การประยุกต์ใช้เทคนิคการปรับแต่งจีโนมด้วยระบบ CRISPR/Cas9 ในการวิจัยและพัฒนาข้าว

Application of Genome Editing Using the CRISPR/Cas9 System in Rice Research and Development

วราพงษ์ ชมาฤกษ์[1)]

Varapong Chamarerk[1)]

Human have been utilizing plants for various purposes, i.e. as a direct source of human food, animal feed, a source of medicines, as well as a source of biofuels. Modern plant varieties have been improved from either wild species or indigenous species. The conventional breeding process relies on the genetic diversity that already exists in the nature. This requires the process of breeding and selecting elite lines in the large populations for several generations until the desirable characteristics can be transferred into new plant varieties. It is a resource-intensive process. Genome editing at the targeted position, which uses specific nucleases could enhance the potential of both basic research and its application in plant breeding as well. This is because the scientists could conduct the plant genome editing rapidly, precisely and could predict the outcomes resulting from the genome editing. This review article will focus on plant genome editing with CRISPR/Cas9, a genome-editing system that uses nucleases to generate DNA double-strand breaks at specific locations since it is a technique that most researchers currently use and have already been applied for rice germplasm improvement. However, Thailand should have clear rules and regulations to encourage researchers to be more interested in conducting research in this area.

Keywords: rice, genome editing, CRISPR/Cas9, varietal improvement

บทคัดย่อ

มนุษย์ใช้ประโยชน์จากพืชในหลากหลายด้าน ทั้งเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์ อาหารของสัตว์เลี้ยง ยารักษาโรค ตลอดจนเป็นแหล่งของเชื้อเพลิงชีวภาพ พันธุ์พืชใหม่ๆ ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาจากพันธุ์ป่าและพันธุ์พื้นเมืองดั้งเดิม กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ตามแบบมาตรฐานดั้งเดิม อาศัยความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งต้องอาศัยกระบวนการผสมพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ดีเด่นในประชากรขนาดใหญ่หลายชั่วอายุ จนกว่าจะสามารถถ่ายทอดเอาลักษณะที่ต้องการเข้าสู่พืชพันธุ์ใหม่ได้ เป็นกระบวนการที่ต้องใช้ทรัพยากรจำนวนมาก การปรับแต่งจีโนมตรงตำแหน่งเป้าหมายด้วยเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมที่มีความจำเพาะเจาะจงช่วยเพิ่มศักยภาพในการวิจัยขั้นพื้นฐาน ตลอดจนการนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้เป็นอย่างดี เนื่องจากนักวิจัยสามารถปรับแต่งจีโนมได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และทำนายผลลัพธ์ของการปรับแต่งจีโนมได้ บทความปริทัศน์นี้เน้นกล่าวถึงการปรับแต่งจีโนมพืชด้วยระบบ CRISPR/Cas9 ซึ่งเป็นระบบที่ปรับแต่งจีโนมด้วยการทำให้เกิดการตัดย่อยเส้นดีเอ็นเอสายคู่ตรงตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งเป็นเทคนิคที่นักวิจัยส่วนมากนิยมใช้ในปัจจุบันและเริ่มมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวบ้างแล้ว อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยควรมีกฎ ระเบียบ ข้อบังคับที่ชัดเจน เพื่อกระตุ้นให้นักวิจัยสนใจดำเนินงานวิจัยในด้านนี้ให้มากขึ้น

คำสำคัญ: ข้าว การปรับแต่งจีโนม CRISPR/Cas9 การปรับปรุงพันธุ์

[1)]อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพ กรมการข้าว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Former Biotechnology Expert, Rice Department, Chatuchak, Bangkok 10900

คำนำ

ในอดีตการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นกระบวนการแบบมาตรฐานดั้งเดิม ซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาและแรงงานจำนวนมาก (Hua *et al*., 2019) โดยเฉพาะพืชที่มีอายุข้ามปี หรือหากลักษณะที่ต้องการปรับปรุงมีความซับซ้อนและถูกควบคุมด้วยยีนหลายยีน ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์พืชต้องเผชิญกับความท้าทายหลายประการ เนื่องจากคุณลักษณะที่พึงประสงค์ของผู้บริโภคและผู้ใช้ประโยชน์จากพืชพันธุ์ใหม่มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น การเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศมีส่วนให้จำเป็นต้องพัฒนาพันธุ์พืชใหม่ๆ ให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ในขณะที่ยังคงสามารถรักษาเสถียรภาพการให้ผลผลิตและรักษาคุณภาพให้คงเดิม

อย่างไรก็ตาม กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ตามแบบมาตรฐานดั้งเดิมซึ่งใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่ในธรรมชาติ แต่อัลลีลของยีนที่พึงประสงค์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมีปริมาณจำกัด ไม่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้ใช้ประโยชน์จากพืชพันธุ์ใหม่ๆ ได้ทันการณ์ นักวิจัยจึงได้คิดค้นหาวิธีการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรม ในยุคแรกอาจใช้วิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ไม่ว่าจะเป็นวิธีการทางชีวภาพ ทางกายภาพ หรือการใช้สารเคมีก็ตาม ข้อจำกัดก็คือ การกลายพันธุ์ที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้น มักเกิดขึ้นแบบสุ่มกระจายทั่วทั้งจีโนม (Hua *et al*., 2019) กระบวนการคัดเลือกในประชากรรุ่นลูกจำนวนมากในหลายชั่วอายุ จึงยังจำเป็นจนกว่าจะสามารถคัดเลือกหาต้นพืชที่มีลักษณะตรงตามที่ต้องการได้ และหากพืชที่ต้องการปรับปรุงเป็นพืชชนิดที่มีจีโนมซับซ้อน หรือเป็นชนิดโพลีพลอยด์ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมหลายชุดก็ยิ่งมีความยุ่งยากมากขึ้น (Parry *et al.,* 2009)

ระยะต่อมานักวิจัยได้คิดค้นเทคนิคที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้ลักษณะตรงตามที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น คือ เทคนิคการถ่ายฝากยีน (gene transform) แต่ก็มีข้อจำกัดในการยอมรับของสังคม เนื่องจากพันธุ์พืชใหม่ที่ได้จากเทคนิคการถ่ายฝากยีน เป็นพืชดัดแปรพันธุกรรม (genetically-modified crops, GM crops) ซึ่งมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแปลกปลอมที่ไม่พึงประสงค์ติดรวมมาด้วย เช่น ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นโดยเฉพาะแบคทีเรีย (Carroll and Charo, 2015) ยีนต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ซึ่งใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (selectable markers) เพื่อให้ได้ต้นพืชที่ได้รับการถ่ายฝากยีนจนสำเร็จ

กระนั้นก็ตาม เมื่อสิบกว่าปีที่ผ่านมานี้ มีการคิดค้นเทคนิคการปรับแต่งจีโนม (genome editing) ทำให้สามารถปรับเปลี่ยนลำดับข้อมูลทางพันธุกรรมในจีโนมพืชได้อย่างแม่นยำ เป็นเทคนิคการปรับแต่งจีโนมที่นำไปสู่การปฏิวัติพลิกโฉมกระบวนการพัฒนาพันธุ์พืชใหม่ๆ ในยุคนี้ (Gaj *et al*., 2013) เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวช่วยให้นักวิจัยและนักปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมและเร่งรัดการพัฒนาพันธุ์พืชใหม่ๆ ได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น ด้วยประสิทธิภาพและความแม่นยำของเครื่องมือ และเป็นเทคนิคที่สูงกว่าเทคโนโลยียุคก่อนหน้านี้ จึงทำให้นักวิจัยยุคปัจจุบันหันมานิยมใช้เทคนิคการปรับแต่งจีโนมในการพัฒนาพันธุ์พืชใหม่มากขึ้นเรื่อยๆ

สถานการณ์การผลิตพืชที่พัฒนาขึ้นมาด้วยเทคโนโลยีชีวภาพในปัจจุบัน

ปัจจุบันพืชพันธุ์ใหม่ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ ที่เรียกว่า “พืชไบโอเทค” (biotech crops) ได้นำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมในหลายประเทศมานานกว่าสองทศวรรษแล้ว ทั้งนี้หน่วยงาน International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) ซึ่งเป็นองค์กรไม่แสวงหาผลกำไร ที่เน้นการแลกเปลี่ยนข้อมูล การเสริมสร้างสมรรถนะ และการสร้างความร่วมมือด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพระหว่างผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย โดยเฉพาะเกษตรกรผู้มีรายได้น้อยในประเทศกำลังพัฒนา ได้สรุปข้อมูลสถานการณ์การผลิตพันธุ์พืชไบโอเทคไว้ดังนี้ นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 ได้มีการปลูกพืชไบโอเทคมากกว่า 30 ประเทศทั่วโลก คิดเป็นพื้นที่สะสมกว่า 16,875 ล้านไร่ (ISAAA, 2021) เฉพาะปี พ.ศ. 2561 พื้นที่ปลูกพืชไบโอเทคทั่วโลกมีประมาณ 1,200 ล้านไร่ และเมื่อปี พ.ศ. 2562 เกษตรกรรายย่อยมากกว่า 17 ล้านคน และสมาชิกในครัวเรือนรวมแล้วประมาณ 65 ล้านคน ได้รับประโยชน์จากการปลูกพืชที่พัฒนาด้วยเทคโนโลยีดังกล่าว

เมื่อปี พ.ศ. 2562 ในทวีปอเมริกาเหนือ ประเทศสหรัฐอเมริกานับเป็นผู้ผลิตพืชไบโอเทครายใหญ่ของโลก

คิดเป็นร้อยละ 37.6 ของพื้นที่ปลูกพืชไบโอเทคทั้งโลก พืชที่ปลูกมีหลากหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง ฝ้าย ถั่วอัลฟัลฟา คาโนลา หัวบีท มะละกอ มันฝรั่ง สควอช แอปเปิล เป็นต้น ในประเทศแคนาดา พันธุ์พืชน้ำมันคาโนลาที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายถึงร้อยละ 95 ในแถบลาตินอเมริกามีมากกว่า 10 ประเทศที่ปลูกพันธุ์พืชไบโอเทค เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง ฝ้าย อ้อย เป็นต้น โดยบราซิลเป็นประเทศกำลังพัฒนาที่มีการปลูกพืชไบโอเทคในอันดับต้นๆ ของโลก ในทวีปยุโรป ประเทศสเปนและโปรตุเกสปลูกข้าวโพดไบโอเทค โดยสเปนเป็นประเทศที่มีการปลูกพันธุ์ข้าวโพดไบโอเทคมากที่สุดในยุโรป สำหรับทวีปแอฟริกามีประเทศแอฟริกาใต้ ซูดาน และเอสวาตินี ที่ปลูกพืชไบโอเทคจำพวกข้าวโพด ถั่วเหลือง และฝ้ายมาก่อนหน้านี้แล้ว และในปี พ.ศ. 2562 มาลาวี เอธิโอเปีย และไนจีเรีย เป็น 3 ประเทศใหม่ที่เริ่มปลูกฝ้ายดัดแปรพันธุกรรม (*Bt* cotton) เป็นครั้งแรก ส่วนในทวีปเอเชีย ประเทศจีนปลูกฝ้ายและมะละกอที่เป็นพืชไบโอเทค นอกจากนี้ มีเวียดนามและฟิลิปปินส์ปลูกข้าวโพดไบโอเทค อินโดนีเซียปลูกอ้อยไบโอเทค และอินเดียเป็นผู้ผลิตพืชไบโอเทครายใหญ่ของเอเชีย โดยมีเกษตรกรกว่า 6 ล้านคนที่ปลูกฝ้ายดัดแปรพันธุกรรม ในพื้นที่กว่า 74 ล้านไร่

พันธุ์พืชไบโอเทค 5 อันดับแรกของโลก

1) ถั่วเหลืองไบโอเทค เริ่มปลูกเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2539 รวมพื้นที่ปลูกในปี พ.ศ. 2561 มีประมาณ 600 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 78 ของพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองทั้งโลก ซึ่งมีประมาณ 770 ล้านไร่ โดยปลูกใน 9 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา บราซิล อาร์เจนตินา ปารากวัย แคนาดา อุรุกวัย โบลิเวีย แอฟริกาใต้ และชิลี ปัจจุบันมีการอนุญาตให้นำเข้าได้ 18 ประเทศ ทั้งนี้สหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตถั่วเหลืองรายใหญ่ที่สุด และบราซิลเป็นประเทศผู้ส่งออกรายใหญ่ที่สุดของโลก

