ภาคผนวก
การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับโคลน

การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับโคลน

การโคลนหรือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้นขั้นแรกต้องเตรียมดีเอ็นเอก่อน ที่ได้มาจากแหล่งที่ต้องการ จึงนำมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมแล้วจึงนำไปถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับ ซึ่งที่มาของดีเอ็นเอมี 3 แหล่ง คือ

1. ดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต เป็นดีเอ็นเอทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น เรียกว่า Genomic DNA

2. ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจากเอ็มอาร์เอ็นเอ เรียกว่า Complementary DNA หรือ cDNA โดยสร้างอาร์เอ็นเอในอวัยวะหนึ่งในช่วงหนึ่งของชีวิต

3. ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี หรือใช้เอ็นไซม์ หรือใช้ร่วมกันทั้งวิธีทางเคมีและใช้เอ็นไซม์

การเตรียมดีเอ็นเอจากเซลล์ เตรียมได้จากหลายแหล่งอาจมาจากพืชหรือสัตว์ชั้นสูง ถ้าต้องการดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่แล้วต้องนำไปโคลน หรือนำไปวิเคราะห์โดยวิธี Southern blot นั้นคือเตรียมดีเอ็นเอให้ได้ขนาดไม่ต่ำกว่า 100-200 กิโลเบส (kb) แล้วนำไปแยกด้วยวิธี อิเล็คโทรโฟริซิส ในอะกาโรสเจล

ดีเอ็นเอจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเตรียมได้จากตับ ม้าม หรือ ไต ซึ่งโดยทั่วไปนิยมเตรียมจากม้ามเพราะได้ดีเอ็นเอ บริสุทธิ์ในปริมาณมาก โดยเตรียมจากเนื้อเยื่อสดทันทีหรือตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงในไนโตรเจนเหลว จึงนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 ^{o}C การเก็บเนื้อเยื่อโดยวิธีนี้เก็บได้นานกว่า 1 ปี นอกจากนี้อาจเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดหรือ จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงก็ได้

การเตรียมดีเอ็นเอจากพืช เตรียมได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ใบ กิ่ง ใบเลี้ยง ต้นอ่อน และกลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำส่วนของพืชมาบดในไนโตรเจนเหลวแล้วใส่บัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยสารดีเทอร์เจนต์ เช่น SDS และจึงเติม

สารโปแตสเซียมอะซิเตท ที่มีสมบัติเป็นกรด เพื่อให้ส่วนต่างๆของพืชตกตะกอน แล้วจึงนำส่วนของเหลวด้านบนมากรอง แล้วจึงตกตะกอนโดยใช้แอลกอฮอล์ เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วนำไปตรวจสอบขนาดโดยอิเล็คโทรโฟริซิสและหาปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดจากค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

การเตรียมดีเอ็นเอจาก mRNA

การเตรียมดีเอ็นเอโดยวิธีนี้ได้มาจาก mRNA ซึ่งเป็นผลผลิตของยีนบางยีนที่มีการแสงออกในบางช่วงเวลา และในอวัยวะหนึ่งเท่านั้น ดีเอ็นเอที่ได้จากการลอกรหัสมาจาก mRNA จะเป็นส่วนของยีนที่ไม่มีอินทรอน เพราะmRNA ที่อยู่ในไซโตรพลาสซึมได้ผ่านการตัดแต่งเอาอินทรอน ออกเรียบร้อยแล้ว ดีเอ็นเอที่ได้จากการลอกรหัสมาจาก mRNAนี้เรียกว่า Complementary DNA หรือ cDNA ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิด ขั้นแรกต้องศึกษาว่ายีนที่สนใจนั้นแสดงออกในอวัยวะใด และในช่วงเวลาใด แล้วจึงแยกสกัด mRNA จากเซลล์ดังกล่าวมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เริ่มต้นโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยเบสT หลายๆ เบสเป็นไพรเมอร์ เข้าไปเกาะที่ปลาย 3' ของ mRNA ด้วยพันธะไฮโดเจนระหว่างเบส T และ A จึงสังเคราะห์ cDNA สายแรกในทิศทาง 5' ไป 3' โดยใช้เอนไซม์reverse transcriptase

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีทางเคมี

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในปัจจุบัน สร้างได้ถึง 50 นิวคลีโอไทด์ ถ้าทราบลำดับกรดอะมิโนของยีนดังกล่าวจะสังเคราะห์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวสั้นๆ ที่ต่อเนื่องทั้งสองสาย และมีลำดับเบสที่ซ้อนกันในสายที่มีเบสเป็นคู่สมนั้น แล้วจึงเชื่อมต่อโอลิโกนิวคลีโอไทด์เหล่านี้โดยใช้เอ็นไซม์ DNA ligase

การสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์มีหลายวิธีแต่วิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางและมีการผลิตเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ ในทางการค้ามี 2 วิธี คือ วิธี Phosphate triester และวิธี Phosphite triester ทั้งสองวิธีมีหลักการคล้ายกันคือ ต่อนิวคลีโอไทด์เข้าไปในสายทีละหนึ่งโมเลกุล โดยขั้นตอนแรกต้องป้องกันไม่ให้หมู่ที่เข้าทำปฏิกริยาได้ง่าย นั่นคือ ต้องป้องกันหมู่อะมิโน ของเบส A C และ G ไม่ให้เกิดปฏิกริยาได้ โดยเติมหมู่ benzoyl เข้าที่เบส A และ C และเติมหมู่ isobutyryl เข้าที่เบส G เมื่อสิ้นสุดการสังเคราะห์แล้ว หมู่ที่ป้องกันเบสกำจัดออกได้โดยใช้ด่างอ่อนและหมู่ dimethoxytrityl กำจัดออกได้โดยย่อยด้วยกรดอย่างอ่อน

เวคเตอร์

หลักการโคลนยีน คือการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้ได้ปริมาณมากเพื่อต้องการศึกษาหรือวิเคราะห์ต่อไป แต่ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการนั้นไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยตัวเองในเซลล์ผู้รับ จึงต้องนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมาต่อเข้ากับดีเอ็นเออื่น ที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับคือดีเอ็นเอที่เป็นพาหะหรือเวคเตอร์นั่นเอง

พลาสมิด(Plasmid)

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมพบในแบคทีเรียหลายชนิดมีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่มีขนาดตั้งแต่ 1,000 คู่เบสจนถึงมากกว่า 200,000 คู่เบส พลาสมิดมีสมบัติเป็นหน่วยที่จำลองตัวได้ และเกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้ การแยกพลาสมิดออกมาจากเซลล์เดิมก่อนแล้วส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ใหม่โดยทำให้เซลล์ผู้รับเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ (Competent cell)และรับดีเอ็นเอจากภายนอกโดยกระบวนการ transformation ตัวอย่างพลาสมิดที่ใช้เป็นเวคเตอร์ได้แก่ pBR322 และ pUC18, pUC19

ฝาจแลมบ์ดา(Lambda phage)

เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ขนาด 48,500 คู่เบสมีการดำรงชีวิตได้ 2 แบบ คือ

1. Lytic pathway โดยดีเอ็นเอของไวรัสที่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย แล้วทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกแล้วปล่อยอนุภาคไวรัสออกมา

2.Lysogenic pathway โดยดีเอ็นเอของไวรัสซึ่งจับตัวกันเป็นวงแหนวจะไปเกาะกับโครโมโซมของแบคทีเรียแล้วแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอทำให้จีโนมของฝาจแทรกตัวเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย เมื่อมีการจำลองโครโมโซมของแบคทีเรีย ฝาจก็จะจำลองโมเลกุลแล้วส่งต่อไปยังเซลล์ลูกด้วย

ตัวอย่างของฝาจแลมบ์ดา ได้แก่ λgt10 , λgt11,λ2001 และ M13

คอสมิด(Cosmid)

