาพันธุ์พืชให้มีลักษณะตาม
ต้องการในจำนวนรุ่นการคัดเลือกที่น้อยลง เทคโนโลยี
GM สามารถปรับปรุงพันธุ์พืชที่ข้ามขอบเขตการผสม
พันธุ์ตามธรรมชาติได้ เช่น การสร้างพืชต้านทานโรค
โดยใช้ยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น กรมวิชาการเกษตรได้
นำเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มาประยุกต์ใช้ในการ
ปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคเพื่อแก้ปัญหาการ
ระบาดของโรคพืชในพืชเศรษฐกิจ ทำให้การปรับปรุง
พันธุ์พืชต้านทานโรคสามารถดำเนินการได้รวดเร็วและ
มีประสิทธิภาพมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กองแผนงานและวิชาการ. 2567. งบประมาณด้านการวิจัยและ
นวัตกรรมและการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
กรมวิชาการเกษตร ที่ได้รับจัดสรรงบประมาณจาก
กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประจำปี
2568. 413 หน้า.
- คณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ. 2554.
แนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับ
การดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่หรือพันธุ์
วิศวกรรม. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
แห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 194 หน้า.
- คณะกรรมการเทคนิคด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ. 2559.
แนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับ
การดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่.
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 232 หน้า.
- คณะทำงานโครงการการพัฒนาการผลิตหน่อพันธุ์ปลอดโรค
เหี่ยวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการสร้างแปลง
ต้นแบบการผลิตสับปะรดปลอดโรคเหี่ยวแบบบูรณา
การ. 2559. แนวทางการแก้ไขปัญหาโรคเหี่ยวแบบ
บูรณาการ. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 36 หน้า.
- จิราพร แก่นทรัพย์ สมศักดิ์ ศรีสมบุญ และจุลภาค คูนวงศ์.
2554. การคัดเลือกถั่วเหลืองพันธุ์ถั่วเหลืองต้านทาน
โรคราสนิม (*Phakopsora pachyrhizi*, T. P. Syd.)
โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล. วารสารวิชาการเกษตร.
(29)1: 2-11.
- จิราพร แก่นทรัพย์ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ ประพิศ วงเทียม
อรุณทัย ชาววา สุภาวดี จ้อเหรียญ ดนัย นาคประเสริฐ
และจินณจาร์ หาญเศรษฐสุข. 2563. การใช้เครื่องหมาย
โมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรค
ใบด่าง Cassava Mosaic Disease. วารสารวิชาการเกษตร.
38(1): 68-79.
- จิราพร แก่นทรัพย์ มัลลิกา นวลแก้ว อมรรักษ์ คิดใจเดียว
สุภาวดี จ้อเหรียญ รังสิมันต์ ธีระวงศกัญญา และภรณ์
สว่างศรี. 2566. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด
ในยีน *E3 ubiquitin-protein ligase MBR1* และยีน
pathogenesis-related protein PR-4-like ที่เกี่ยวข้อง
กับความต้านทานโรคเน่าในสับปะรด. หน้า 1-9. ใน:
Proceeding การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 20.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- ชาลินี คงสวัสดิ์ และจินตนา จันทรเจริญฤทธิ์. 2554.
สถานภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมและความปลอดภัย
ทางชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 27(1): 181-195.
- บรรพต ณ ป้อมเพชร. 2554. สถานภาพของประเทศไทยตาม
พิธีสารคาร์ตาเฮน่าว่าด้วยความปลอดภัยทางชีวภาพ.
ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพ. 3(1): 10-13.
- ปรีเชษฐ ตั้งกาญจนาภาสน์ กาญจนา วาระวิชนะ Annelies
Haegeman Monica Höfte และ Kris De Jonghe.
2567. วิวัฒนาการของเชื้อ *columnea latent viroid*
(CLVd) ในพืชอาศัยโดยการศึกษา quasi-species
population. วารสารวิชาการเกษตร. 42(3): 272-286.
- มัลลิกา แก้ววิเศษ อัจฉราพรรณ ใจเจริญ จิราพร แก่นทรัพย์
สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ สุภาวดี จ้อเหรียญ วิภาวี ชื่นโรจน์
วานิช คำพานิช, กฤตยา เพชรผิ้ง, ประพิศ วงเทียม และ

- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2565. การค้นหาและพัฒนาเครื่องหมายสปีชีส์ใหม่เพื่อร่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังให้มีไซยาไนด์ต่ำ ด้านทานโรครากปมและโรคใบด่างมันสำปะหลัง. หน้า 1–15. ใน: ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2564. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- มัลลิกา นวลแก้ว สุภาวดี จ้อเหรียญ จีราพร แก่นทรัพย์ และพงศกร สรรค์วิทยากุล. 2568. การปรับปรุงพันธุ์สับปะรดเพื่อเพิ่มขีดความสามารถการแข่งขันในตลาดโลก. รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรมวิชาการเกษตร. 112 หน้า.