2) ข้าวโพดไบโอเทค เริ่มปลูกเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 พื้นที่ปลูกในปี พ.ศ. 2561 ประมาณ 370 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 30 ของพื้นที่ปลูกข้าวโพดทั้งโลกซึ่งมีประมาณ 1,230 ล้านไร่ มีการปลูกใน 14 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา บราซิล อาร์เจนตินา ปารากวัย แคนาดา อุรุกวัย แอฟริกาใต้ ชิลี ฮอนดูรัส โคลอมเบีย โปรตุเกส สเปน ฟิลิปปินส์ และเวียดนาม ปัจจุบันมีการอนุญาตให้นำเข้าได้ 15 ประเทศ

3) ฝ้ายไบโอเทค เริ่มปลูกเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 พื้นที่ปลูกใน ปี พ.ศ. 2561 มีประมาณ 155 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 76 ของพื้นที่ปลูกฝ้ายทั้งโลกซึ่งมีประมาณ 205 ล้านไร่ มีการปลูกใน 15 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา บราซิล อาร์เจนตินา ปารากวัย อินเดีย จีน ปากีสถาน แอฟริกาใต้ ออสเตรเลีย เมียนมาร์ ซูดาน เม็กซิโก โคลอมเบีย คอสตาริกา และเอสวาตินี ปัจจุบันมีการอนุญาตให้นำเข้าได้ 8 ประเทศ โดยอินเดียนับเป็นประเทศผู้ผลิตฝ้ายรายใหญ่ที่สุดของโลก มีเกษตรกรผู้ปลูกฝ้ายประมาณ 7.5 ล้านคน

4) คาโนลาไบโอเทค เริ่มปลูกเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 พื้นที่ปลูกใน ปี พ.ศ. 2561 มีประมาณ 63 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 29 ของพื้นที่ปลูกคาโนลาทั้งโลกซึ่งมีประมาณ 216 ล้านไร่ มีการปลูกใน 4 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย และชิลี ปัจจุบันมีการอนุญาตให้นำเข้าได้ 10 ประเทศ โดยแคนาดานับเป็นประเทศผู้ผลิตคาโนลารายใหญ่ที่สุดของโลก มีพื้นที่ปลูกประมาณ 54 ล้านไร่ พันธุ์คาโนลาไบโอเทคเริ่มเป็นที่ต้องการปลูกของเกษตรกรมากขึ้น เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นได้ร้อยละ 15-20 ผลผลิตมีคุณภาพดีขึ้น เนื่องจากมีปริมาณลิกนินต่ำลงและถูกย่อยได้สูง (high digestibility)

5) อัลฟัลฟาไบโอเทค เริ่มปลูกเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 พื้นที่ปลูกใน ปี พ.ศ. 2561 มีประมาณ 8 ล้านไร่ มีการปลูกใน 2 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา และแคนาดา ปัจจุบันมีการอนุญาตให้นำเข้าได้ 5 ประเทศ

เครื่องมือและเทคนิคสำหรับใช้ในการปรับแต่งจีโนม

เครื่องมือหรือเทคนิคการปรับแต่งจีโนมยุคใหม่ที่ถูกพัฒนาขึ้น มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า genome editing with engineered nuclease (GEEN) technology (Kamburova *et al*., 2017) ใช้หลักการตัดย่อยและเชื่อมกลับเข้าหากันใหม่ของเส้นดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง เพื่อให้การปรับแต่งแก้ไขข้อมูลพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดสืบต่อไปยังรุ่นต่อไปได้ ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการออกแบบเอนไซม์ตัดย่อยสารพันธุกรรม (nucleases) เพื่อให้สามารถย่อยสารพันธุกรรมที่มีขนาดใหญ่และซับซ้อนตรงตำแหน่งเฉพาะเจาะจงได้ดี ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวประกอบด้วย

โครงสร้าง 2 ส่วน โดยที่โครงสร้างส่วนแรกทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการตัดย่อยเส้นดีเอ็นเอ และโครงสร้างส่วนที่สองทำหน้าที่เลือกตำแหน่งที่จะเข้าจับกับเส้นดีเอ็นเอแล้วทำหน้าที่ตัดย่อยเส้นดีเอ็นเอให้ขาดออกจากกัน เอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมที่ได้รับการออกแบบนี้ สามารถสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ได้โดยใช้พาหะ (vector) ที่ได้รับการออกแบบให้สามารถถอดรหัสเอนไซม์ดังกล่าวภายในนิวเคลียสของเซลล์เป้าหมาย เพื่อทำหน้าที่ตัดย่อยเส้นดีเอ็นเอในนิวเคลียสได้ตามต้องการ (Jankele and Svoboda, 2014; Palpant and Dudzinski, 2013)

เอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมแบบตัดจำเพาะเป็นประโยชน์อย่างมากกับนักวิจัยในการปรับแต่งแก้ไขข้อมูลทางพันธุกรรมบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตได้แทบทุกชนิด เทคโนโลยีหรือเทคนิคที่อาศัยเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมแบบตัดจำเพาะเป็นหลัก ช่วยให้นักวิจัยสามารถปรับแต่งจีโนมได้ อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Bortesi and Fischer, 2015; Gaj *et al*., 2016; Kamburova *et al*., 2017) ได้แก่

1) Zinc finger nucleases (ZFNs) เป็นเครื่องมือสำหรับการปรับแต่งจีโนมที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นอันดับแรก โดยการสังเคราะห์เอนไซม์ตัดย่อยสารพันธุกรรมที่มีโครงสร้างของ zinc finger domain ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 30 ตัว และมีการพับซ้อนโครงสร้างให้อยู่ในรูปแบบ $\beta\beta\alpha$ ซึ่งทำหน้าที่จับกับเส้นดีเอ็นเอสายคู่ โดยมีรหัสจดจำเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะ 3 ตัว (Cathomen and Keith Joung, 2008; Kim *et al*., 1996; Pabo *et al*., 2001; Pavletich and Pabo, 1991; Petolino, 2015)

เอนไซม์ ZFNs ประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วน โดยที่ส่วนแรกที่เป็น zinc finger domain อยู่ทางปลายด้าน N-terminal และโครงสร้างส่วนที่สองเป็นส่วนของเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมชนิด *Fok*I ทางปลายด้าน C-terminal (Jankele and Svoboda, 2014; Palpant and Dudzinski, 2013) นับตั้งแต่ที่มีการค้นคว้าพัฒนาเครื่องมือสำหรับปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค ZFNs เมื่อปี พ.ศ. 2539 ก็ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตหลายชนิด รวมทั้งพืชด้วย (Gaj *et al*., 2013)

2) Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) นักวิจัยได้พัฒนาเทคนิคการปรับแต่งจีโนมให้มีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และได้ค้นพบโปรตีนชนิดหนึ่ง ที่เรียกว่า transcription activator-like effector (TALE) proteins โดยได้อธิบายกลไกการทำหน้าที่เข้าจับกับเส้นดีเอ็นเอของโปรตีน TALE เป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2550 (Rŏmer *et al*., 2007)

องค์ประกอบของโปรตีน TALE มี 3 ส่วน คือ โครงสร้างส่วนที่เรียกว่า central repeat domain (CRD) ทำหน้าที่จดจำตำแหน่งเป้าหมายจำเพาะและเข้าจับกับเส้นดีเอ็นเอ โครงสร้างส่วนที่สองทำหน้าที่นำพาเอนไซม์เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ และโครงสร้างส่วนที่สามกระตุ้นการทำหน้าที่ของโปรโมเตอร์เพื่อถอดรหัสพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย (Schornack *et al*., 2006) เมื่อนำโปรตีน TALE มาทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมที่สังเคราะห์ขึ้น เรียกว่า transcription activator-like effector nucleases (TALENs) และสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการปรับแต่งจีโนมได้ (Jankele and Svoboda, 2014)

3) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) เป็นเทคนิคสำหรับการปรับแต่งจีโนมที่ถูกพัฒนาขึ้นมาในยุคใหม่และเป็นที่นิยมกันมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะเทคนิค CRISPR/Cas9 ซึ่งมีโปรตีน Cas9 เป็นองค์ประกอบ เทคนิคการปรับแต่งจีโนมนี้ดัดแปลงมาจากระบบภูมิคุ้มกันการเข้าทำลายเซลล์ของแบคทีเรียโดยเชื้อไวรัส กลไกการทำงานของเทคนิคนี้อาศัยตำแหน่งของ CRISPR ที่อยู่บนจีโนมของแบคทีเรีย ซึ่งมีรหัสพันธุกรรมสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ Cas9 และต้องมีส่วนของจีโนมของไวรัสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ กัน ซึ่งได้แทรกเข้ามาอยู่ในจีโนมของแบคทีเรีย (Barrangou *et al*., 2007; Zhang *et al.,* 2014) ตำแหน่งนี้เรียกว่า protospacer (Bortesi and Fischer, 2015; Chen and Gao, 2015) เอนไซม์ Cas9 จะเข้าจับกับเส้นดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเป้าหมายได้เมื่อทำงานร่วมกับอาร์เอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 100 นิวคลีโอไทด์ที่เรียกว่า single guide RNA (sgRNA)

เทคนิค CRISPR ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับแต่งจีโนมมากที่สุด ได้แก่ ระบบ CRISPR/Cas type II-A ค้นพบในแบคทีเรีย *Streptococcus pyogenes* ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องด้วย 3 ยีน คือ (1) ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์อาร์เอ็นเอ CRISPR RN (crRNA) (2) ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์

อาร์เอ็นเอ trans-activating crRNA (tracrRNA) และ (3) ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน Cas9 จากข้อมูลเหล่านี้ นักวิจัยจึงได้คิดค้นเทคนิคการปรับแต่งจีโนมด้วยระบบ “CRISPR/Cas” ขึ้นมา (Doudna and Charpentier, 2014)

เทคโนโลยีหรือเทคนิคที่ใช้ในการปรับแต่งจีโนมแต่ละกลุ่มให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกัน สำหรับบทความปริทัศน์นี้จะเน้นถึงเทคนิคในกลุ่ม CRISPR/Cas9 เท่านั้น ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ปรับแต่งจีโนมด้วยการทำให้เกิดการตัดย่อยเส้นดีเอ็นเอสายคู่ตรงที่ตำแหน่งเฉพาะเจาะจง (DNA double strand breaks, DSBs) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเทียบกับอีก 2 เทคนิค ในแง่ของความสะดวก เรียบง่าย มีความคล่องตัวในการใช้งาน การเข้าถึงเทคโนโลยี ต้นทุนค่าใช้จ่าย รวมถึงประสิทธิภาพการทำงาน ทำให้ปัจจุบันนักวิจัยส่วนมากนิยมใช้ในการปรับแต่งจีโนมของพืช

เทคนิคการปรับแต่งจีโนมทำให้เกิดการตัดเส้นดีเอ็นเอสายคู่ตรงตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง ด้วยเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมที่สามารถตั้งโปรแกรมเบื้องต้น (programmable nucleases) ให้ย่อยตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเฉพาะเจาะจงเท่านั้น จากนั้นจึงทำให้เกิดกระบวนการซ่อมแซมเส้นดีเอ็นเอที่เสียหายชำรุดจากการตัดด้วยกลไกที่มีภายในเซลล์อยู่แล้ว ซึ่งมีอยู่ 2 กลไก (Bortesi and Fischer, 2015; Puchta, 2005) คือ

(1) เมื่อเส้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดออก ได้ถูกเชื่อมกลับเข้าหากันด้วยกลไกที่เรียกว่า non-homologous end joining (NHEJ) pathway ซึ่งเกิดการเพิ่มขึ้น (insertion) หรือการขาดหายไป (deletion) ของลำดับเบสจำนวนหนึ่งตรงตำแหน่งที่เชื่อมกลับของเส้นดีเอ็นเอ หากตำแหน่งที่เกิดกระบวนการ DSBs อยู่ในช่วงลำดับเบสที่บรรจุรหัสพันธุกรรม ผลลัพธ์ที่จะเป็นการสูญเสียการทำหน้าที่ของยีน (loss-of-function) เทคนิคนี้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์แบบย้อนกลับหรือที่เรียกว่า reverse genetics ซึ่งใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจ หรือใช้กำจัดลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ออกจากพันธุ์พืชที่ต้องการปรับปรุง

(2) หากเส้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดออกถูกเชื่อมกลับเข้าหากันด้วยกลไกที่เรียกว่า homology-directed repair (HDR) ซึ่งมีความแม่นยำกว่า แต่จำเป็นต้องมีเส้นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีลำดับเบสคู่สมที่สามารถจับเข้าคู่กับลำดับเบสของเส้นดีเอ็นเอตรงช่วงก่อนและหลังตำแหน่ง DSBs ที่ถูกตัดออก (Gorbunova and Levy, 1999) ซึ่งกระบวนการนี้สามารถทำได้ทั้งการปรับแต่งข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนที่มีอยู่เดิมในจีโนม หรือการเพิ่มเติมยีนใหม่เข้าสู่จีโนมในตำแหน่งที่ต้องการด้วยความแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Fig. 1)