คอสมิดมีส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเองในแบคทีเรีย มียีนเครื่องหมายสำหรับคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับเวคเตอร์นี้และมี cos site ของฝาจแลมบ์ดา เพื่อช่วยให้สามารถบรรจุดีเอ็นเอลงในโปรตีนห่อหุ้มของฝาจแลมบ์ดาได้ ได้แก่ คอสมิด pJB8

การโคลนยีน

การสร้างดีเอ็นเอ library ดีเอ็นเอที่แยกได้ทั้งหมดจากเซลล์นำมาต่อกับเวคเตอร์และถ่ายลงในเซลล์ผู้รับก็จะได้ประชากรของเซลล์ หรือของฝาจที่มีชิ้นดีเอ็นเอต่างๆ ที่มา

จากสิ่งมีชีวิตที่แยกสกัดดีเอ็นเอมาได้ทั้งหมดเรียกว่า Genomic library ส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจาก mRNA เมื่อนำมาต่อกับเวคเตอร์และถ่ายฝากลงสู่เซลล์แล้วจะได้ cDNA library ขนาดของ library จีโนมของคนมีขนาดประมาณ 3×10^{6} kb

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์มี 3 วิธี คือ

1.เชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Cohensive end ligation)

2.เชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่(Blunt end ligation)

3.การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสคู่สมที่เกิดจากการต่อเบสชนิดเดียวกันเข้าไปที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่ง โดยเอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase

การตรวจหาโคลนที่ต้องการ สามารถทำได้ดังขั้นตอนดังต่อไปนี้

ผลที่ได้จากการตัดต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์แล้วนำเข้าสู่เซลล์ผู้รับคือ ประชากรของเซลล์ หรือ ประชากรของฝาจที่มีชิ้นดีเอ็นเอต่างๆกัน เป็น library หรือ gene bank วิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการของเซลล์ทั้งหมดนั้นทำได้หลายวิธีคือ

คัดเลือกจากฟีโนไทป์ (Phenotypic selection)

ถ้ายีนที่สอดใส่เข้าไปในเวคเตอร์แสดงออกได้ในเซลล์ผู้รับนั้น และลักษณะที่ปรากฏแตกต่างไปจากลักษณะของเซลล์ผู้รับเดิม ก็สามารถคัดเลือกโดยวิธีนี้ได้ ทั้งนี้ในการโคลนยีนต้องเลือกใช้เวคเตอร์ที่เอื้ออำนวยให้ยีนสามารถแสดงออกได้ในเซลล์ผู้รับเช่น expression vector

ตรวจหาโดยวิธีอิมมูโนเคมี (Immunochemical screening)

ทำได้เมื่อโคลนที่ต้องการแสดงออกได้โดยผลิตโพลีเพพไทด์ หรือโปรตีนที่ถูกต้องคล้ายกับวิธีแรก แต่โปรตีนดังกล่าวไม่แสดงฟีโนไทป์ที่เด่นชัดไม่สามารถจะคัดเลือกโดยตรงได้ แต่ต้องมีแอนติบอดี ต่อโปรตีนนี้เตรียมพร้อมอยู่ก่อน แล้วตรวจสอบโปรตีนที่เซลล์ผลิตขึ้นโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่ต้องการนั้น

การตรวจหาโดยวิธีการ Nucleic acid hybridization

การคัดเลือกโคลนโดยวิธีนี้ใช้เมื่อโคลนที่ต้องการไม่แสดงลักษณะใดๆ อาจจะผลิตโพลีเพพไทด์จำเพาะได้หรือไม่ก็ตามและอยู่ในเวคเตอร์ใดก็ได้ โดยใช้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับส่วนหนึ่งส่วนใดของชิ้นดีเอ็นเอแยกนั้นเป็นตัวตรวจสอบ เรียกดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบนี้ว่า Probe

การประยุกต์ใช้

1.พันธุวิศวกรรมทางการศึกษาวิจัย เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสามารถนำมาใช้อธิบายกลไกต่าง ๆในเซลล์ เช่น การแสดงออกของยีน ปฏิกริยาร่วมระหว่างโปรตีน และลำดับเบสจำเพาะของดีเอ็นเอ การทำงานของยีนและเอนไซม์บางชนิดในเซลล์ พัฒนาการและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

2.พันธุวิศวกรรมทางอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม การโคลนยีนนั้นวัตถุประสงค์อย่างหนึ่งคือ พยายามให้ยีนนั้นแสดงออก หรือ สร้างผลผลิตได้ในเซลล์ผู้รับ ผลผลิตยีนดังกล่าวนี้ได้แก่ อุตสาหกรรมยา การผลิตวัคซีน ผลิตสารที่เป็นส่วนผสมในอาหาร ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ส่วนที่เกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อม เช่น การสร้างแบคทีเรียที่ย่อยสลายหางนมและของเสียบางชนิด

3.พันธุวิศวกรรมทางการเกษตร เข้ามามีบทบาทต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ เช่น การเพิ่มผลผลิตน้ำนม การสร้างยีนต้านทานโรคพืช และสัตว์ การสร้างพืชต้านทานแมลง เป็นต้น

4.พันธุวิศวกรรมทางการแพทย์ เช่น การทำยีนบำบัดในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง การวินิจฉัยโรคโดยใช้เทคนิค PCR การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA figerprint)

ปฏิบัติการที่ 1

การเพลทห้องสมุดซีดีเอ็นเอ

(Plating λgt 11 cDNA library)

ปฏิบัติการนี้จะได้ทราบวิธีการเพาะเลี้ยง λgt 11 ในเซลล์ให้อาศัย (E.coli strain Y 1090) และการไตเตรทจำนวนอนุภาค λgt 11 ที่มีอยู่ในห้องสมุดซีดีเอ็นเอ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ห้องสมุดซีดีเอ็นเอในเวคเตอร์ λgt 11เป็นห้องสมุดซีดีเอ็นเอ ซึ่งสังเคราะห์จาก mRNA ที่สกัดจากละอองเรณูของข้าว
2. เชื้อ *E.coli* Y1090
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar+amplicillin (100μg/ml)
5. top agarose
6. 1 M $MgSO_4$
7. amplicillin (100μg/ml)
8. 20% maltose
9. SM buffer
10. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 ml และ 15ml
11. automatic pipettesและ pipette tips
12. ตู้ถ่ายเชื้อแบบไบโอฮาซาด
13. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
14. ตู้เลี้ยงเชื้อ
15. อ่างน้ำอุ่น
16. เตาไมโครเวฟ

<u>วิธีทำ</u>

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การสตีคเชื้อ *E.coli* Y1090

ทำการสตรีคเชื้อ *E.coli* Y1090 ซึ่งเป็นเซลล์ให้อาศัยสำหรับฝาจ λgt 11 จาก glycerol stock บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar+amplicillin (100μg/ml) เลี้ยงเชื้อในตู้เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลาหนึ่งคืน (16-18 ชั่วโมง)

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การเตรียมเซลล์ให้อาศัย *E.coli* Y1090

1. ย้ายเชื้อ *E.coli* Y1090 หนึ่งโคโลนีจากจานวุ้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium ที่มี amplicillin (100μg/ml), $MgSO_4$ mM และ 0.4%maltose (เตรียมโดยใส่ amplicillin (100μg/ml) จำนวน 10 μl, 1 M $MgSO_4$ จำนวน 100 μl, 20%moltose จำนวน 200 μl ลงใน LB medium จำนวน 10 ml) เขย่าข้ามคืนที่ 37 ° C

2. วันรุ่งขึ้นย้าย overnight culture จำนวน 1ml ไปใส่ใน LB medium ที่มีสารชื่อ amplicillin (100μg/ml), $MgSO_4$ mM และ 0.4%maltose จำนวน 10 ml เขย่าที่อุณหภูมิ 37 ° Cเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงจนกระทั่งได้ค่า OD_{600} ประมาณ 0.6-0.8

2. แช่เซลล์ในกระบะน้ำแข็ง เป็นเวลาประมาณ 15 นาที

3. นำเซลล์ไปทำให้ตกตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงใน refrigerated centrifugeที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไป แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10 mM $MgSO_4$ (เย็นจัด) จำนวน 3 ml แช่เซลล์ในน้ำแข็งจนกว่าจะถึงเวลาใช้