- สมศักดิ์ ศรีสมบูรณ์ มณฑา นันทพันธ์ จุลภาค คั่นวงศ์ ฉัฐพร คั่นวงศ์ อาภาณี โภคประเสริฐ สิทธิ แดงประดับ วีระศักดิ์ เทพจันทร์ ให้พร กิตติกุล ศุภชัย แก้วมีชัย ธนิต โสภณธร เทวา เมลาณนท์ และอลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2548. การใช้ DNA Marker ในการศึกษาตำแหน่งยีนด้านทานโรครากปมถั่วเหลือง. หน้า 101-110. ใน: ผลงานวิจัยเพื่อพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2547 และผลงานวิจัยโครงการวิจัยระดับที่ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนงานวิจัยด้านการเกษตร ประจำปี 2547. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช และบัญชา ชินศรี. 2555. การสำรวจและประเมินความเสียหายจากโรครากปมของ มันสำปะหลัง. หน้า 391-395. ใน: เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50. สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Akano, A.O., A.G.O. Dixon, C. Mba, E. Barrera and M. Frege. 2002. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. *Theoretical and Applied Genetics*. 105(4): 521-525.
- Bernardo, R. and J. Yu. 2007. Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize. *Crop Science*. 47(3): 1082–1090.
- Bevan, M.W. and M.D. Chilton. 1982. Multiple transcripts of T-DNA detected in nopaline crown gall tumors. *Journal of Molecular and Applied Genetics*. 1(6): 539-546.
- Bubolz, J., P. Sleboda, A. Lehrman, S.O. Hansson, C. Johan Lagerkvist, B. Andersson, M. Lenman, S. Resjö, M. Ghislain, M.A. Zahid, N.P. Kieu and E. Andreasson. 2022. Genetically modified (GM) late blight-resistant potato and consumer attitudes before and after a field visit. *GM Crops and Food*. 13(1): 290-298.
- Carroll, D. 2017. Genome editing: past, present, and future. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 90(4): 653-659.
- Das, R.R., M.T. Vinayan, M.B. Patel, R.K. Phagna, S.B. Singh, J.P. Shahi, A. Sarma, N.S. Barua, R. Babu, K. Seetharam, J.A. Burgueño and P.H. Zaidi. 2020. Genetic gains with rapid-cycle genomic selection for combined drought and waterlogging tolerance in tropical maize (*Zea mays* L.). *The Plant Genome*. 13(3): e20035.
- Davidson, S.N. 2008. Forbidden fruit: transgenic papaya in Thailand. *Plant Physiology*. 147(2): 487-493.
- Figlan, S. and L. Mwadzingeni. 2022. Breeding tools for assessing and improving resistance and limiting mycotoxin production by *Fusarium graminearum* in wheat. *Plants*. 11(15): 1933.
- Fitch, M.M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, J.L. Slightom and J.C. Sanford. 1992. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Nature Biotechnology*. 10(11): 1466–1472.
- Frege, M., E. Okogbenin, C. Mba, C.F. Angel, M.C. Suarez, G. Janneth, P. Chavarriaga, W. Roca, M. Bonlerbale and J. Tohme. 2001. Genome mapping in cassava improvement: challenges, achievements and opportunities. *Euphytica*. 120(1): 159–165.
- Garner, K.L. 2021. Principles of synthetic biology. *Essays in Biochemistry*. 65(5): 791-811.

- Gomez, M.A., Z.D. Lin, T. Moll, R.D. Chauhan, L. Hayden, K. Renninger, G. Beyene, N.J. Taylor, J.C. Carrington, B.J. Staskawicz and R.S. Bart. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9 mediated editing of cassava eIF 4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotechnology Journal*. 17(2): 421–434.
- IPPC-report. 2019. The current status of SLCMV in Thailand. Available on: <https://www.ippc.int/en/countries/thailand/pestreports/2019/03/the-current-status-of-slcmv-in-thailand/>. Accessed: December 6, 2024.
- Jonah, P.M., L.L. Bello, O. Lucky, A. Midau and S.M. Moruppa. 2011. Review: the importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research*. 11(5): 5-12.
- Kansup, J., S. Sansanee and A. Chaicharoen. 2024. Development of tetra-primer ARMS-PCR for selection and discrimination of CMD-resistant cassava varieties used in Thailand. *Thai Agricultural Research Journal*. 42(2): 217–228.