การปรับแต่งจีโนมด้วยเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมชนิด CRISPR/Cas9 จะตัดเส้นดีเอ็นเอสายคู่ตรงตำแหน่งเฉพาะเจาะจง ต่อมาเส้นดีเอ็นเอสายคู่ที่ถูกตัดขาด จะถูกซ่อมแซมให้เชื่อมกลับเข้าหากันใหม่ด้วยกลไก 2 แบบ คือ 1) non-homologous end joining (NHEJ) pathway และ 2) homology-directed repair (HDR) ผลลัพธ์ที่ได้เป็นการขาดหายไป หรือการเพิ่มขึ้นมาของลำดับนิวคลีโอไทด์ การเพิ่มยีนใหม่เข้าสู่จีโนม หรือการสลับเปลี่ยนอัลลีลที่พึงประสงค์ซึ่งการทำหน้าที่ของ CRISPR/Cas9 จะมีอาร์เอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 100 นิวคลีโอไทด์ ที่เรียกว่า single guide RNA (sgRNA) ช่วยทำหน้าที่ sgRNA มีองค์ประกอบโมเลกุลเป็น crisprRNA (crRNA) และ trans-acting crisprRNA (tracrRNA) (ดัดแปลงจาก Mishra, *et al.,* 2021)

การตัดเส้นดีเอ็นเอสายคู่ตรงตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง (DSBs) เกิดขึ้นได้เมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรม ที่สามารถตั้งโปรแกรมเบื้องต้นให้ย่อยตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเฉพาะเจาะจงเท่านั้น Cas9 เป็นเอนไซม์ที่พบอยู่ในจุลินทรีย์ *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) เป็นเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการปรับแต่งจีโนมพืช Cas9 เป็นโมโนเมอริกที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เพียงสายเดียว ที่มีการจัดเรียงโครงสร้างเชิงซ้อนในรูปของไรโบนิวคลีโอโปรตีน (RNP) โดยทำหน้าที่ร่วมกับ single guide RNA (sgRNA) ซึ่งเป็นโมเลกุลอาร์เอ็นเอสังเคราะห์ที่ใช้ในการปรับแต่งจีโนมที่มีความจำเพาะสูง

เนื่องจาก sgRNA มีลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20 เบส สามารถเข้าคู่ได้กับลำดับเบสของจีโนมเป้าหมายตรงตำแหน่งของ protospacer เอนไซม์ Cas9 มีโครงสร้างบริเวณที่ทำหน้าที่ตัดเส้นดีเอ็นเอสายคู่ของจีโนมเป้าหมายตรงตำแหน่งลำดับเบสที่สามก่อนถึง

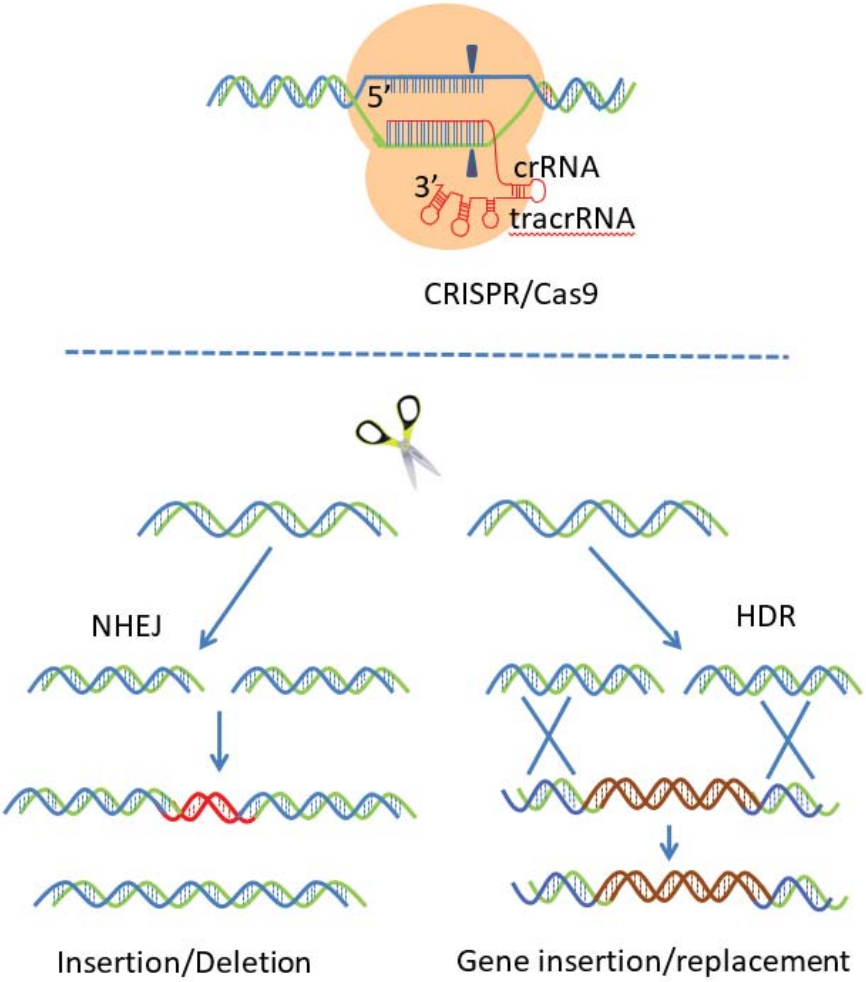

Fig. 1 Genome editing with CRISPR/Cas9 nuclease

protospacer เรียกว่า protospacer-adjacent motif (PAM) ทำให้เกิดเส้นดีเอ็นเอปลายทู่ (blunt ends) (Gasiunas *et al.,* 2012) มีการศึกษา พบว่า ตำแหน่งเป้าหมายสำหรับเอนไซม์ Cas9 ที่ทำหน้าที่ตัดเส้นดีเอ็นเอในจีโนมของพืชทั้งใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ มีอยู่ 1 ตำแหน่งในทุกๆ 100 ลำดับเบส (Xie *et al*., 2014) จึงทำให้โอกาสที่จะพบตำแหน่งพันธุกรรมที่มีความจำเพาะเจาะจงจึงเป็นไปได้มาก แม้แต่ในพืชที่มีขนาดจีโนมใหญ่และซับซ้อน เช่น ข้าวโพด เป็นต้น

สำหรับความจำเพาะเจาะจงในการปรับแต่งจีโนมของเทคนิค CRISPR/Cas9 ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของลำดับเบสตรงบริเวณ protospacer ซึ่งสามารถปรับแต่งแก้ไขได้ด้วยกระบวนทางชีวโมเลกุลมาตรฐานทั่วไป (Mali *et al*., 2013) จากความสะดวกคล่องตัวในการนำไปประยุกต์ใช้งาน ทำให้เทคนิค CRISPR/Cas9 เป็นที่นิยมในหมู่นักวิจัยการปรับแต่งจีโนมในพืชหลายชนิด และเทคนิคนี้ยังสามารถนำไปใช้ปรับแต่งจีโนมพืชทีละหลายๆ ตำแหน่งได้ในคราวเดียว โดยการใช้ sgRNAs หลายชนิดในคราวเดียวกัน (Vazquez-Vilar *et al*., 2016; Xie *et al*., 2015; Xing *et al*., 2014) มีการวิจัยพิสูจน์ให้เห็นว่าการปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 มีประสิทธิภาพสูงมากในธัญพืช และพืชอีกหลายชนิด (Zhu *et al.,* 2017) โดยทั่วไปแล้วการปรับแต่งจีโนมตรงบริเวณ 2 ตำแหน่งของยีนใดยีนหนึ่งช่วยเพิ่มความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ (Xie *et al*., 2015) และการพัฒนาต้นกลายพันธุ์ให้อยู่ในสภาพพันธุ์แท้ (homozygous mutants) สามารถทำได้ภายในเพียง 1 รุ่นประชากรเท่านั้น (Brooks *et al*., 2014)

นอกจากนี้ การที่เอนไซม์ Cas9 ตัดเส้นดีเอ็นเอทำให้เกิดเป็นปลายทู่ เมื่อเกิดกระบวนการซ่อมแซมเส้นดีเอ็นเอมักเกิดการขาดหายไป หรือการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสขนาดเล็ก (small indels) ซึ่งเป็นขนาดเพียง 1 ลำดับเบสเท่านั้น

จึงทำให้เกิดการขยับเลื่อนไปของรหัสพันธุกรรม (frameshift mutants) หากตำแหน่งเป้าหมายอยู่ในจีโนมบริเวณ exon ที่มีรหัสพันธุกรรมบรรจุอยู่ (Bortesi *et al.*, 2016)

ผลที่ได้รับจากการปรับแต่งจีโนม

นักวิจัยได้จัดกลุ่มของผลลัพธ์ที่เกิดจากการปรับแต่งจีโนมด้วยเครื่องต่างๆ เป็น 5 กลุ่ม (Jansing *et al*., 2019) คือ (1) การเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับเบสแบบสุ่ม (random indel formation) (2) การขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเป้าหมาย (targeted fragment deletion) (3) การสลับเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide exchange) (4) การจัดเรียงตำแหน่งใหม่ของสารพันธุกรรมบนจีโนม (genomic rearrangements) และ (5) การเพิ่มยีนใหม่เข้าไปและการแลกเปลี่ยนยีนในจีโนม (gene insertion/gene exchange)

1. การเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับเบสแบบสุ่ม (random indel formation)

การชักนำให้เกิดการตัดย่อยเส้นดีเอ็นเอสายคู่ (DSBs) เพียง 1 ตำแหน่งในจีโนมของพืชชั้นสูง มักจะเกิดการขาดหายไปหรือการเพิ่มขึ้นมาของลำดับเบส (indels) บริเวณใกล้กับตำแหน่งที่ถูกตัดย่อย หาก indels ถูกชักนำด้วยกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบ NHEJ เป็นผลทำให้เกิดการขยับเลื่อนไปของรหัสพันธุกรรม ซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้น 2 ใน 3 ส่วน หาก DSBs เกิดขึ้นในบริเวณยีนที่บรรจุรหัสทางพันธุกรรมไว้ เมื่อถอดรหัสพันธุกรรมเพื่อสร้างเป็นอาร์เอ็นเอ เป็นผลให้อาร์เอ็นเอนั้นมีตำแหน่งรหัสหยุดกระบวนการทำหน้าที่ก่อนที่ควรจะเป็น (premature termination codon, PTC) ส่งผลให้การแสดงออกของยีนบกพร่อง หรือถูกยับยั้งไม่ให้ทำหน้าที่ (Kertész *et al*., 2006) จึงเป็นกระบวนการปรับแต่งจีโนมที่เรียบง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน โดยเฉพาะเครื่องมือปรับแต่งจีโนมด้วยระบบ CRISPR/Cas ที่มีความบกพร่องหรือการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมาย

อนึ่ง การคัดเลือกพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรู เป็นวัตถุประสงค์สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมแบบตัดจำเพาะเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการปรับแต่งจีโนม เพื่อตอบสนองวัตถุประสงค์นี้ได้เป็นอย่างดี มีการวิจัยใช้ระบบ CRISPR/Cas9 ปรับแต่งจีโนมของพืชตระกูลแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) เพื่อยับยั้งการทำหน้าที่ของยีน eIF4E (translational initiation factor) ซึ่งก่อให้เกิดโรคในต้นพืชของเชื้อไวรัส ผลลัพธ์ที่ได้ คือ พันธุ์แตงกวาที่มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสที่หลากหลาย (Chandrasekaran *et al*., 2016) นอกจากนี้ ระบบ CRISPR/Cas9 ยังถูกนำมาใช้ปรับแต่งจีโนมในพืชส้มตระกูล Wanjincheng (*Citrus sinensis* Osbeck) โดยการปรับแต่งพันธุกรรมตรงตำแหน่งของโปรโมเตอร์ของยีนอ่อนแอ CsLOB1 ได้ส้มพันธุ์ใหม่ที่มีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคแคงเกอร์ (Peng *et al*., 2017)

2. การขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเป้าหมาย (targeted fragment deletion)