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การทำ dilution series ของ cDNA library

ต้องทำ cDNA library ให้เจือจางแล้วจึงนำมาผสมกับเชื้อ *E.coli* Y1090 ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในจานวุ้น

1. แบ่ง λgt 11 cDNA library จาก stock จำนวน 5 μl
2. เติม SM buffer ลงไป 95 μl (dilution ที่ 1)
3. แบ่ง dilution ที่ 1 มา 5 μl ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อีกหลอดหนึ่งแล้วเติม SM buffer ลงไป 95 μl (dilution ที่ 2)
4. ทำซ้ำข้อ 2 และ 3 จนถึง dilution ที่ 5

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การเพลท λgt 11 cDNA library

1. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 ml มา 6 หลอด

2. หลอดที่ 1 ใส่ SM buffer ลงไป 50 μl

3. ใส่ diluted λgt 11 cDNA library dilution 1 ถึง dilution 5 ละ 50 μl ใส่ลงไปในหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 6 ตามลำดับ

4. ใส่เซลล์ *E.coli* Y1090 ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 2 ลงไปในหลอดที่ 1 ถึง หลอดที่ 6 หลอดละ 150 μl

5. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ทั้ง 6 หลอดไปแช่ในอ่างน้ำอุ่น 37 ° C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ฝาจ λgt 11 absorb กับ host cell

6. เติม top agarose เหลว (3.5 ml) อุณหภูมิประมาณ 45-50 ° C ลงไปในหลอดเซนตริฟิวจ์ เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานวุ้น (LB+amplicillin) (ขั้นตอนนี้ต้องทำอย่างรวดเร็ว ต้องเท top agarose และเกลี่ย top agarose ให้ทั่วพื้นผิววุ้น ก่อนที่ top agarose จะแข็งตัว ดังนั้นจึงต้องนำจานวุ้นที่จะใช้ไปทำให้อุ่นก่อนโดยนำไปใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อล่วงหน้า 37°C ประมาณ 2-3 ชั่วโมงก่อน ที่จะทำขั้นตอนนี้)

7. นำจานวุ้นทั้ง 6 ใบ ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

8. วันรุ่งขึ้นนับจำนวนพลากใส (plaques) ที่เกิดจากการเจริญเติบโตแบบ lytic cycle ของ λgt 11 แล้วคำนวณหาจำนวน λgt 11 ที่มีอยู่ใน stock cDNA library มีหน่วยเป็น pfu/ml (plaque forming units/ml)

ปฏิบัติการที่ 2
การเพิ่มจำนวนแบคทิริโอฝาจแลมด้า
(Preparation of higher Phage lysate)

จากปฏิบัติการที่ได้เพลท cDNA libraly เรียบร้อยแล้วจะได้พลาก (plagues) จำนวนมากบนจานวุ้น พลากแต่ละพลากจะมีฝาจ λgt11 อยู่เป็นจำนวน 10^5 – 10^6 อนุภาคขึ้นอยู่กับขนาดและความสมบูรณ์ พลากแต่ละพลากคือโคลนของλ gt11 ซึ่งมีจีโนมเป็นดีเอนเอสายผสม (recombinant DNA) ระหว่าง DNA ของ λgt11 กับ cDNA

ของข้าว ในบทปฏิบัติการนี้จะให้สุ่มเอาพลากมาเพียงสองพลากแล้วนำมาเพิ่มจำนวนให้ได้จำนวนมากพอที่จะสกัดเอาดีเอนเอมาทำการศึกษาต่อไป

วัสดุและอุปกรณ์

1. จานวุ้นที่มี cDNA library จากปฏิบัติการที่ 2 เลือกเอาจานที่มีจำนวนพลากไม่มากเกินไปไม่น้อยเกินไปและพลากห่างกันพอสมควร
2. เชื้อ *E.coli*.Y1090 ซึ่งเป็นเซลล์ให้อาศัย (host cell)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar+ampicilin
5. ampicilin 100 mg/ml
6. 20% maltose
7. 1M $MgSO_4$
8. 1M $CaCl_2$
9. SM buffer
10. Top agarose
11. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
12. หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 และ 50 ml
13. automatic pipettes และ pipett tips
14. Paster pipetts
15. ตู้ถ่ายเชื้อแบบไบโอฮาซาด
16. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
17. ตู้เลี้ยงเชื้อ
18. อ่างน้ำอุ่น
19. เตาไมโครเวฟ

<u>วิธีทำ</u> –การเพิ่มจำนวนแบคทิริโอฟาจจากพลากมี 2 วิธี นักศึกษาจะเลือกทำวิธีใดก็ได้ ในเบื้องต้นแนะนำให้ใช้วิธีที่ 2 เพราะใช้เวลาน้อยกว่าและสิ้นเปลืองน้อยกว่า

<u>วิธีที่1</u>-วิธีเพลทไลเสต (Plat lysate method)

1. ใช้ปลายพลาสเจอร์ปิเปตที่ไร้เชื้อเจาะลงไปบนวุ้นที่มีพลาก (plaqe) ที่ต้องการจะนำไปเพิ่มจำนวนอยู่แล้วนำวุ้นที่มีพลากอยู่นั้นไปใส่ใน phage dilution buffer หรือ SM buffer จำนวน 1 ml ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

2. เติม Chloroform ลงไป 1 หยดเขย่าแล้วทิ้งไว้ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือข้ามคืนเพื่อให้ฝาจเคลื่อนที่ออกจากวุ้น

3. ปิเปต phage stock จากข้อ 2 ให้ได้จำนวนประมาณ 10^5 pfu (plague forming unit) นำมาผสม กับ *E.coli* host cells จำนวน 0.15 ml ในหลอดไร้เชื้อขนาด 15 ml (เตรียม host cells ตามขั้นตอนที่2, บทที่ 2) การที่จะทราบว่าควรจะใช้ phage stock ปริมาณเท่าใดนั้นต้องทำการไตเตรทเสียก่อนตามวิธีในบทปฏิบัติการที่2

4. นำส่วนผสมจากข้อ 3 ไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้ฝาจและเซลล์ absorb กับผนังเซลล์ให้อาศัย

5. เติม top agarose ที่ เหลวและอุ่น(45 °C) ลงไปในส่วนผสมของฝาจและเซลล์ให้อาศัยผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานที่มีวุ้นเลี้ยงเชื้อ LB+ampicilin ที่แข็งตัวอยู่

6. นำจานวุ้นไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมงในขั้นตอนนี้บนพื้นผิวของจานเพาะเชื้อควรมีลักษณะใสเกือบทั้งหมด เนื่องจากฝาจมีการเจริญมากจนทำให้เซลล์ให้อาศัยแตก (lyse) เกือบทั้งหมด

7. เติม SM buffer ลงไปบนจานเพาะเชื้อจำนวน 4 ml ปิดฝา ปิดช่องระหว่างฝากับตัวจานด้วยพาราฟิล์ม วางจานเพาะเชื้อนี้ไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง ถ้าเป็นไปได้ควรเขย่าเบา ๆ เป็นระยะ ๆ หรือวางจานบนเครื่องเขย่าซึ่งวางไว้ในตู้เย็น

8. เท SM buffer จากข้อ 7 ลงในหลอดไร้เชื้อ เติม SM buffer อีก 1 ml ลงบนจานวุ้นเพื่อล้างฝาจที่ยังหลงเหลืออยู่แล้วเท SM buffer นี้ลงไปรวมกับ SM buffer จากข้อ 7

9. เติม chloroform ลงไป 0.1 ml ลงไปผสมโดยการ vortex เล็กน้อย นำไปเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เศษเซลล์แบคทีเรียตกตะกอน

10. ย้าย supernatant ไปใส่ในหลอดอีกหลอดหนึ่ง เติม chloroform ลงไป 2-3 หยด

11. plaqe stock ที่ได้นี้จะมีจำนวนฝาจมากประมาณ 10^{10}-10^{11} pfu/mlซึ่งสามารถเก็บไว้ได้ที่ 4 °C เป็นเวลาหลายเดือน