- Kaya, H.B. 2024. 2023. Base Editing and Prime Editing. In: *A Roadmap for Plant Genome Editing*. A. Riccio, D. Eriksson, D. Miladinović, J. Sweet, K. van Laere, E. Woźniak-Gientka (eds). Springer. Available on: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-031-46150-7_2. Accessed: December 6, 2024.
- Lemos, N.G., A.L. Braccini, R.V. Abdelnoor, M.C.N. Oliveira, K. Suenaga and N. Yamanaka. 2011. Characterization of genes *Rpp2*, *Rpp4* and *Rpp5* for resistance to soybean rust. *Euphytica*. 182(1): 53-64.
- Li, J.F., J.E. Norville, J. Aach, M. McCormack, D. Zhang, J. Bush, G.M. Church and J. Sheen. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*. 31(8): 688 - 691.
- Meuwissen, T.H.E., B.J. Hayes and M.E. Goddard. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*. 157(4): 1819–1829.
- Mojica, F.J., C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez and C. Almendros. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 155(3): 733–740.
- Moonjuntha, P., J. Jarunat, P. Wongtiem, J. Harnsetasook, R. Boontung and S. Thongchuay. 2012. Evaluation of cassava bacterial blight (CBB) disease from cassava germplasm in Thailand. In: *Global Cassava Partnership. Second Scientific Conference GCP 21 – II. June 18–22. National Crops Resources Research Institute. Namulonge, Uganda*.
- Okogbenin, E., C.N. Egesi, B. Olanmi, O. Ogundapo, S. Kahya, P. Hurtado, J. Marin, O. Akinbo, C. Mba, H. Gomez, C. de Vicente, S. Baiyeri, M. Uguru, F. Ewa and M. Fregene. 2012. Molecular marker analysis and validation of resistance to cassava mosaic disease in elite cassava genotypes in Nigeria. *Crop Science*. 52(6): 2576–2586.
- Permyakova, N. and E. Deineko. 2024. Crop improvement: comparison of transgenesis and gene editing. *Horticulturae*. 10(1): 57.
- Podevin, N., H.V. Davies, F. Hartung, F. Nogué and J.M. Casacuberta. 2013. Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends in Biotechnology*. 31(6): 375-383.
- Poland, J. and J. Rutkoski. 2016. Advances and challenges in genomic selection for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 54(1): 79-98.

- Rajendra, V. and K. Charitha. 2024. Marker-assisted selection for crop improvement. *Strategy & Application of Plant Breeding*. 263-281.
- Raman, R. 2017. The impact of genetically modified (GM) crops in modern agriculture: a review. *GM Crops and Food*. 8(4): 195-208.
- Ratti, M.F., M.S. Ascunce, J.J. Landivar and E.M. Goss. 2018. Pineapple heart rot isolates from Ecuador reveal a new genotype of *Phytophthora nicotianae*. *Plant Pathology*. 67(8): 1803-1813.
- Santillán, M.M.I., V. Bracuto, E. Koseoglou, M. Appiano, E. Jacobsen, R.G.F. Visser, A.A. Wolters and Y. Bai. 2020. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biology*. 20(1): 284.
- Subburaj, S., T. Thulasinathan, V. Sakthivel, B. Ayyenar, R. Kambale, V.R. Rajagopalan, S. Manickam, R. Rajasekaran, G. Chellappan, K. Thiyagarajan, M. Swaminathan and R. Muthurajan. 2024. Genetic enhancement of blast and bacterial leaf blight resistance in rice variety CO 51 through marker-assisted selection. *Agriculture*. 14(5): 693.
- Tanksley, S.D. and C.M. Rick. 1980. Isozymic gene linkage map of the tomato: Applications in genetics and breeding. *Theoretical and Applied Genetics*. 58(2): 161-170.
- Wang, Y., X. Cheng, Q. Shan, Y. Zhang, J. Liu, C. Gao and J.L. Qiu. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*. 32(9): 947-951.
- Wang, F., C. Wang, P. Liu, C. Lei, W. Hao, Y. Gao, Y.G. Liu and K. Zhao. 2016. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PLoS One*. 11(4): e0154027.
- Younis, A., M.I. Siddique, C.K. Kim and K.B. Lim. 2014. RNA interference (RNAi) induced gene silencing: A promising approach of hi-tech plant breeding. *International Journal of Biological Sciences*. 10(10): 1150-1158.
- Zhao, Y., M.F. Mette, M. Gowda, C.F.H. Longin and J.C. Reif. 2014. Bridging the gap between marker-assisted and genomic selection of heading time and plant height in hybrid wheat. *Heredity*. 112(6): 638-645.