การทำให้เกิดการย่อยเส้นดีเอ็นเอสายคู่ (DSBs) มากกว่า 1 ตำแหน่งในบริเวณยีนเดียวกัน ทำให้เกิดการขาดหายไปของเส้นดีเอ็นเอตรงตำแหน่งยีนเป้าหมาย และระบบ CRISPR/Cas9 ซึ่งสะดวกและมีความคล่องตัวมากสำหรับใช้ปรับแก้จีโนมตามวัตถุประสงค์ เนื่องจากคุณสมบัติในการตัดเส้นดีเอ็นเอสายคู่ได้คราวละหลายตำแหน่ง (multiplexing) ข้อได้เปรียบของการปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิคนี้มี 2 ประการ คือ (1) เมื่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ถูกขจัดออกไป ทำให้โอกาสยับยั้งการทำหน้าที่ของยีนเป้าหมายเป็นไปได้มาก และ (2) การวิเคราะห์ผลสำเร็จของการปรับแต่งจีโนมด้วยเทคนิคดังกล่าว สามารถทำได้โดยสะดวกด้วยวิธีการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้นตามวิธีการ gel electrophoresis โดยไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อเปรียบเทียบรายละเอียด ส่วนข้อด้อยของเทคนิคนี้ คือ ความถี่ของการตัดย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพการทำหน้าที่ของเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมแบบตัดจำเพาะ ซึ่งบ่อยครั้งที่ผลของการตัดย่อยมักจะเป็น indels ที่อาจเกิดขึ้นที่ตำแหน่งที่ถูกตัดย่อยด้านใดด้านหนึ่ง หรืออาจเกิดขึ้นทั้งสองด้าน แทนที่จะเกิดการตัดย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ตามวัตถุประสงค์ นอกจากนี้ การเพิ่มปริมาณของ sgRNA อาจเพิ่มโอกาสเกิดการตัดย่อยตรงตำแหน่งนอกเหนือเป้าหมาย

ตัวอย่างความสำเร็จของการใช้เทคนิคนี้ในการปรับแต่งจีโนม คือ กรณีที่ทีมนักวิจัยของ Pioneer Hi-Bred ได้

ใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ในการยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ GBSSI ในข้าวโพดสายพันธุ์ดีด้วยการขจัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ตรงบริเวณตำแหน่งของยีน Wx1 โดยใช้ sgRNA 2 ชนิด (Cigan *et al*., 2017) นอกจากนี้ มีการวิจัยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ขจัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 48 เบส ออกไปจากส่วนของยีน Mlo1 ในมะเขือเทศ โดยใช้ sgRNA 2 ชนิดเช่นกัน ผลที่ได้คือมะเขือเทศพันธุ์ใหม่ที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *Oidium neolycopersici* สาเหตุของโรคราแป้งในมะเขือเทศ (Nekrasov *et al*., 2017)

3. การสลับเปลี่ยนชนิดนิวคลีโอไทด์ (targeted nucleotide exchange)

กลไกการสลับเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์อย่างแม่นยำ (หากเกิดขึ้นโดยกลไกการรวมตัวกันใหม่ของดีเอ็นเอหรือชิ้นส่วนโครโมโซมที่คล้ายคลึงกัน เรียกว่า การเกิด gene conversion หรือ allele replacement) นอกจากสามารถนำไปใช้เพื่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (gene knockout) ด้วยการเติมรหัสหยุดตรงตำแหน่งก่อนที่ควรจะเป็น ยังสามารถนำไปใช้เพื่อกระตุ้นให้ยีนที่ไม่เคยแสดงออกได้เริ่มทำหน้าที่ (gain-of-function) หรือใช้เพื่อควบคุมระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายได้ (regulatory mutations) เทคนิค CRISPR/Cas9 ถูกนำมาใช้ในการทำให้เกิดกลไกการสลับเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์ของยีน ALS2 ในข้าวโพด เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่ง จาก proline ให้เป็น serine ตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนลำดับที่ 165 และได้พันธุ์ใหม่ที่มีความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช chlorsulfuron (Svitashev *et al*., 2016)

4. การจัดเรียงตำแหน่งใหม่ของสารพันธุกรรมบนจีโนม (genomic rearrangements)

การตัดย่อยเส้นดีเอ็นเอสายคู่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจนทำให้เกิด DSBs ตรงยีนเดียวกันได้ 2 ตำแหน่ง เกิดการขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ดังที่กล่าวแล้ว หากตำแหน่งที่เกิด DSBs อยู่ห่างกัน บนโครโมโซมเดียวกันอาจเกิดการขาดหายของโครโมโซมบางส่วน (cytogenetic deletion) ทำให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรม หรืออาจเกิดการผกผันสลับขั้วของชิ้นส่วนโครโมโซม (inversion) แต่หากตำแหน่งการเกิด DSBs อยู่บนคนละโครโมโซม ก็จะทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายเปลี่ยนตำแหน่งของชิ้นส่วนโครโมโซม (translocation) ขึ้นมาได้ แม้ว่าความถี่ของการจัดเรียงตำแหน่งใหม่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเออาจเกิดได้ไม่บ่อยนัก แต่นักปรับปรุงพันธุ์พืชก็สนใจใช้ประโยชน์จากกลไกนี้เช่นกัน โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการขจัดเอากลุ่มยีนที่ไม่พึงประสงค์ออกไปจากโครโมโซมทีละหลายๆ ยีนในคราวเดียว หรือในกรณีที่ต้องการสร้างความเชื่อมโยงกัน (gene linkages) ระหว่างยีนที่ควบคุมลักษณะที่พึงประสงค์เพื่อให้สามารถถูกถ่ายทอดไปสู่ประชากรรุ่นลูกได้พร้อมๆ กัน หรือในทางตรงกันข้าม เพื่อขจัดความเชื่อมโยงกันระหว่างยีนที่ควบคุมลักษณะที่พึงประสงค์ออกจากยีนที่ควบคุมลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ เพื่อไม่ให้ถูกถ่ายทอดไปสู่ประชากรรุ่นลูกด้วยกัน

นอกจากนี้ กลไกการจัดเรียงตำแหน่งใหม่ของชิ้นส่วนโครโมโซม อาจนำมาใช้ประโยชน์ในกรณีที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการจากพืชพันธุ์พื้นเมืองเข้าสู่ฐานพันธุกรรมของพันธุ์ดีเด่น ที่ต้องการปรับปรุงเพียงบางลักษณะเพิ่มเติมขึ้นมาอีก (Puchta, 2017) นักวิจัยได้ใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ทดลองขจัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ประมาณ 115-245 เบส ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มยีน 3 กลุ่มออกไปจากโครโมโซมของข้าว (Zhou *et al*., 2014)

5. การเพิ่มยีนใหม่เข้าไปและการแลกเปลี่ยนยีนในจีโนม (gene insertion/gene exchange)

การตัดย่อยเส้นดีเอ็นเอสายคู่จนทำให้เกิด DSBs ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเพิ่มเติมชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ รวมถึงการเพิ่มยีนที่สมบูรณ์ทั้งยีนเข้าสู่จีโนมได้ไม่ว่าจะด้วยกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกตัดขาดทั้งแบบ NHEJ หรือแบบ HDR ก็ตาม ซึ่งเทคนิคนี้ช่วยให้การเพิ่มเติมยีนใหม่เข้าสู่จีโนมด้วยความแม่นยำ มีการวิจัยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 เพื่อเพิ่มเติมชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ที่เป็นส่วนของโปรโมเตอร์ GOS2 PRO ที่ทำหน้าที่ได้ดีกว่า เพื่อเข้าไปแทนที่โปรโมเตอร์เดิมของยีน ARGOS8 ที่มีอยู่แล้วในจีโนมของข้าวโพด ได้ข้าวโพดพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงขึ้นและทนทานต่อสภาพแห้งแล้งในแปลงได้ดี (Shi *et al*., 2017)

ประโยชน์ของการปรับแต่งจีโนมในภาคเกษตรกรรม

Zaruk (2020) ได้สรุปข้อคิดเห็นของ Agnès Ricroch ซึ่งเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ด้าน Evolutionary

Genetics and Plant Breeding ที่มหาวิทยาลัย University of Paris-Saclay and Agro Paris Tech และเป็นสมาชิกองค์กร French Academy of Agriculture ได้กล่าวปาฐกถาในการประชุมแห่งหนึ่ง ถึงประโยชน์บางประการของเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมในภาคเกษตรกรรม ซึ่งสรุปประโยชน์ของการปรับจีโนมในส่วนที่เกี่ยวข้องทางด้านพืชได้ดังนี้

1) เป็นเทคโนโลยีที่มีค่าใช้จ่ายถูก ทำให้นักวิจัยจากทุกภาคส่วน ทั้งองค์กรเอกชนขนาดเล็ก องค์กรไม่หวังผลกำไร หรือหน่วยงานภาครัฐ สามารถเข้าถึงเทคโนโลยีได้และสร้างผลงานที่เป็นนวัตกรรมใหม่ๆ ขึ้นมาได้

2) การนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ ทำให้กลไกการปรับปรุงพันธุ์มีความแม่นยำ ช่วยให้นักวิจัยสามารถขจัดดีเอ็นเอส่วนที่ไม่พึงประสงค์ออกเป็นการช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ให้ดำเนินการได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

3) การปรับแต่งจีโนมมีอัตราการกลายพันธุ์ตรงนอกเหนือตำแหน่งเป้าหมายค่อนข้างต่ำ ด้วยเทคนิคการปรับแต่งจีโนมที่เฉพาะเจาะจง ทำให้โอกาสเกิดผลเชิงลบมีน้อย

4) ประหยัดเวลาในการพัฒนาพันธุ์พืชใหม่จากระยะเวลา 7-25 ปี ด้วยวิธีการมาตรฐานดั้งเดิม ให้ลดเหลือเพียง 2-3 ปี ด้วยเทคนิคการปรับแต่งจีโนม

5) ลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช พันธุ์พืชใหม่ที่มีการปรับแต่งจีโนม ทำให้มีความต้านทานต่อศัตรูพืชได้ดีขึ้น เช่น พันธุ์มันสำปะหลังที่มีความต้านทานต่อโรคใบขีดสีน้ำตาลและไวรัสใบด่าง พันธุ์แอปเปิลที่สามารถต้านทานต่อโรคไหม้ (fire blight disease) พันธุ์มันฝรั่งที่สามารถต้านทานต่อโรคใบไหม้ (late blight disease) พันธุ์ส้มที่สามารถต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง (greening disease) เป็นต้น

6) พันธุ์พืชใหม่มีความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ช่วยเกษตรกรในการบริหารจัดการวัชพืชในพืชเศรษฐกิจได้ดียิ่งขึ้น เช่น ข้าว พืชน้ำมันคาโนลา แฟลกซ์ เป็นต้น

7) การปรับแต่งจีโนมทำให้ได้พันธุ์พืชใหม่ที่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ดีขึ้น เช่น อากาศร้อน น้ำท่วม ดินเค็ม ความแห้งแล้ง สภาพอากาศหนาวเย็น เป็นต้น ช่วยแก้ปัญหาความมั่นคงทางอาหารในบางพื้นที่ได้เป็นอย่างดี

8) ยกระดับประสิทธิภาพการผลิตในภาคการเกษตร เกษตรกรสามารถได้ผลผลิตมากขึ้นโดยใช้ปุ๋ย น้ำ และปัจจัยการผลิตอื่นๆ น้อยลง

9) ลดปริมาณการสูญเสียด้านอาหาร ผู้บริโภคสามารถรับประทานผลิตภัณฑ์จากพืช ผัก และผลไม้ได้เกือบทั้งหมด โดยไม่เหลือเป็นของเสีย เช่น ผลผลิตจากเห็ด แอปเปิล มันฝรั่ง ที่ได้รับการปรับแต่งจีโนม ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล (browning reactions) จนไม่น่าบริโภค

10) ยกระดับคุณค่าทางโภชนาการของผลผลิต ผู้บริโภคได้รับประโยชน์โดยตรง เช่น การปรับแต่งจีโนมให้พันธุ์มันฝรั่งมีปริมาณสารอะไครลาไมด์ในระดับต่ำ พันธุ์ข้าวสาลีให้มีปริมาณเส้นใยเพิ่มขึ้น พันธุ์ถั่วเหลืองให้มีปริมาณไขมันชนิดไม่อิ่มตัวมากขึ้น หรือพันธุ์ข้าวโพดที่มีคุณภาพแป้งดีขึ้น เป็นต้น

11) ความสะดวกและคล่องตัวของเทคโนโลยี ทำให้เกิดงานวิจัยที่ตอบโจทย์ความต้องการของพื้นที่ได้ดีขึ้น แทนการวิจัยในระดับกว้าง ซึ่งเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในแต่ละพื้นที่ที่มีหลากหลายประเด็นต่างกัน อาจมีข้อจำกัดได้

12) ตอบสนองความต้องการของสังคมเรื่องการผลิตอาหารเลี้ยงพลโลกอย่างยั่งยืน ด้วยการยกระดับผลผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และสามารถปรับตัวได้กับการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ

การปรับแต่งจีโนมในข้าวด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9

1. พันธุ์ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าว

วัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่สำคัญประการหนึ่ง คือ การพัฒนาพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูที่ทำให้เกิดความสูญเสียผลผลิต นักวิจัยได้ศึกษาทางพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกความต้านทานในข้าว ซึ่งมีวิวัฒนาการความต้านทานเกิดเป็นยีนต้านทาน (*R* genes) โดยมีกลไกทำให้โปรตีนหรือโมเลกุลอื่น เช่น เอฟเฟคเตอร์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อสาเหตุของโรคข้าว (pathogen derived virulence proteins or effectors) ทำให้ไม่เกิดโรคแก่ต้นข้าว ในทางตรงกันข้าม ข้าวบางพันธุ์มียีนอ่อนแอ (*S* genes) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับกลไกที่ช่วยให้เชื้อสาเหตุของโรคข้าวสามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ การประยุกต์ใช้เทคนิคปรับ

แต่งจีโนมเพื่อสร้างความต้านทานให้กับต้นข้าว อาศัยหลักการทำให้ยีนอ่อนแอไม่สามารถทำหน้าที่ต่อไปได้ (knocking out หรือ loss-of-function) หรืออาจทำการปรับแต่งจีโนมด้วยการเพิ่มเติมอัลลีลของยีนต้านทานเข้าสู่จีโนมตรงตำแหน่งเป้าหมายที่ต้องการ (knocking in *R* allele หรือ gain-of-function)

โรคขอบใบแห้ง (bacterial blight disease, BB) มีการวิจัยการปรับแต่งจีโนมข้าวเพื่อให้เกิดความต้านทานด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 โรคขอบใบแห้งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) โรคนี้มีความสำคัญมากเพราะอาจทำให้ผลผลิตข้าวเสียหายได้ถึงร้อยละ 75 โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกข้าวของทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทวีปแอฟริกา (Varshney *et al*., 2019) กลไกการทำให้เกิดโรคในต้นข้าวของเชื้อ *Xoo* คือการผลิตโปรตีนที่เรียกว่า TALEs โดยเข้าไปจับกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่เรียกว่า effector-binding elements (EBEs) ซึ่งอยู่ตรงบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *S* ในโครโมโซมของข้าว (Cohn *et al*., 2014) และโปรตีน TALEs จะกระตุ้นการทำงานของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนย้ายน้ำตาลของต้นข้าว (sugar transporting SWEET gene family) เพื่อให้มีการเคลื่อนย้ายน้ำตาลจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง ด้วยกระบวนการซึมผ่านช่องว่างภายนอกเยื่อหุ้มพลาสมาและช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เรียกว่า อะโพพลาสต์ (apoplast) เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารให้แก่เชื้อ *Xoo* ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง (Cohn *et al*., 2014) ซึ่งยีนเป้าหมายของโปรตีน TALEs ก็คือ ยีน *Os11N3* หรืออีกชื่อหนึ่ง คือ ยีน *OsSWEET14* ซึ่งเป็นยีนอ่อนแอของโรคขอบใบแห้งในข้าว (Antony *et al*., 2010; Hutin *et al*., 2015; Li *et al*., 2012) โดยมีการวิจัยปรับแต่งจีโนมข้าวพันธุ์ Kitaake ตรงตำแหน่ง EBEs ของยีน *OsSWEET14* ซึ่งรบกวนการทำงานของโปรตีน TALEs ได้ต้นข้าวที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* (Xu *et al*., 2019) นอกจากนี้ ยังมีการวิจัยปรับแต่งจีโนมข้าวตรงตำแหน่งของยีน *Os8N3* หรืออีกชื่อหนึ่งคือยีน *OsSWEET11* ได้ต้นข้าวที่มีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Xoo* โดยที่ลักษณะทางการเกษตรอื่นๆ ยังคงเดิม (Kim *et al*., 2019) และยังมีการวิจัยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ในการปรับแต่งจีโนมตรงตำแหน่ง EBEs ของยีน *OsSWEET11, OsSWEET13* และ *OsSWEET14* ของข้าวพันธุ์ Kitaake IR64 และ Ciherang-Sub1 ได้พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้ดียิ่งขึ้น โดยเป็นความต้านทานแบบ board spectrum (Olivia *et al*., 2019)

โรคไหม้ข้าว (rice blast disease) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตข้าวเสียหายมากถึงร้อยละ 30 ของผลผลิตข้าวทั้งโลก (Nalley *et al*., 2016) โดยมีเชื้อรา *Pyricularia oryzae* Cavara เป็นเชื้อสาเหตุของโรค นักวิจัยได้จำแนกยีนต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวได้มากกว่า 100 ยีน และได้โคลนยีนต้านทานได้ประมาณ 30 ยีน (Xiao *et al*., 2019) ยีนที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทาน ด้วยวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล และด้วยวิธีการถ่ายฝากยีน เช่น ยีน *Pi-ta/Pi-ta2, Pi-z Pi-b*, *Pi-k/h/m/s* เป็นต้น (Li *et al*., 2016b) ในระยะต่อมา มีการวิจัยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 เพื่อปรับแต่งจีโนมข้าวโดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ InDel ตรงตำแหน่งที่เป็นส่วนของยีน *OsERF922* ได้ต้นข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคไหม้ข้าวได้ดีขึ้น โดยมีลักษณะทางการเกษตรคงเดิม (Wang *et al*., 2016)

นอกจากนี้ ยังมีการวิจัยปรับแต่งจีโนมข้าวตรงตำแหน่งของยีน 3 ยีนในคราวเดียว ได้แก่ อัลลีลด้อยของยีนควบคุมความเป็นหมัน (*tms5*) อัลลีลอ่อนแอของยีนต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว (*pi21*) และอัลลีลอ่อนแอของยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (*xa13*) ได้ต้นข้าวที่มีลักษณะเรณูเป็นหมัน และมีความต้านทานต่อโรคไหม้ข้าวและโรคขอบใบแห้งได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในกระบวนการผลิตข้าวลูกผสม (Li *et al*., 2019)

2. การพัฒนาลักษณะทางการเกษตรของข้าว

การวิจัยด้านการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะทางการเกษตรเพื่อให้มีศักยภาพการให้ผลผลิตที่สูง เช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้นเตี้ย เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการหักล้ม การปรับแต่งจีโนมข้าวด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 ตรงตำแหน่งของยีน *OsGA20ox2* ได้ต้นข้าวที่มีใบธงสั้นลง มีปริมาณสาร gibberellins ลดลง และมีความสูงลดลง (Han *et al*., 2019) รวมทั้งมีการวิจัยปรับแต่งจีโนมข้าวตรงตำแหน่งของยีน *SD1* ได้ต้นข้าวที่มีความสูงลดลง ไม่หักล้มง่าย และให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น (Hu *et al*., 2019)

สำหรับลักษณะทางการเกษตรที่เกี่ยวกับการให้ผลผลิต เช่น รวงแน่นและชูตั้ง ที่ถูกควบคุมด้วยยีน *DEP1* ขนาดเมล็ด ที่ถูกควบคุมด้วยยีน *GS3* และจำนวนเมล็ดต่อรวง ที่ถูกควบคุมด้วยยีน *Gn1a* โดยวิจัยปรับแต่งจีโนมตรงตำแหน่งของยีนดังกล่าว ได้ต้นข้าวที่ชูรวง ขนาดเมล็ดใหญ่ขึ้น และจำนวนเมล็ดต่อรวงมากขึ้น ส่งผลให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น (Li *et al*., 2016a)

3. การพัฒนาคุณภาพการหุงต้มและรับประทานของข้าว

คุณภาพการหุงต้มและรับประทานเป็นวัตถุประสงค์สำคัญอีกประการหนึ่งในการพัฒนาให้ได้พันธุ์ข้าวใหม่ๆ คุณสมบัติทางเคมีของเมล็ดข้าวที่มีผลต่อคุณภาพการหุงต้มรับประทานเป็นอันดับต้นๆ ได้แก่ ปริมาณอมิโลส (amylose content, AC) ความคงตัวของแป้งสุก (gel consistency) และอุณหภูมิแป้งสุก (gelatinization temperature, GT) ซึ่งลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีน *Wx* (Zhang *et al.,* 2011) มีการวิจัยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ในการปรับแต่งจีโนมข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Xiushui134 และพันธุ์ Wuyunjing 7 ตรงตำแหน่งของยีน *Wx* ได้ต้นข้าวที่มีปริมาณอมิโลสในเมล็ดลดลง ทำให้คุณภาพการหุงต้มรับประทานดีขึ้น โดยไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางการเกษตรอื่นๆ (Zhang *et al*., 2018)

4. การพัฒนาพันธุ์ข้าวให้ทนทานต่อสภาพภูมิอากาศไม่เหมาะสม

การพัฒนาพันธุ์ข้าวเพื่อให้ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ เทคนิคการปรับแต่งจีโนมเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาพันธุ์ให้ทันกับเหตุการณ์ได้ มีการวิจัยค้นพบว่า กลไกความทนทานต่อสภาวะเครียด เช่น ความแห้งแล้ง โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า ABA signaling pathway (Budak *et al*., 2015) ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวมีหลายยีนด้วยกัน หนึ่งในยีนเหล่านั้น ได้แก่ ยีน *OsPYL9* ได้มีการวิจัยการปรับแต่งจีโนมข้าวตรงตำแหน่งของยีน *OsPYL9* ได้ต้นข้าวที่มีความทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดี เนื่องจากใบข้าวมีจำนวนปากใบน้อยลง และมีอัตราการคายน้ำลดลง (Usman *et al*., 2020) และมีการวิจัยการปรับแต่งจีโนมข้าวตรงตำแหน่งของยีน *OsSRL1* และ OsSRL2 ได้ต้นข้าวที่มีจำนวนปากใบน้อยลง อัตราการคายน้ำลดลง และลักษณะการม้วนใบ ซึ่งช่วยให้ทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดียิ่งขึ้น (Liao *et al*., 2019)

ข้อจำกัดของการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากการปรับแต่งจีโนม

1. ความกังวลเรื่องความปลอดภัยทางชีวภาพ

พันธุ์พืชใหม่ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาด้วยเทคนิคการปรับแต่งจีโนม มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์นอกเหนือตำแหน่งเป้าหมาย (nontarget effects) (Graham *et al*., 2020; Laliberte, 2020) ซึ่งเป็นผลจากการทำหน้าที่ของเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา ซึ่งประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงในการทำหน้าที่ของเอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมดังกล่าว เป็นสิ่งที่นักวิจัยให้ความสำคัญเป็นอย่างมาก เพื่อหลีกเลี่ยงโอกาสที่จะเกิดการกลายพันธุ์นอกตำแหน่งเป้าหมาย จึงต้องให้ความสำคัญกับขั้นตอนการคัดเลือกหาตำแหน่งที่มีความจำเพาะเจาะจง และมีความเป็นไปได้สูงที่เอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมจะเข้าจับกับสายดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเป้าหมายบนจีโนม ซึ่งเกี่ยวข้องกับค่า binding affinity ของเอนไซม์

ดังนั้น จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics analysis) ก่อนที่จะตัดสินใจเลือกตำแหน่งเป้าหมายเพื่อทำการปรับแต่งจีโนม ข้อควรระวัง คือ ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ กัน (repeated sequences) และตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับตำแหน่งอื่นบนจีโนม (high homology sequences) ทำให้มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์นอกเหนือตำแหน่งเป้าหมายได้สูง (Lombardo, *et al*., 2011)

2. กฎระเบียบ ข้อบังคับ เกี่ยวกับพันธุ์พืชที่พัฒนามาจากการปรับแต่งจีโนม

ในความเป็นจริง ถึงแม้ว่าพืชหรือสัตว์ที่ได้จากการปรับแต่งจีโนม มีการดัดแปลงแก้ไขรหัสพันธุกรรมแล้วก็ตาม แต่ก็มีความแตกต่างจากพันธุ์พืชดัดแปรพันธุกรรมหรือ GM crops ที่กำลังปลูกกันอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากพันธุ์พืช GM crops มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแปลกปลอมจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ถูกถ่ายฝากเข้าสู่ฐานพันธุกรรมของพันธุ์พืช GM crops นั้นๆ ในทางตรงกันข้าม พันธุ์พืชที่ได้จากการปรับแต่งจีโนมมีการดัดแปลงข้อมูลพันธุกรรมอย่างแม่นยำ โดยการยับยั้งการทำหน้าที่ของยีนเดิมที่มีอยู่แล้วในจีโนม หรือจากการสลับเปลี่ยน