<u>วิธีทำ 2</u> วิธีอาหารเหลวจำนวนน้อย (Small scale liquid culture)

1. ใช้ปลายของพลาสเจอร์ปิเปต ที่ไร้เชื้อเจาะลงไปบนวุ้นที่มีพลาก (Plaque) ที่ต้องการเพิ่มจำนวนอยู่ แล้วนำวุ้นที่มีพลากอยู่นั้นไปใส่ลงในเซลล์ให้อาศัย จำนวน 0.2 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที (เตรียมเซลล์ให้อาศัยตามขั้นตอนที่ 2 บทที่ 2)

2. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB+100 μg/ml ampicilin ซึ่งมี $CaCl_2$ เข้มข้น 5 mM จำนวน 5 ml ในหลอดขนาด 50 ml

3. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ 37 °C เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง (ควรเพาะเลี้ยงเฉพาะเซลล์ให้อาศัยอย่างเดียวในหลอดอีกหลอดหนึ่ง เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟาจอยู่ด้วยจะใสเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีฟาจ)

4. เติม chloroform ลงไป2-3 หยดแล้วเขย่าต่ออีก 10 นาที

5. นำไปเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์แบคทีเรีย

6. ย้าย supernatant ไปใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม cloroform ลงไป 2-3 หยด สามารถเก็บ phage stock นี้ไว้ที่ 4 °C ได้หลายเดือน

7. สำหรับวิธีที่ 2 สามารถ scale up ได้ โดยเพิ่มจำนวนพลากเป็น 3-4 พราก (จาก clone เดียวกัน) ต่อ culture 10 ml และเพิ่มปริมาณเซลล์ให้อาศัยเป็น 0.5 ml

ปฏิบัติการที่ 3
การแยกดีเอ็นเอของแบคทีริโอฝาจแลมด้า
(Isolation of bacteriophage lambda DNA)

ในปฏิบัติการที่ 2 นักศึกษาได้เตรียม phage lysate จากโคลนของ λgt 11 ที่นักศึกษาคัดเลือกมาจำนวน 2 โคลน ในปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้สกัดแยกเอาดีเอ็นเอออกมาจากแบคทีริโอฝาจ λgt 11 ซึ่งมีหลายวิธีในที่นี้จะแนะนำวิธีที่ไม่ต้องใช้วัสดุราคาแพงมากนักเพียง 2 วิธี สำหรับวิธีอื่นๆ นักศึกษาสามารถค้นคว้าเพิ่มเติมได้จากเอกสารอ้างอิง

วัสดุและอุปกรณ์

1. Buffer L1 (ประกอบด้วย 20 mg/ml Rnase A, 6 mg/ml Dnase,0.2 mg/ml bovine serum albumin,10 mM EDTA,100 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl)
2. สารละลาย 20 % PEG 8,000, 2 M NaCl
3. DE 52 ion exchange cellulose in LB medium
4. 3 M Potassium acetate pH 4.8

5. proteinase K 0.1 mg/ml
6. 10% SDS
7. 5% CTAB, 0.5 M NaCl
8. isopropanol
9. absolute ethanol
10. 70 % ethanol
11. 1.2 M NaCl
12. TE buffer
13. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
14. หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 ml
15. automatic pipettor และ pipet tips
16. อ่างน้ำอุ่น
17. Deep freezer (-70 °C)
18. เครื่อง refrigerated centrifuge
19. เครื่อง microcentrifuge

วิธีทำ

<u>วิธีที่ 1</u>-DE 52 method

1. นำ phage lysate จำนวน 15 ml ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 ml แล้วเติม Buffer L1ลงไป 50 µl นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติมสารละลาย 20 % PEG 8,000, 2 M NaCl ที่เย็นจัด 5 ml ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วแช่ไว้ในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง
3. นำไปเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C
4. เท supernatant ทิ้งไปแล้วคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู ทิ้งไว้ครู่หนึ่ง เพื่อให้ของเหลวที่เหลือไหลลงมาให้หมด
5. ละลายตะกอนฝาจแลมด้าด้วย LB-broth จำนวน 1,200 µl ย้ายไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 2 หลอดๆ ละ 600 µl

6. เติม DE 52 ion exchange cellulose ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน LB-broth ลงไปหลอดละ 600 μl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดไปมา 20-30 ครั้ง
7. เหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่ แล้วเติม DE 52 ลงไปอีก 600 μl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอด
8. เหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง แล้วย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่
9. เติมสารละลาย proteinase K เข้มข้น 0.1 mg/ml ลงไป 10 μl ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 10 % SDS ลงไป 50 μl ผสมให้เข้ากัน
10. เติมสารละลาย 3% potassium acetate ลงไป 130 μl นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 70°C 10 นาที แล้วย้ายไปแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที
11. นำไปเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ เป็นเวลา 10 นาที
12. ย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ปริมาตรเท่ากันลงไป นำไปแช่ในตู้แช่แข็ง (-70°C) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที
13. เท supernatant ทิ้งไป ผึ่งตะกอนให้แห้งเล็กน้อย แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE จำนวน 30 μl

การเตรียมสารละลาย

1. Buffer L1

เอนไซม์ Rnase A	20 mg
เอนไซม์ Dnase I	6 mg
1 Mtris-HCl (pH 7.5)	0.1 ml
0.5 M Na_2EDTA	20 μl
5 M NaCl	60 μl

ในปริมาตรทั้งหมด 1 ml เก็บในตู้แช่แข็ง(-20°C)

2. 20% PEG 8000, 2 M NaCl

PEG 8000	20 กรัม
NaCl	11.96 กรัม

ละลายใน SM buffer จนได้ปริมาตรทั้งหมด 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

3. DE52 in LB-medium

ชั่ง DE52 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ค่อยๆ เติม 0.05 N HCl ลงไปพร้อมกับค่อยๆ คนเติม HClทั้งหมดเป็นปริมาตรประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตร DE52 แล้วค่อยๆ เติม NaOH เข้มข้น (5N) ลงไปจนกระทั่ง pH ของส่วนผสมมีค่าใกล้เคียง pH ของ LB medium คือประมาณ 7.0 ตั้งทิ้งไว้ให้ DE52 ตกตะกอนแล้วจึงเทส่วนลอยทิ้งไป แล้วล้าง DE52 หลายๆ ครั้งด้วย LB จำนวนมากจนกระทั่ง pH ของ LB มีค่า 7.0 จากนั้นจึงละลาย DE52 ด้วย LB ให้ส่วนผสมมีปริมาณ DE52 75% LB 25% เติม sodium azide ลงไปให้มีความเข้มข้น 0.1% เก็บส่วนผสมนี้ไว้ที่ 4°C

4. proteinase K

proteinase K 1 mg

ละลายใน TE buffer10 ml เก็บไว้ -20°C

5. 10% SDS

Sodium dodecyl sulfate 10 กรัม

ละลายน้ำจนได้ปริมาตร 100ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ไม่ต้องออโตเคลฟ SDS)

6. 3 M Potassium acetate

ชั่ง Potassium acetate 29.5 กรัม ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 100 ml ปรับ pH ให้เป็น 4.8 แล้วฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

7. 5% CTAB in 0.5 M NaCl

CTAB 5 กรัม

NaCl 2.92 กรัม

ละลายน้ำให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

8. 1.2 M NaCl

NaCl 7.03 กรัม

ละลายน้ำจนได้ปริมาตร 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

9. TE buffer

Tris-base 0.121 กรัม

Na_2EDTA 0.037 กรัม

ละลายน้ำ 80 ml ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย HCl แล้วเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 100ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

ปฏิบัติการที่ 4

การย่อยดีเอ็นเอของแบคทีริโอฝาจแลมด้าด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

(Restrictuion digestion of bacteriophage lambda DNA)

จากบทปฏิบัติการที่ 3 ได้แยกดีเอ็นเอจากแบคทีริโอฝาจแลมด้าจีที 11 โดยใช้ phage lysate จำนวน 15 ml ขั้นสุดท้ายได้ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer จำนวน 30 μl ปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะนำดีเอ็นเอดังกล่าวซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) มาย่อยด้วยเอนไซม์ Eco RI เพื่อแยกชิ้น cDNA ออกมาจากดีเอ็นเอของแลมด้าจีที 11

1. ดีเอ็นเอของแบคทีริโอฝาจแลมด้าจีที 11
2. เอนไซม์ Eco RI
3. 10 x Eco RI buffer
4. sterile distilled water
5. 10 x gel loading buffer
6. 5 x TBE buffer
7. Ethidium bromide 10 mg/ml
8. Agarose (elctophoresis grade)
9. อ่างน้ำอุ่น
10. electophoresis chamber
11. power supply
12. UV Transilluminator

วิธีทำ

1 นำดีเอ็นเอของแบคทีริโอฝาจแลมด้าจีที 11 มา 16 μl ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

2 เติม 10 x Eco RI buffer ลงไป 6 μl

3 เติม sterile distilled water ลงไป 7 μl

4 เติมเอนไซม์ Eco RI ลงไป 3 μl

5 นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง

6 เติม 10 x gel loading buffer ลงไป 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปแยกในอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟลิซิส โดยหยอด DNA ทั้งหมดลงใน 1 หลุมของอะกาโรสเจล

7 ในหลุมอีกหลุมหนึ่งข้างๆ ให้หยอดดีเอ็นเอที่ไม่ถูกย่อยด้วย Eco RI ลงไปด้วยเพื่อเปรียบเทียบโดยนำดีเอ็นเอมาประมาณ 5 ไมโครลิตร เติมน้ำลงไป 4 ไมโครลิตร และ 10 x gel loading buffer 1 ไมโครลิตร

8 เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 50-60 โวลท์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสี bromophenol blue เคลื่อนที่ไปได้ประมาณ 80 % ของความยาวของอะกาโรสเจล

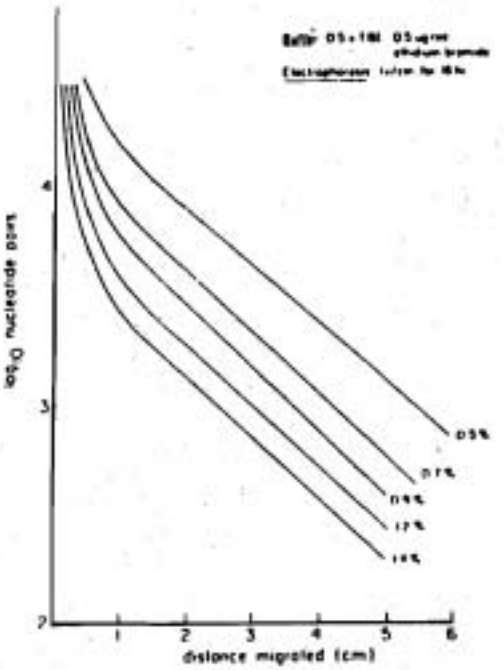
9 ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำเจลไปวางบน UV Transilluminator และบันทึกภาพไว้ (ถ้าโดลนที่นักศึกษาคัดเลือกมาเป็น recombinant แลมด้าจีที 11 จะพบแถบดีเอ็นเออย่างน้อย 2 แถบ แถบที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 48 kbp คือดีเอ็นเอของเวคเตอร์ λ gt 11 ส่วนแถบที่มีขนาดเล็กกว่าเป็นซีดีเอ็นเอของข้าวที่ถูกตัดออกมาด้วยเอนไซม์ Eco RI)

ปฏิบัติการที่ 5
อะกาโรสเจลอิเล็กโทโฟริซิสของดีเอนเอ
(Agarose Gel Electrophoresis of DNA)

อิเล็กโทรโฟริซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงรูปของโมเลกุลของสาร การแยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส มักทำให้ตัวกลางที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่พวกโพลีเมอร์ สำหรับดีเอ็นเอนิยมแยกโดยใช้อะกาโรส หรือโพลีอะคริลาไมด์เป็นตัวกลาง การแยกดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเป็นตัวกลางเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม เพราะเป็นเทคนิคที่ใช้แยก บ่งชี้และทำชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้สะดวกและรวดเร็ว เนื่องจากการเตรียมอะกาโรสเจลทำได้สะดวกกว่าการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล การตรวจหาแถบของดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันสามารถทำได้โดยการย้อมอะกาโรสเอธิเทียมโบรไมด์ แล้วตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์กับดีเอ็นเอ ซึ่งจะเรืองแสง(fluorescence) เมื่อส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต แถบดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำเพียง 10 นาโนกรัม สามารถถูกตรวจพบได้โดยวิธีนี้ การแยกดีเอ็นเอโดยโพลีอะคริลาไมด์ยุ่งยากกว่า แต่มีอำนาจการแยก (resolving power) สูงกว่าอะกาโรสเจลมากโดยสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงคู่เบสเดียวออกจากกันได้ จึงใช้ได้ดีในเทคนิคการหาลำดับเบส (DNA sequencing)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

อะกาโรสเป็นสารโพลีเมอร์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ถ้ากำหนดให้โครงรูปของดีเอ็นเอเป็นแบบเส้นตรง ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของโมเลกุลกับระยะทางที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถแสดงได้ในรูปของกราฟดังภาพที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าสำหรับแต่ละความเข้มข้นของอะกาโรสเจลจะมีช่วงที่การเคลื่อนที่กับ log ของขนาดโมเลกุลมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงจ ซึ่งช่วงขนาดของดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางนั้นได้รวบรวมไว้ตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดีเอ็นเอกับการเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ

ในปัจจุบันมีการใช้อะกาโรสในงานอิเล็กโทรโฟริซิสเพิ่มมากขึ้นทั่วโลก ผู้ผลิตหลายบริษัทจึงทำการผลิตอะกาโรสชนิดพิเศษสำหรับใช้ในงานอิเล็กโทโฟริซิส โดยเฉพาะซึ่งเป็นอะกาโรสที่บริสุทธิ์ปราศจากสารเจือปนซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไปหลังจากแยกดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล และปราศจากการปนเปื้อนจากนิวคลีเอสซึ่งทำลายกรดนิวคลีอิก

ในการเตรียมเจลจะนำอะกาโรสมาหลอมในบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ประมาณ 8 แล้วเทลงในถาดรองเจล เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วจึงทำการหยดดีเอ็นเอลงในหลุมแล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่เจล ดีเอ็นเอ ซึ่งมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆต่อไปนี้

1. **ขนาดของดีเอ็นเอ**

อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะแปรผกผันกับ $\log_{10}$ ของจำนวนคู่เบส ดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าเพราะมีแรงเสียดทานมากกว่า และโมเลกุลจะเคลื่อนผ่านรูของเจลยากกว่า

2. **ความเข้มข้นของอะกาโรส**

ขณะที่ให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านรูภายในเจล ถ้ารูมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะสูงกว่าเจลที่มีรูขนาดเล็ก ขนาดของรูภายในเจลจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส อะกาโรสยิ่งมีความเข้มข้นมากรูภายในจะมีขนาดเล็กลง การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรส จะมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรส ตามสมการ

$\log u = \log u_0 - K_r T$

u = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจล

u_0 = ระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในสภาพที่ไม่มีในอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง(retardation coefficient)

ตารางที่ 1 ช่วงขนาดดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระยะทางที่เคลื่อนที่ไปในอะกาโรสเจลความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (%)	ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด(กิโลเบส)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

3. โครงรูปของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่อยู่ในโครงรูปที่ต่างกันจะเคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลในอัตราที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล ความแรงของกระแสไฟฟ้าและความแรงอิออนของบัพเฟอร์ โดยทั่วๆ ไป สำหรับพลาสมิดดีเอ็นเอ โครงรูปแบบซูเปอรเฮลิคัล(superhelical) จะเคลื่อนที่เร็วกว่าแบบเส้นตรง(linear) ส่วนแบบวงกลมนิก(nicked circular) จะเคลื่อนที่ช้าที่สุด