อัลลีลของยีนที่มีอยู่เดิม ให้เป็นอัลลีลใหม่ที่พึงประสงค์มากกว่า

ด้วยเหตุผลดังกล่าว พันธุ์พืชและสัตว์ที่ได้จากการปรับแต่งจีโนมอาจมีฐานพันธุกรรมแทบจะไม่แตกต่างจากพันธุ์พืชหรือสัตว์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ตามกระบวนการมาตรฐานดั้งเดิม หรืออาจเหมือนกับกระบวนการที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (Carroll and Charo, 2015) ในกระบวนการปรับแต่งจีโนม หลังจากที่เอนไซม์ย่อยสารพันธุกรรมได้ทำหน้าที่เสร็จสิ้นแล้วก็จะถูกย่อยสลายไป จึงไม่มีสารเคมีหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอแปลกปลอมใดๆ ที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาในกระบวนการปรับแต่งจีโนมหลงเหลืออยู่ภายในเซลล์ การกำกับดูแลด้านความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชหรือสัตว์ที่ได้จากการปรับแก้พันธุกรรม จึงควรพิจารณาจากผลิตภัณฑ์อันเป็นผลลัพธ์สุดท้ายเป็นหลัก มากกว่าพิจารณาจากกระบวนการหรือเทคนิคที่ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์นั้น (Carroll and Charo, 2015)

ในภาพรวมแล้ว กฎระเบียบและข้อบังคับที่ใช้กำกับควบคุมดูแลสิ่งมีชีวิต GMOs แบ่งออกเป็น 2 ประเด็น คือ 1) พิจารณาจากกระบวนการ หรือเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิต และ 2) พิจารณาจากผลลัพธ์ หรือผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ออกมาเป็นหลัก สำหรับในสหภาพยุโรปจะพิจารณาจากกระบวนการผลิตเป็นหลัก ในขณะที่ประเทศแคนาดาพิจารณาจากการประเมินผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นผลลัพธ์สุดท้ายเป็นหลัก ส่วนประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ระบบที่ผสมผสานกัน โดยระหว่างการควบคุมกำกับดูแล ใช้หลักการพิจารณาจากกระบวนการผลิต แต่หากเป็นการประเมินความเสี่ยงและผลกระทบ ใช้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นหลัก และถ้าเป็นผลิตภัณฑ์จากการปรับแต่งจีโนมจะพิจารณาเป็นกรณีๆ ไป (McHughen, 2016; Strauss and Sax, 2016)

ดังนั้น พันธุ์พืชใหม่ที่ได้จากการปรับแต่งจีโนมจะถูกควบคุมกำกับดูแลแตกต่างกันในแต่ละประเทศ ที่เลือกใช้กฎระเบียบและข้อบังคับที่แตกต่างกัน เช่น ประเทศอาร์เจนตินา หากพันธุ์พืชใหม่ไม่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแปลกปลอมอยู่ในจีโนม ไม่ต้องใช้กฎระเบียบและข้อบังคับสำหรับพืช GM crops ในการกำกับดูแล (Eckerstorfer *et al*., 2019)

ตัวอย่างของพันธุ์พืชปรับแต่งจีโนมที่ชิ้นส่วนพันธุกรรมแปลกปลอมได้ถูกขจัดออกไปจากจีโนม เช่น พันธุ์ข้าวหอมที่ชิ้นส่วนของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะตรงตามต้องการได้ถูกขจัดออกไป (Shan *et al*., 2015) หรือพันธุ์แตงกวาต้านทานเชื้อไวรัสและพันธุ์มะเขือเทศต้านทานโรคราแป้งที่ชิ้นส่วนซึ่งเป็นองค์ประกอบของ CRISPR ได้ถูกขจัดออกไปจากจีโนมจนหมด (Nekrasov *et al*., 2017) เป็นต้น

ในประเทศสหรัฐอเมริกา พืชดัดแปรพันธุกรรมอยู่ภายใต้กฎระเบียบและข้อบังคับของหน่วยงานรัฐบาลกลาง 3 หน่วยงาน คือ หน่วยงานกระทรวงเกษตร (USDA) หน่วยงานตรวจสอบคุณภาพสัตว์และพืช ขององค์การอาหารและยา (FDA) และองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อม (EPA) อย่างไรก็ตาม หากเป็นประเด็นที่สำคัญ อาจจำเป็นต้องมีกระบวนการเปิดรับฟังความคิดเห็นจากสาธารณะ (public reviews and consultations) ภายใต้กฎหมายนโยบายสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ (National Environmental Policy Act) (Patterson and Josling, 2003)

ในช่วงทศวรรษที่ 1980s สหรัฐอเมริกามีนโยบายออกกฎระเบียบและข้อบังคับเพื่อกำกับดูแลผลิตภัณฑ์จากเทคโนโลยีชีวภาพ โดยตั้งอยู่บนพื้นฐานของลักษณะของผลิตภัณฑ์นั้นๆ และตามวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ประโยชน์โดยไม่เน้นกระบวนการหรือเทคโนโลยีที่ใช้ผลิตสิ่งนั้น ถึงแม้ว่าเป็นเทคโนโลยีที่คิดค้นขึ้นมาใหม่ก็ตาม เช่น นาโนเทคโนโลยี ที่นำมาซึ่งประเด็นอภิปรายถกเถียงกันอย่างกว้างขวาง ระหว่างหน่วยงานและองค์กรที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในการประเมินผลกระทบของยาชนิดใหม่ที่ถูกผลิตขึ้นมาด้วยเทคโนโลยีดังกล่าว เช่น หน่วยงานพิทักษ์ความปลอดภัยในสถานที่ทำงาน หน่วยงานด้านความปลอดภัยของสิ่งแวดล้อม เป็นต้น

โดยทั่วไป ผลิตภัณฑ์จากเทคโนโลยีชีวภาพถูกกำกับดูแลภายใต้กฎหมายที่มีอยู่แล้ว ส่วนกระบวนการหรือเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตจะเข้ามาเกี่ยวข้อง เมื่อมีผลกระทบต่อการบังคับใช้กฎหมายที่มีในปัจจุบันเท่านั้น เช่น USDA จะพิจารณาว่าพันธุ์พืชไบโอเทคชนิดใหม่นั้นมีองค์ประกอบหรือมีโอกาสที่จะเป็น “ศัตรูพืช” หรือไม่ และพิจารณาว่าเทคนิคพันธุวิศวกรรมที่ใช้นั้นก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงลักษณะของพืชพันธุ์ใหม่ชนิดนั้นมากน้อย

เพียงใด และพันธุ์พืช GM crop นั้น มีการเจริญเติบโต แพร่กระจาย หรือแข่งขันกับพืชชนิดอื่นๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติหรือไม่

สำหรับ EPA จะดูแลเรื่องความปลอดภัยของสารป้องกันกำจัดแมลง รวมทั้งพิจารณาประเมินความปลอดภัยของสารที่พันธุ์พืช GM crop สังเคราะห์ขึ้น เพื่อสร้างความต้านทานให้พืชเองด้วยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม

โดย FDA จะทำหน้าที่ประเมินความปลอดภัยของยาชนิดใหม่ๆ ทั้งของมนุษย์และของสัตว์ รวมทั้งประเมินผลระยะยาว ตลอดจนเสถียรภาพหรือโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งนอกเหนือเป้าหมายของการดัดแปลงแก้ไขพันธุกรรม หากผลิตภัณฑ์นั้นถูกนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ จะต้องมีการประเมินความปลอดภัยของสัตว์เลี้ยง สิ่งแวดล้อม รวมทั้งเนื้อสัตว์ที่ถูกเลี้ยงด้วยพืช GM crops นั้นด้วย (Carroll and Charo, 2015)

อย่างไรก็ตาม กฎระเบียบและข้อบังคับที่ใช้กำกับดูแลผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพของสหภาพยุโรป มีความแตกต่างจากประเทศสหรัฐอเมริกา ในประเด็นของการนำเอาผลิตภัณฑ์ไบโอเทคไปใช้ประโยชน์ โดยที่ไม่คำนึงถึงลักษณะของผลิตภัณฑ์นั้นๆ แต่จะพิจารณาจากกระบวนการ หรือเทคโนโลยีที่ใช้ผลิตเป็นหลัก (Anderson and Jackson, 2003; Papademetriou, 2015; Patterson and Josling, 2003) ซึ่งในสหภาพยุโรปจำเป็นต้องระบุรายละเอียดในสลากกำกับ และมีกฎระเบียบและข้อบังคับกำกับควบคุมผลิตภัณฑ์ก่อนวางจำหน่ายในตลาดอย่างเข้มงวด ซึ่งมีความยุ่งยากซับซ้อนมาก เพราะมีทั้งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในส่วนของสหภาพยุโรป และหน่วยงานของแต่ละประเทศอีกต่างหาก

กล่าวได้ว่า การปรับแต่งจีโนมเป็นเทคนิคสมัยใหม่ที่ช่วยให้สามารถปรับแต่ง แก้ไข หรือนำเข้าสารพันธุกรรมสู่จีโนมในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง และส่วนที่เป็นดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมแปลกปลอมอื่นๆ ก็จะถูกกำจัดออกไปได้โดยง่ายหลังกระบวนการปรับแต่งจีโนมตรงตำแหน่งเป้าหมายได้ดำเนินการจนเสร็จสมบูรณ์แล้ว ผลที่ได้จึงเป็นพันธุ์พืชใหม่ที่ไม่ใช่พืชดัดแปรพันธุกรรม หรือที่เรียกว่า nontransgenic plants (Gao and Zhao, 2014; Mahfouz, *et al*., 2012; Nagamangala Kanchiswamy, *et al*., 2015; Xu *et al*., 2015) โดยพันธุ์พืชที่ได้จากการปรับแต่งจีโนมจะมีลักษณะทางพันธุกรรมแทบจะเหมือนกับพันธุ์พืชที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ตามวิธีการมาตรฐานดั้งเดิม ดังนั้น การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพจึงควรประเมินจากพันธุ์พืชที่เป็นผลลัพธ์สุดท้ายเท่านั้น ไม่ควรประเมินจากกระบวนการหรือเทคโนโลยีที่ใช้ในการทำให้ได้มาซึ่งพันธุ์พืชใหม่ (Hartung and Schiemann, 2014; Jones, 2015; Voytas and Gao, 2014)

โดยสรุป กลไกการควบคุมและกำกับดูแลผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพ มีความแตกต่างกันในแต่ละประเทศ และมีผลอย่างมากต่อการพัฒนาและการตลาดของผลิตภัณฑ์เหล่านั้น ปัจจุบันหลายประเทศมีกฎระเบียบและข้อบังคับไว้กำกับดูแลผลิตภัณฑ์ดัดแปรพันธุกรรม (GMOs) ที่ได้จากการถ่ายฝากยีนด้วยเทคนิคในยุคแรก และในปัจจุบันมีข้อถกเถียงเกี่ยวกับความเหมาะสมของกฎระเบียบและข้อบังคับดังกล่าว ว่าจะใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการปรับแต่งจีโนมด้วยหรือไม่ ขณะนี้มีเพียงประเทศอาร์เจนตินาและบราซิลเท่านั้นที่มีกฎหมายระเบียบข้อบังคับเพื่อใช้กำกับดูแลผลิตภัณฑ์จากการปรับแต่งจีโนม (Eckerstorfer *et al.* , 2019)

อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยของนักวิจัยได้พิสูจน์ให้เห็นแล้วว่า พันธุ์พืชใหม่ที่ได้จากการปรับแต่งจีโนม หรือด้วยกระบวนการที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือที่เรียกว่า oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM) แทบจะไม่สามารถแยกความแตกต่างออกจากพันธุ์พืชที่ได้จากกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ตามแบบมาตรฐานดั้งเดิม หรือด้วยวิธีการทำให้กลายพันธุ์แบบดั้งเดิม ดังนั้น พันธุ์พืชจากการปรับแต่งจีโนม จึงไม่สมควรถูกบังคับใช้ภายใต้กฎระเบียบ และข้อปฏิบัติเดียวกันกับพันธุ์พืชดัดแปรพันธุกรรม (transgenic plants) (CropLife International, 2017; Sauer, *et al*., 2016)

เนื่องด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 ทำให้ได้พันธุ์พืชใหม่ที่ไม่มีส่วนของดีเอ็นเอแปลกปลอมติดมาด้วย เช่น ส่วนของเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ เป็นต้น (Jones, 2015; Kumar and Jain, 2015) พันธุ์พืชใหม่ที่ได้จากการปรับแต่งจีโนมจึงไม่ควรได้รับการปฏิบัติภายใต้กฎระเบียบและข้อบังคับที่มีใช้สำหรับพันธุ์

พืชดัดแปรพันธุกรรมในปัจจุบัน (Araki and Ishii, 2015; Jones, 2015; Nagamangala Kanchiswamy, *et al*., 2015; Voytas and Gao, 2014) ปัจจุบัน มีการหารือระหว่างคณะกรรมการและองค์กรต่างๆ เพื่อออกกฎระเบียบและข้อบังคับเพื่อใช้กำกับดูแลพันธุ์พืชที่ได้จากการปรับแต่งจีโนม โดยถือว่าไม่ใช่พืชดัดแปรพันธุกรรม (Araki and Ishii, 2015; Jones, 2015; Voytas and Gao, 2014)