4. องค์ประกอบของบัพเฟอร์

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและความแรงอิออน

ของบัพเฟอร์ บัพเฟอร์ที่นิยมใช้สำหรับอิเลกโทรโฟริซิสของดีเอ็นเอมี 4 ชนิด ดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 2นิยมเตรียมบัพเฟอร์เข้มข้นเก็บไว้ เช่น 10X buffer หมายความว่าเป็นบัพเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้จริง TAE, TPE และ TBE ใช้กับดีเอ็นเอสายคู่ ส่วนบัพเฟอร์ด่าง(alkaline buffer) ใช้กับดีเอ็นเอสายเดี่ยว

ตารางที่ 2 แสดงบัพเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของดีเอ็นเอ

บัพเฟอร์	ความเข้มข้นที่ใช้ในอิเล็กโทรโฟริซิส (working solution)	บัพเฟอร์เข้มข้น/1000 ml (stock solution)
Tris-acetate (TAE)	1X:0.04 M Tris-acetate 0.001 M EDTA	10X:48.4 g Tris base 11.4 ml glacial aceticacid 20 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-phosphate (TPE)	1X:0.09 M Tris-phosphate 0.002 M EDTA	10X:108 g Tris base 15.5 ml 85% phosphoric acid 40 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-borate (TBE)	0.5X:0.045 M Tris-borate 0.002 M EDTA	5X:54 g Tris base 27.5 ml boric acid 20 ml of 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Alkaline Butter	1X:50mM NaOH 1 mM EDTA	10X:5 ml 10 N NaoH 2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

วัสดุและอุปกรณ์

1. agarose (electrophoresis grade)
2. 5x TBE buffer
3. Ethidium bromide 10 mg/ml
4. 10 x gel loading buffer
5. elctrophoresis chamber(mini gel)

6. power supply
7. UV transilluminator
8. Polaroid Camera

<u>วิธีทำ</u>

1. เตรียมถาดรองเจล (gel mould) วางบนพื้นเรียบ
2. ชั่ง agarose จำนวนที่ต้องการลงในฟลาสก์ เติม electrophoresis buffer (1 X TBE) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการโดยทั่ว ๆ ไป mini-gel มักใช้ปริมาณ agarose 35-40 ml ถ้าต้องการเตรียม 0.8 % agarose gel ใช้ agarose 0.32 กรัมต่อบัพเฟอร์ 40 ml
3. ทำให้ agarose ละลายโดยแช่ฟลาสก์ในน้ำเดือด หรือในเตาไมโครเวฟนำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นลงถึงประมาณ 60 °C เติม ethidium bromide (10 mg/ml) ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 μg/ml (2 ไมโครลิตรต่อ 40 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนฟลาสก์เบา ๆ
4. เท agarose ลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศวาง comb ลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดรองเจล ให้ซี่ของ comb อยู่ห่างจากปลายของเจลประมาณ 1 ซม. รอให้เจลแข็งตัว
5. หลังจากเจลแข็งตัว นำถาดไปวางใน electrophoresis tank เท buffer (1X TBE) ลงไปจนท่วมเจลให้บัพเฟอร์ท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 มม. ค่อย ๆดึง comb ออก
6. ผสม DNA sample กับ gel-loading buffer แล้วหยอดตัวอย่างลงในช่องโดยใช้ disposable micropipette (gel-loading buffer คือบัพเฟอร์ที่มีสีย้อม 2 ชนิด คือ bromphenol blue กับ xylene cyanol, brompheol blue จะเคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอ ๆ กับดีเอ็นเอซึ่งยาวประมาณ 300 คู่เบสและเคลื่อนที่เร็วกว่า xylene cyanol ประมาณ 2.2 เท่า xylene cyanol เคลื่อนที่ในอัตราเร็วพอ ๆกับดีเอ็นเอคู่ซึ่งยาวประมาณ 4 kb นอกจากนี้ยังมี glycerol หรือ sucrose ผสมอยู่ เพื่อถ่วงให้ดีเอ็นเอตกลงสู่ก้นหลุม มักจะเตรียม gel - loading buffer ที่เข้มข้นกว่าที่ใช้จริง 10 เท่า ดังนั้น ถ้ามีดีเอ็นเอตัวอย่างอยู่ 10 ไมโครลิตร ใช้ gel - loading buffer 1 ไมโครลิตร ในการทำอิเล็กโทรโฟริซิสทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐานที่รู้ขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมักจะหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ลงในหลุมซ้ายมือสุด ดีเอ็นเอมาตรฐานที่นิยมใช้คือ แลมด้าดีเอ็นเอตัดด้วยเอนไซม์ Hind III หรือ Eco RI หรือทั้งสอง

7. เมื่อหยอดตัวอย่างเรียบร้อยทุกหลุมแล้ว ปิดฝา electrophoresis chamber แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply ตั้ง voltage สูงประมาณ 1-5 โวลท์/ซม. ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จาก cathode (ขั้วสีดำ)ไปยัง anode(ขั้วสีแดง) อย่าตั้ง voltage ให้สูงเกินไป จะทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งจะทำลายดีเอ็นเอ โดยทั่วๆ ไปสำหรับ mini-gel ใช้ 50-60 โวลท์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อ bromphenol blue เคลื่อนไปได้ประมาณ 80 % ของความยาวเจล หยุดกระแสไฟฟ้า นำเจลออกมาแล้วนำไปวางบน UV Transilluminator เพื่อตรวจดูผลการแยก บันทึกภาพด้วยกล้องโพลารอยด์

การเตรียมสารละลาย

1. 5x TBE (0.045 M Tris-borate,0.001 M EDTAO

   54 กรัม Tris base

   27.5 กรัม Boric acid

   20 ml 0.5 M EDTA(pH8.0)

   ละลายน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2. 1 x TBE

   5 x TBE 1 ส่วน:น้ำ 4 ส่วน

3. 10 mg/ml ethidium bromide

   ชั่ง ethidium bromide 100 มิลิกรัม ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร โดยการกวนบน magnetic stirrer

   1-2 ชั่วโมง เก็บไว้ในขวดหุ้มอะลูมิเนียมฟอยล์ (ethidium bromide อาจเป็น strong mutagen สวมถุงมือตลอดเวลาที่เกี่ยวข้องกับสารนี้)

4. 10 x gel-loading buffer

   0.4 % bromophenol blue

   0.4 % xylene cyanol

   50 % glycerol in water

ปฏิบัติการที่ 6
การแยกแถบดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล
(Recovery of DNA from agarose gel)

ในปฏิบัติการบทที่ 4 นักศึกษาได้ย่อย recombinant λgt 11 DNA ด้วยเอนไซม์ Eco RI และแยกด้วยอิเล็กโทรโฟริซิส ในปฏิบัติการนี้ นักศึกษาจะแยกแถบ cDNA ออกมาจากวุ้นอะกาโรสมีหลายวิธี ตามที่บรรยายในบทนี้ แต่จะให้นักศึกษาทำเพียงวิธีเดียว คือวิธี Prep-A-Gene DNA purification system (Bio-RAD)

วัสดุและอุปกรณ์

1. แถบดีเอ็นเอในวุ้นอะกาโรสจากบทปฏิบัติการที่ 4
2. สารละลาย 0.3 M Na acetate, 1 mM EDTA
3. 3 M Na acetate pH 5.2
4. low melting temperature agarose
5. TE buffer
6. Phenol : chloroform : isoamyl alcohol
7. Absolute ethanol
8. Prep-A-Gene Matrix DNA Purification Kit (Nio-Rad)
9. NA 45 nitrocellulose membrane
10. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
11. automatic pipettor และ pipet tips
12. เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์
13. อ่างน้ำอุ่น
14. ไนโตรเจนเหลว

<u>วิธีทำ</u> (Prep-A-Gene DNA purification system (Bio-RAD)

1. ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกมานำชิ้นวุ้นไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์นำไปปั่นเหวี่ยงให้ชิ้นวุ้นตกลงที่ก้นหลอด คาดคะเนปริมาตรของวุ้นว่าเป็นเท่าใด

2. เติม binding buffer ลงไปจำนวน 3 เท่าของปริมาตรวุ้น แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37-55 °C ประมาณ 10-20 นาที จนกระทั่งวุ้นละลายหมด
3. เติม prep-A-Gene matrix ลงไป (5 μl ต่อ 1 μg DNA) ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดกลับไปมาเป็นเวลา 10 นาที DNA จะได้ตัวกับ matrix
4. นำไปปั่นเหวี่ยง 30 วินาที ให้ matrix ตกตะกอนดูด supernatant ทิ้งไปแล้วล้าง matrix ด้วย washing buffer ปริมาตร 25 เท่าของปริมาตร matrix ที่ใช้ในข้อ 3.
5. ล้าง matrix ด้วย washing buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง ในการล้างครั้งสุดท้ายดูด washing buffer ทิ้งให้หมด
6. ชะ DNA ที่เกาะอยู่กับ matrix ออกโดยเติม elution buffer ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ matrix ที่ใช้ในข้อ 3 แล้วแช่ในอ่างน้ำอุ่น (37-50°C) เป็นเวลา 5 นาที
7. นำไปปั่นเหวี่ยง 1-2 นาที ให้ matrix ตกตะกอน ย้าย supernatant ซึ่งมีดีเอ็นเออยู่ไปใส่หลอดใหม่ นำดีเอ็นเอไปใช้ต่อได้ทันทีโดยไม่ต้องทำ ethanol precipitation

ปฏิบัติการที่ 7
การโคลนดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pGEM3Z
(Cloning in pGEM3Z plasmid vector)

ในบทปฏิบัติการที่ 4 และ 6 ที่ผ่านมาได้เตรียม DNA จากโคลนของ λgt 11 ย่อย DNA ด้วยเอ็นไซม์ Eco RI และได้แยกชิ้น cDNA ออกมาจากอะกาโรสเจลแล้ว ในปฏิบัติการนี้จะโคลน cDNA นั้นเข้าสู่ vector ชนิดใหม่คือ plasmid ชนิด pGEM3Z (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Promega) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่นิยมใช้กันมากชนิดหนึ่ง

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. cDNA ที่ต้องการโคลน (จากปฏิบัติการที่ 6)
2. pGEM3Z DNA
3. glycerol stock ของเซลล์ E. coli strain JM 109
4. agarose
5. 5xTBE buffer

6. ethidium bromide 10 mg/ml
7. เอนไซม์ Eco RI
8. Eco RI 10 x buffer
9. เอนไซม์ T4 DNA ligase
10. DNA ligase 10x buffer
11. LB-medium
12. LB-agar plate และ LB-ampicillin agar plate
13. 50 mM CaCl2
14. selection plates (LB agar + 100 μg/ml ampicillin + 0.1 mM IPTG + 50μ g/ml X-gal)
15. petri dishes
16. หลอดไร้เชื้อขนาด 50 ml
17. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
18. autometic pipettors และ pipet tips
19. อ่างน้ำอุ่น
20. ตู้ถ่ายเชื้อแบบไบโอฮาซาด
21. กะบะน้ำแข็ง
22. ตู้เพาะเชื้อ

วิธีทำการทดลอง

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> Determination of the amount of cDNA insert

โดยจะต้องทราบโดยประมาณว่า cDNA ที่ dilute ออกจาก agarose gel นั้นมีปริมาณเท่าใด โดยการ run agarose gel ของตัวอย่าง cDNA เทียบกับ standard DNA ที่ทราบปริมาณ เช่น λDNA (บริษัท Gibco BRL) โดยนำ λDNA (10 ng/μl) จำนวน 2 μl, 4 μl, 6 μl load ลงในหลุมที่ 1, 2, 3 ของ 1% agarose gel ตามลำดับแล้วหยอดตัวอย่าง cDNA ที่เตรียมได้ลงในหลุมที่เหลือ (แบ่ง cDNA มาประมาณ 2-5 ไมโครลิตร) run electrophoresis ตามปกติ นำ gel ไปวางบน UV transilluminator จะสามารถทราบ

ปริมาณ cDNA โดยประมาณได้ โดยเปรียบเทียบกับความสว่างของแถบ cDNA กับความสว่างของ λDNA

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> Digestion of pGEM vector with Eco RI

Set up Eco RI digestion ของ pGEM DNA ดังนี้

PGEM DNA	1 μl (ความเข้มข้น 0.5 μg/μl)
10 x Eco RI buffer	1 μl
Enzyme Eco RI	1 μl
Sterile distilled water	7.5 μl
Total volume	10 μl(pGEM DNA เข้มข้น 50 ng/μl)

Incubate ที่ 37 °C 1-2 ชั่วโมง

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> Ligation of pGEM DNA to cDNA

3.1 การหา vector : insert ratio ที่เหมาะสม

โดยทั่ว ๆ ไป มักใช้ 1 : 1 หรือ 1 : 3 molar ratio ของ vector : insert ใช้สูตรต่อไปนี้ ในการเปลี่ยน molar ratio เป็น mass ratio

$$\frac{\text{Ng of vector x kb size of insert}}{\text{Kb size of vector}} \times \text{molar ratio of insert / vector}$$

$$= \text{ng of insert}$$

3.2 Set up ligation of reaction

pGEM 3Z DNA จากขั้นตอนที่ 2	100 ng (1 μl)
cDNA insert	.... Ng (ตามที่คำนวณได้จาก ขั้นตอนที่ 3.1)
T4 DNA ligase enzyme	1 unit (1μl)
Ligase 10 x buffer	1 μl
เติม nuclease-free water จนครบ	10 μl

Incubate ที่ 22 °C 3 ชั่วโมง หรือ 4 °C 16 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

โดยจะต้อง set up ligation reaction อีกหลอดหนึ่งเป็นหลอดควบคุม ซึ่งไม่ใส่ cDNA insert โดยใส่น้ำแทนให้มีปริมาตรทั้งหมด 10 μl

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> Transfornation of pGEM DNA into host cells

4.1 Preparation of competent host cells (E. coli strain JM 109)

1. streak plate ของ E. coli JM 109 บน LB plate
2. Incubate single colony ใน 5 ml ของ LB medium เขย่าข้ามคืนที่ 37 °C
3. วันรุ่งขึ้น inoculate 1 ml ของ overnight culture ลงใน 100 ml ของ fresh LB medium เขย่าที่ 37 °C จนกระทั่งได้ค่า OD_{600} ประมาณ 0.4-0.6 ใช้เวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง
4. แช่เซลล์ในกะบะน้ำแข็งแล้วนำไป centrifuge ที่ 3,500 x g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 °C
5. resuspend เซลล์ด้วย 0.4 volume ของ ice-cold 50 mM $CaCl_2$
6. แช่เซลล์ไว้ในกะบะน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
7. centrifuge ที่ 3,500 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C
8. resuspend เซลล์ด้วย 1/25 original volume ของ ice-cold 50 mM CaCl2 (culture 100 ml ใช้ CaCl2 4 ml) ต้องทำอย่างเบามือที่สุดเพราะเซลล์จะแตกได้ง่าย
9. แช่กะบะน้ำแข็งไว้อีกอย่างน้อย 60 นาที แล้วจึงแบ่งใส่หลอด ๆ ละ 200 μl แล้วนำไปใช้ทำ transformaion ได้เลย ถ้ายังไม่พร้อมที่จะทำ transformation ต้องการเก็บเซลล์ไว้ให้เติม sterile glycerol ลงไป หลอดละ 40 μl แล้วเก็บไว้ที่ –70 °C freezer ได้ประมาณ 2-3 เดือน