สำหรับประเทศไทยในปัจจุบัน ยังไม่มีกฎหมายเฉพาะเพื่อบังคับใช้ในการกำกับดูแลพันธุ์พืชไบโอเทค แม้ว่าจะมีการจัดทำร่างพระราชบัญญัติความปลอดภัยทางชีวภาพ พ.ศ. .... แต่ก็ยังไม่ผ่านการพิจารณาของสภานิติบัญญัติแห่งชาติ ดังนั้น การกำกับดูแลพันธุ์พืชไบโอเทคจึงยังคงต้องอาศัยผ่านกลไกของพระราชบัญญัติกักกันพืช พ.ศ. 2507 (แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2542) ซึ่งมีประกาศห้ามนำเข้าพืชดัดแปรพันธุกรรม ยกเว้นเพื่อการศึกษาทดลองเท่านั้น นอกจากนี้ ยังยกเว้นเฉพาะกรณีของข้าวโพดและถั่วเหลืองที่นำเข้ามา เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ผลิตเป็นอาหาร หรือเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (ศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพและความปลอดภัยทางชีวภาพ, 2558)

บทสรุปและทิศทางในอนาคต

ภายใต้ภาวะความตึงเครียดจากหลากหลายปัจจัย ทั้งจำนวนของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ ปัญหาการระบาดทำลายผลผลิตทางการเกษตรโดยโรคและแมลงศัตรูพืช ปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลกระทบอย่างมากต่อการผลิต การเปลี่ยนแปลงแบบพลิกโฉมในภาคเกษตรกรรมอย่างยิ่งใหญ่แบบที่เรียกว่า “การปฏิวัติเขียวครั้งใหม่” จึงจำเป็นและจะต้องเกิดขึ้น ทั้งนี้ต้องอาศัยเทคโนโลยียุคใหม่ช่วยให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์พืชให้สามารถเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ มีความต้านทานต่อศัตรูพืช รวมทั้งมีความสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดียิ่งขึ้น

ในช่วงเวลากว่า 2 ทศวรรษที่ผ่านมา นักวิจัยได้พยายามเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของพืชหลายชนิด ด้วยการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมหรือยีนที่ควบคุมลักษณะที่มีความสำคัญทางการเกษตร จากแหล่งอื่นเข้าสู่พันธุ์พืชที่ต้องการปรับปรุง โดยไม่มีข้อจำกัดจากกระบวนสืบพันธุ์ตามกลไกทางธรรมชาติด้วยวิธีการถ่ายฝากยีน ซึ่งข้อดีข้อด้อยของเทคนิคการถ่ายฝากยีนในยุคแรก เป็นที่ถกเถียงกันอย่างกว้างขวางระหว่างผู้ที่สนับสนุนและผู้ที่คัดค้าน อย่างไรก็ดี ปัจจุบันนี้วิทยาการมีการพัฒนาก้าวหน้าไปอย่างมาก จนเกิดเทคนิคสมัยใหม่ที่เรียกว่า “การปรับแต่งจีโนม” หรือ genome editing ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องแม่นยำมาก จนสามารถทำนายหรือคาดการณ์ผลลัพธ์ล่วงหน้าได้ว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นอย่างไรกับพันธุ์พืชที่ได้รับการปรับแต่งจีโนม

การปรับแต่งจีโนมในพืชมีความเป็นไปได้ตั้งแต่เริ่มมีการค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่สามารถกำหนดตำแหน่งการตัดเส้นดีเอ็นเอได้อย่างแม่นยำตั้งแต่ช่วง 30 ปีที่ผ่านมา แต่เริ่มมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายประมาณปี พ.ศ. 2555 หลังจากที่นักวิจัยได้ค้นพบเทคนิค CRISPR/Cas9 และด้วยความเรียบง่ายคล่องตัวในการใช้งาน และความสะดวกในการเข้าถึงเทคโนโลยีของเทคนิคดังกล่าวทำให้มีข้อได้เปรียบเหนือเทคนิคอื่นๆ สำหรับใช้ในการปรับแต่งจีโนม เครื่องมือหรือเทคนิคที่ใช้ในการปรับแต่งจีโนมรวมถึงผลลัพธ์ที่จะเกิดขึ้นจากแต่ละเทคนิคจะแตกต่างกัน แต่เทคนิคที่สะดวกและมีความคล่องตัวในการนำมาประยุกต์ใช้ที่นักวิจัยนิยมมาก เป็นเทคนิคการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อยับยั้งการทำหน้าที่ของยีนที่ไม่พึงประสงค์

อย่างไรก็ตาม เทคนิคการยับยั้งการทำหน้าที่ของยีนมีข้อจำกัดในกรณีของลักษณะที่มีความสำคัญทางการเกษตรที่เป็นลักษณะเชิงปริมาณ ซึ่งมักถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนหลายยีน หากเลือกใช้กลยุทธ์การปรับแต่งแก้ไขระดับการแสดงออกซึ่งหน้าที่ของยีนจะเหมาะสมกว่า (Lowder *et al*., 2018; Rodriguez-Leal *et al*., 2017) การปรับแต่งจีโนมในส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออก ซึ่งหน้าที่ของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณหรือส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์ น่าจะเป็นแนวโน้มทิศทางของการปรับแต่งจีโนมพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอนาคต

อีกแนวโน้มหนึ่งที่น่าสนใจเกี่ยวกับการพัฒนาเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมในอนาคต คือ การปรับแต่งจีโนมที่เหนือระดับพันธุกรรมขึ้นไป (epigenome editing) ซึ่งเป็นการปรับแก้การควบคุมการแสดงออกซึ่งหน้าที่ของยีนเป้าหมาย โดยเน้นที่การควบคุมกลไกการเติมหมู่เมธิลเข้าสู่ดีเอ็นเอ (DNA methylation) หรือกลไกการเติมหมู่

อะเซทิลเข้าสู่กรดอะมิโน (histone acetylation) แทนการปรับแก้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในเส้นดีเอ็นเอ (Gallego-Bartolome *et al*., 2019; Papikian *et al*., 2019) ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นพืชพันธุ์ใหม่ที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม จึงอาจไม่จำเป็นต้องอยู่ภายใต้กฎระเบียบควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพเช่นเดียวกันกับกรณีของพืชดัดแปรพันธุกรรม (GM crops)

ปัจจุบัน ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมถูกพัฒนาขึ้นมาจนสามารถขยายผลไปสู่เชิงพาณิชย์ได้แล้วก็ตาม แต่ยังมีความจำเป็นต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงเทคนิคในรายละเอียด เพื่อให้มีความสะดวกคล่องตัวในการนำไปประยุกต์ให้มากยิ่งขึ้นอย่างต่อเนื่อง และแม้ว่าการนำเอาเทคโนโลยีการปรับแต่งจีโนมไปประยุกต์ใช้จนเกิดเห็นผลลัพธ์เชิงประจักษ์ แต่ยังมีอุปสรรคในการยอมรับของสังคมและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในการกำหนดนโยบาย ซึ่งมีผลต่อการขยายผลการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีนี้ในวงกว้าง หากการเลือกใช้เครื่องมือหรือเทคนิคในการปรับแต่งจีโนมที่ไม่มีการนำเข้าชิ้นส่วนสารพันธุกรรมแปลกปลอม อาจทำให้โอกาสการเป็นที่ยอมรับของสังคมง่ายขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพและความปลอดภัยทางชีวภาพ. 2558. สรุปสาระสำคัญของร่างพระราชบัญญัติความปลอดภัยทางชีวภาพ พ.ศ. ..... ปีที่ 14 ฉบับที่ 46. สืบค้นจาก: www.safetybio.agri.kps.ku.ac.th. (2 กันยายน 2558)

Anderson, K. and L.A. Jackson. 2003. Why are US and EU policies toward GMOs so different? Ag Bio Forum 6: 95-100.

Antony, G., J. Zhou, S. Huang, T.Li , B. Liu, F. White, and B. Yang. 2010. Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-*11N3*. The Plant Cell 22(11): 3864-3876.

Araki, M. and T. Ishii. 2015. Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. Trends in Plant Science 20(3): 145-149.

Barrangou, R., C. Fremaux and H. Deveau. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315(5819): 1709-1712.

Bortesi, L. and R. Fischer. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnology Advances 33: 41-52.

Bortesi, L., C. Zhu, J. Zischewski, L. Perez, L. Bassie, R. Nadi, G. Forni, S.B. Lade, E. Soto, X. Jin, V. Medina, G. Villorbina, P. Munōz, G. Farré, R. Fischer, R.M. Twyman, T. Capell, P. Christou and S. Schillberg. 2016. Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. Plant Biotechnology Journal 14: 2203-2216.

Brooks, C., V. Nekrasov, Z.B. Lippman and J. Van Eck. 2014. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. Plant Physiology 166: 1292-1297.

Budak, H., B. Hussain, Z. Khan, N.Z. Ozturk and N. Ullah. 2015. From genetics to functional genomics: Improvement in drought signaling and tolerance in wheat. Frontiers in Plant Science 6: 1-13.

Carroll, D. and R.A. Charo. 2015. The societal opportunities and challenges of genome editing. Genome Biology 16: 242.

Cathomen, T. and J. Keith Joung. 2008. Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. Molecular Therapy 16(7): 1200-1207.

Chandrasekaran, J., M. Brumin, D. Wolf, D. Leibman, C. Klap, M. Pearlsman, A. Sherman, T. Arazi and A. Gal-On. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Molecular Plant Pathology 17: 1140-1153.

Chen, K. and C. Gao. 2015. Developing CRISPR Technology in Major Crop Plants. *In:* Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes. F. Zhang, H. Puchta and J.G. Thomson, (Eds). Springer: New York, NY,USA. pp. 145-159.

Cigan, A.M., M.J. Gadlage, H. Gao, R.B. Meeley and J.K. Young. 2017. Waxy corn. Available source: WO2017132239A1. (August 3, 2017)

Cohn, M., R.S. Bart, M. Shybut, D. Dahlbeck, M. Gomez, R. Morbitzer, B.H. Hou, W.B. Frommer, T. Lahaye and B.J. Staskawicz. 2014. *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. Molecular Plant-Microbe Interactions 27(11): 1186-1198.

CropLife International. 2017. Oligonucleotide-Directed Mutagenesis (ODM). L Journal.

Doudna, J.A. and E. Charpentier. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346(6213).

Eckerstorfer, M.F., M. Engelhard, A. Heissenberger, S. Simonand and H. Teichmann. 2019. Plants developed by new genetic modification techniques-comparison of existing regulatory frameworks in the EU and non-EU countries. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 7: 26.

Gaj, T., S.J. Sirk, S. Shui and J. Liu. 2016. Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 8 (12): a023754.

Gaj, T., C.A. Gersbach and C.F. Barbas. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology 31(7): 397-405.

Gallego-Bartolome, J., W. Liu, P.H. Kuo, S. Feng, B. Ghoshal, J. Gardiner, J.M. Zhao, S.Y. Park, J. Chory and S.E. Jacobsen. 2019. Co-targeting RNA polymerases IV and V promotes efficient de novo DNA methylation in Arabidopsis. Cell 176: 1068-1082.

Gao, Y. and Y. Zhao. 2014. Specific and heritable gene editing in Arabidopsis. 17 March 2014. *In*: Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 111(12): 4357-4358.

Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath and V. Siksnys. 2012. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109: E2579–E2586. Available source: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/ pnas.1208507109. (September 4, 2012)

Gorbunova, V. and A.A. Levy. 1999. How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. Trends in Plant Science 7: 263-269.

Graham, N., G.B. Patil, D.M. Bubeck, R.C. Dobert, K.C. Glenn, A.T. Gutsche, S. Kumar, J.A. Lindbo, L. Maas, G.D. May, M.E. Vega-Sanchez, R.M. Stupar and P.L. Morrell. 2020. Plant genome editing and the relevance of off-target changes. Plant Physiology 183: 1453-1471.

Han, Y., K. Teng, G. Nawaz, X. Feng, B. Usman, X. Wang, L. Luo, N. Zhao, Y. Liu and R. Li. 2019. Generation of semi-dwarf rice (*Oryza sativa* L.) lines by CRISPR/Cas9-directed mutagenesis of *OsGA20ox2* and proteomic analysis of unveiled changes caused by mutations. Biotechnology 9: 387.

Hartung, F. and J. Schiemann. 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: Opportunities, safety and regulation in the EU. The Plant Journal 78(5): 742-752.

Hu, X., Y. Cui, G. Dong, A. Feng, D. Wang, C. Zhao, Y. Zhang, J. Hu, D. Zeng, L. Guo and Q. Qian. 2019. Using CRISPR-Cas9 to generate semi-dwarf rice lines in elite landraces. Scientific Reports 9, 19096.

Hua, K., J. Zhang, J.R. Botella, C. Ma, F. Kong, B. Liu and J.K. Zhu. 2019. Perspectives on the application of genome-editing technologies in crop breeding. Molecular Plant 12: 1047-1059.

Hutin, M., F. Sabot, A. Ghesquière, R. Koebnik and B. Szurek. 2015. A knowledge-based molecular screen uncovers a broad-spectrum *OsSWEET14* resistance allele to bacterial blight from wild rice. The Plant Journal 84(4): 694-703.

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). 2021. InfoGraphics & Illustrations. Available source: https://www.isaaa.org/resources/infographics/default.asp. (August

7, 2021)

Jankele, R. and P. Svoboda. 2014. TAL effectors: tools for DNA targeting. Briefings in Functional Genomics 13(5): 409-419.

Jansing, J., A. Schiermeyer, S. Schillberg, R. Fischer, and L. Bortesi. 2019. Genome editing in agriculture: technical and practical considerations. International Journal of Molecular Sciences 20: 2888.

Jones, H.D. 2015. Regulatory uncertainty over genome editing. Nature Plants 1, Article ID 14011, 2015.

Kamburova, V.S., E.V. Nikitina, S.E. Shermatov, Z.T. Buriev, S.P. Kumpatla, C. Emani and I.Y. Abdurakhmonov. 2017. Genome Editing in Plants: An Overview of Tools and Applications. International Journal of Agronomy 2017. Article ID 7315351. Available source: https://doi.org/ 10.1155 /2017/7315351. (August 7, 2021)

Kertész, S., Z. Kerényi, Z. Mérai, I. Bartos, T. Pálfy, E. Barta and D. Silhavy. 2006. Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. Nucleic Acids Research 34: 6147-6157.

Kim, Y.A., H. Moon and C.J. Park. 2019. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *Os8N3* in rice to confer resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae.* Rice 12: 67.

Kim, Y.G., J. Cha and S. Chandrasegaran. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok*I cleavage domain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(3): 1156-1160.

Kumar, V. and M. Jain. 2015. The CRISPR-Cas system for plant genome editing: Advances and opportunities. Journal of Experimental Botany 66(1): 47-57.

Laliberte, A. 2020. An analysis of CRISPR-Cas gene editing in agriculture. Honors Scholar Theses. 706. Department of Molecular and Cell Biology. University of Connecticut. Available source: https://opencommons. uconn.edu/srhonors_theses/706. (August 7, 2021)

Li, M., X. Li, Z. Zhou, P. Wu, M. Fang, X. Pan, Q. Lin, W. Luo, G. Wu and H. Li. 2016a. Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a, DEP1, GS3* and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. Frontiers in Plant Science 7: 377.

Li, S.F., L. Shen, P. Hu, Q. Liu, X.D. Zhu, Q. Qian, K.J. Wang and Y.X. Wang. 2019. Developing disease-resistant thermosensitive male sterile rice by multiplex gene editing. Journal of Integrative Plant Biology 61(12): 1201-1205.

Li, T., B. Liu, M.H. Spalding, D.P. Weeks and B. Yang. 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nature Biotechnology 30: 390-392.

Li, Y., J.H. Xiao, L.L. Chen, X.H. Huang, Z.K. Cheng, B. Han, Q.F. Zhang and C.Y. Wu. 2016b. Rice functional genomics research: Past decade and future. Molecular Plant 11(3): 359-380.

Liao, S., X. Qin, L. Luo, L. Han, Y.X. Wang, B. Usman, G. Nawaz, N. Zhao, Y. Liu and R. Li. 2019. CRISPR/Cas9-Induced mutagenesis of semi-rolled leaf1, 2 confers curled leaf phenotype and drought tolerance by influencing protein expression patterns and ROS scavenging in rice (*Oryza sativa* L.). Agronomy 9: 728.

Lombardo, A., D. Cesana, P. Genovese, B.D. Stefano, E. Provasi, D.E. Colombo, M. Neri, Z. Magnani, A. Cantore, P.L. Riso, M. Damo, O.M. Pello, M.C. Holmes, P.D. Gregorg, A. Gritti, V. Broccoli and L. Naldini. 2011. Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. Nature Methods 8(10): 861-869.

Lowder, L.G., A. Malzahn and Y. Qi. 2018. Plant gene regulation using multiplex CRISPR-dCas9 artificial transcription factors. Methods in Molecular Biology. 1676: 197-214.

Mahfouz, M.M., L. Li, M. Piatek, X. Fang, H. Mansour, D.K. Bangarusamy and J.-K. Zhu. 2012. Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein. Plant Molecular Biology 78(3): 311-321.

Mali, P., L. Yang, K.M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J.E. DiCarlo, J.E. Norville and G.M. Church. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339: 823-826.

McHughen, A. 2016. A critical assessment of regulatory triggers for products of biotechnology: product vs. process. GM Crops Food 7: 125-158.

Mishra, R., W. Zheng, R.K. Joshi and Z. Kaijun. 2021. Genome editing strategies towards enhancement of rice disease resistance. Rice Science 28(2): 133-145.

Nagamangala Kanchiswamy, C., D.J. Sargent, R. Velasco, M.E. Maffei and M. Malnoy. 2015. Looking forward to genetically edited fruit crops. Trends in Biotechnology 33(2): 62-64.

Nalley, L., F. Tsiboe, A. Durand-Morat, A. Shew and G. Thoma. 2016. Economic and environmental impact of rice blast pathogen (*Magnaporthe oryzae*) alleviation in the United States. PLoS One 11(12): e0167295.

Nekrasov, V., C. Wang, J. Win, C. Lanz, D. Weigel and S. Kamoun. 2017. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. Scientific Reports 7: 482.

Pabo, C.O., E. Peisach and R.A. Grant. 2001. Design and selection of novel Cys_2His_2 zinc finger proteins. Annual Review of Biochemistry 70: 313-340.

Palpant, N.J. and D. Dudzinski. 2013. Zinc finger nucleases: looking toward translation. Gene Therapy 20(2): 121-127.

Papademetriou, T. 2015. Restrictions on genetically modified organisms: European Union. Law Library of Congress. Available source: http://www.loc.gov/law/help/restrictions-on-gmos/eu.php. (August 1, 2021)

Papikian, A., W. Liu, J. Gallego-Bartolome and S.E. Jacobsen. 2019. Site-specific manipulation of Arabidopsis loci using CRISPR-Cas9 SunTag systems. Nature Communication 10: 729.

Parry, M.A.J., P.J. Madgwick, C. Bayon, K. Tearall, A. Hernandez-Lopez, M. Baudo, M. Rakszegi, W. Hamada, A. Al-Yassin, H. Ouabbou, M. Labhilili and A.L. Phillips. 2009. Mutation discovery for crop improvement. Journal of Experimental Botany 60 (10): 2817-2825.

Patterson, L.A. and T. Josling. 2003. Regulating biotechnology: comparing EU and US approaches. European Policy Papers #8, Archive of European Integration. Available source: http://aei.pitt.edu/28/. (August 1, 2021)

Pavletich, N.P. and C.O. Pabo. 1991. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1A. Science 252(5007): 809-817.

Peng, A., S. Chen, T. Lei, L. Xu, Y. He, L. Wu, L. Yao and X. Zou. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. Plant Biotechnology Journal 15: 1509-1519.

Petolino, J.F. 2015. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 51(1): 1-8.

Puchta, H. 2005. The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. Journal of Experimental Botany 56(409): 1-14.

_____ . 2017. Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: The best is yet to come. Current Opinion in Plant Biology 36: 1-8.

Rodriguez-Leal, D., Z.H. Lemmon, J. Man, M.E. Bartlett and Z.B. Lippman. 2017. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. Cell 171: 470-480.

Römer, P., S. Hahn, T. Jordan, T. Strauß, U. Bonas and T. Lahaye. 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. Science 318(5850): 645-648.

Sauer, N.J., J. Mozoruk, R.B. Miller, Z.J. Warburg, K.A. Walker, P.R. Beetham, C.R. Schöpke and G.F.W. Gocal. 2016. Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. Plant Biotechnology Journal 14(2): 496-502.

Schornack, S., A. Meyer, P. Romer, T. Jordan and T. Lahaye. 2006. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. Journal of Plant Physiology 163(3): 256-272.

Shan, Q., Y. Zhang, K. Chen, K. Zhang and C. Gao. 2015. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. Plant Biotechnology Journal 13(6): 791-800.

Shi, J., H. Gao, H. Wang, H.R. Lafitte, R.L. Archibald, M. Yang, S.M. Hakimi, H. Mo and J.E. Habben. 2017. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. Plant Biotechnology Journal 15: 207-216.

Strauss, S.H. and J.K. Sax. 2016. Ending event-based regulation of GMO crops. Nature Biotechnology 34: 474-477.

Svitashev, S., C. Schwartz, B. Lenderts, J.K. Young and A. Mark Cigan. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nature Communication 7: 13274.

Usman, B., G. Nawaz, N. Zhao, S. Liao, Y. Liu and R. Li. 2020. Precise editing of the *OsPYL9* gene by RNA-guided Cas9 nuclease confers enhanced drought tolerance and grain yield in rice (*Oryza sativa* L.) by regulating circadian rhythm and abiotic stress responsive proteins. International Journal of Molecular Sciences 21: 7854.

Varshney, R.K., I.D. Godwin, T. Mohapatra, J.D.G. Jones and S.R. McCouch. 2019. A SWEET solution to rice blight. Nature Biotechnology 37: 1280-1282.

Vazquez-Vilar, M., J.M. Bernabé-Orts, A. Fernandez-Del-Carmen, P. Ziarsolo, J. Blanca, A. Granell and D. Orzaez. 2016. A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the Golden Braid standard. Plant Methods 12: 10.

Voytas, D.F. and C. Gao. 2014. Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. PLoS biology 12(6): e1001877.

Wang, F.J., C.L. Wang, P.Q. Liu, P.L. Lei, W. Hao, Y. Gao, Y.G. Liu and K.J. Zhao. 2016. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. PLoS One 11(4): e0154027.

Xiao, W.M., Q.Y. Yang, M. Huang, T. Guo, Y.Z. Liu, J.F. Wang, G.L. Yang, J.Y. Zhou, J.Y. Yang, X.Y. Zhu, Z.Q. Chen and H. Wang. 2019. Improvement of rice blast resistance by developing monogenic lines, two-gene pyramids and three-gene pyramid through MAS. Rice 12(1): 78.

Xie, K., J. Zhang and Y. Yang. 2014. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. Molecular Plant 7(5): 923-926.

Xie, K., B. Minkenberg and Y. Yang. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 112: 3570-3575.

Xing, H.L., L. Dong, Z.P. Wang, H.Y. Zhang, C.Y. Han, B. Liu, X.C. Wang and Q.J. Chen. 2014. A CRISPR/Cas9 tool kit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biology 14: 327.

Xu, R.F., H. Li, R.Y. Qin, J. Li, C.H. Qui, Y.C. Yang, H. Ma, L. Li, P.C. Wei and J.B. Yang. 2015. Generation of inheritable and "transgene clean" targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. Scientific Reports 5: 1-10.

Xu, Z.Y., X.M. Xu, Q. Gong, Z.Y. Li, Y. Li, S. Wang , Y.Y. Yang, W.X. Ma, L.Y. Liu, B. Zhu, L.F. Zou and G.Y. Chen. 2019. Engineering broad-spectrum bacterial blight resistance by simultaneously disrupting variable TALE-binding elements of multiple susceptibility genes in rice. Molecular Plant 12(11): 1434-1446.

Zaruk, D. 2020. 20 Benefits from Agricultural Genome Editing. Available source: https://seedworld.com/20-benefits-from-agricultural-genome-

editing/. (August 7, 2021)

Zhang, F., Y. Wen and X. Guo. 2014. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. Human Molecular Genetics 23(1): R40-R46.

Zhang, G., Z. Cheng, X. Zhang, X. Guo, N. Su, L. Jiang, L. Mao and J. Wan. 2011. Double repression of soluble starch synthase genes *SSIIa* and *SSIIIa* in rice (*Oryza sativa* L.) uncovers interactive effects on the physicochemical properties of starch. Genome 54: 448-459.

Zhang, J.,H. Zhang, J.R. Botella and J.K. Zhu. 2018. Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the Waxy gene in elite rice varieties. Journal of Integrative Plant Biology 60: 369-375.

Zhou, H., B. Liu, D.P. Weeks, M.H. Spalding and B. Yang. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. Nucleic Acid Research 42: 10903-10914.

Zhu, C., L. Bortesi, C. Baysal, R.M. Twyman, R. Fischer, T. Capell, S. Schillberg and P. Christou. 2017. Characteristics of genome editing mutations in cereal crops. Trends in Plant Science 22: 38-52.