4.2 Transformation of JM 109 competent cells

1. เติม pGEM DNA จำนวน 1 μl (จากขั้นตอนที่ 3.2) ลงใน 200 μl ของ E.coli JM 109 competent cells (จาก step 5.1) ผสมให้เข้ากัน
2. เติม pGEM DNA จำนวน 5 μl (จากขั้นตอนที่ 3.2) ลงใน 200 μl ของ E.coli JM 109 competent cells อีกหลอดหนึ่ง
3. แช่หลอดทั้งสองในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
4. ย้ายหลอดมาแช่ใน water bath (42°C) เป็นเวลา 2 นาที (heat shock)

5. ย้ายกลับไปแช่น้ำแข็งอีก 2 นาที
6. เติม LB medium ลงไป หลอดละ 0.5 ml นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นที่ 37 °C เป็นเวลา 1-1.5 ชั่วโมง
7. plate 100 μl ของ transformation mixture ลงใน selection plates (selection plate คือ LB medium + 100 μg/ml ampicillin + 0.1 mM IPTG + 50 μg/ml X-gal)
8. Incubate plate ข้ามคืนที่ 37°C
9. ตรวจสอบและนับจำนวน recombinant colonies (สีขาว) non-recombinant colonies (สีน้ำเงิน)
10. ทำขั้นตอนที่ 1-9 กับ ligation reaction ชุดควบคุมด้วย

<u>การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย</u>

1. LB medium

   ดูท้ายบทปฏิบัติการที่ 1

2. LB agar plate

Bacto-tryptone	10 กรัม
Bacto-yeast extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Bacto-agar	15 กรัม

ละลายน้ำจนได้ปริมาณทั้งหมด 1000 ml ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1N NaOH ฆ่าเชื้อโดยการออโตเครฟ รอจนเย็นลง (อุณหภูมิประมาณ 50 °C) เทลงในจานเพาะเชื้อแล้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 82 มม. จานละประมาณ 25 ml ทิ้งไว้ให้แข็งแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

3. IPTG / X-gal selection plates

   เตรียม LB agar ปริมาตร 1000 ml ตามข้อ 2 ก่อนเทลงในจานเพาะเชื้อเติมสารละลายต่อไปนี้

ampicillin (100 mg/ml)	จำนวน 1 ml
IPTG (0.1 M)	จำนวน 1 ml
X-gal (50 mg/ml)	จำนวน 1 ml

ปฏิบัติการที่ 8
การแยกพลาสมิดดีเอ็นเอ
(Isolation of plasmid DNA)

วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* JM 109 ที่ transform ด้วยพลาสมิด pGEM 3Z (จากปฏิบัติการที่ 7)
2. LB medium
3. ampicillin 100 mg/ml
4. miniprep lysis buffer
5. 1 N NaOH
6. 10% SDS
7. 3 M Potassium acetate pH 4.8
8. phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)
9. chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)
10. 3 M Na acetate pH 5.2
11. Ethanol (Absolute)
12. Rnase A 10 mg/ml
13. STE buffer
14. 10 M Ammonium acetate
15. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
16. automatic pipettor และ pipet tips
17. อ่างน้ำอุ่น
18. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

<u>วิธีทำ</u> Plasmid Miniprep (Serghini' s method)

1. เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวสีขาว 3 โคโลนีและโคโลนีสีน้ำเงิน 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium + 100 μl/ml ampicillin จำนวน 10 ml

2. นำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืน จำนวน 1.5 ml ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 2 นาที (เก็บเชื้อที่เหลือไว้ที่ 4°C)

3. ดูด supernatant ทิ้งไป

4. ละลายตะกอนเซลล์ด้วย STE buffer 100 µl

5. เติม phenol : chloroform : isoammyl alcohol (25 : 24 : 1) จำนวน 100 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer

6. นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที ย้าย supernatant ไปใส่ในหลอดใหม่แล้วเติม 10 M ammonium acetate ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 M

7. เติมเอธานอลที่เย็นจัด 2 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันแล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที

8. นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลานาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ผึ่งให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 14 µl

9. เติม Rnase A (10 mg/ml) จำนวน 2 µl นำไปแช่อ่างน้ำอุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด RNA

10. เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอไว้ในตู้แช่แข็ง -20°C

<u>การเตรียมสารละลาย</u>

1. miniprep lysis buffer

ประกอบด้วย 25 mM Tris-HCL pH 8.0

10 mM	Na_2EDTA
50 mM	glucose
2 mg/ml	lysozyme

2. สารละลาย 0.2 N NaOH, 1% SDS (เตรียมก่อนการทดลอง)

1 N NaOH	1	มิลลิลิตร
10% SDS	0.5	มิลลิลิตร
sterile H_2O	3.5	มิลลิลิตร
รวม	5	มิลลิลิตร

3. สารละลาย Rnase A ที่ปราศจากการปนเปื้อนของ Dnase

ละลาย Rnase A 10 มิลลิกรัม ในสารละลาย 10 mM Tris pH 7.5, 15 mM NaCl จำนวน 1 ml นำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลาย Dnase แล้วปล่อยให้เย็นลงอย่างช้าๆ แบ่งสารละลายออกเป็นส่วนเล็กๆ หลายๆ หลอดเก็บไว้ที่ -20°C

4. 3 M K acetate, pH 4.8 ละลาย K acetate. $3H_2O$ จำนวน 8.16 กรัมในน้ำ 16 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 4.8 ด้วย glcial acetic acid ปรับปริมาตรให้เป็น 20 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

5. TE buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA)

ผสมสารละลาย	1 M Tris-HCL, pH 8.0	0.1 มิลลิลิตร
	0.5 M EDTA, pH 8.0	20 ไมโครลิตร
	เติม sterile H_2O ให้ได้ปริมาตร	10 มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

6. STE buffer

1 M Tris-HCL pH 7.5	1 ml
0.5 M Na_2EDTA	0.2 ml
5 M NaCl	2 ml

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลฟ

ตัวอย่างผลการทดลอง

Vector	Tube	Plate (μl)	Blue colony	White colony	% Recombinant
PGEM DNA Eco RI-cut religated	1	100	-	-	0
PGEM DNA Eco RI-cut A7 cDNA	2	50	112	11	12.3
PGEM DNA Eco RI-cut A7 cDNA	2	100	300	20	6.25
PGEM DNA Eco RI-cut A7 cDNA	2	150	463	37	7.4

PGEM DNA EcoRI-cut λ2 cDNA	3	50	?	53	-
PGEM DNA EcoRI-cut λ2 cDNA	3	100	800	100	?
PGEM DNA EcoRI-cut λ2 cDNA	3	150	-	113	?
PGEM DNA	4	50	-	-	?

ปฏิบัติการที่ 9
การแยกสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช
(Isolation of DNA from plant tissues)

การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนจำเป็นต้องมีการแยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การแยกดีเอ็นเอออกจากเนื้อเยื่อพืชมีหลายวิธี มีหลักการโดยทั่วไปโดยทำให้เซลล์แตกโดยการบด ทำลายเมมเบรนที่ห่อหุ้มนิวเคลียสด้วยดีเทอร์เจนท์ ทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดย phenol extraction และ ethanol precipitation ทำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ Rnase

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. เนื้อเยื่อพืชซึ่งควรเป็นเนื้อเยื่อสดและเป็นส่วนที่มีอายุน้อยเช่น ต้นอ่อน ใบอ่อน
2. extraction buffer
3. 20% SDS
4. β-mer captoethanol
5. isopropanol
6. TE buffer เอนไซม์ RnaseA (10 mg/ml)
7. Phenol : chloroform : isoamyl alcohol
8. chloroform : isoamyl alcohol
9. absolute alcohol

10. 70% ethanol
11. 7.5 M ammonium acetate
12. refigurated high-speed centrifuge
13. microcentrifuge
14. หลอดเซนตริฟิวจ์
15. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
16. โกร่ง
17. กะบะน้ำแข็ง
18. อ่างน้ำอุ่น

<u>วิธีการ</u> ดัดแปลงจาก Graham et. al., 1994.

1. บดเนื้อพืชหนัก 1 กรัมในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวบดจนเป็นเนื้อละเอียด
2. ย้ายเนื้อเยื่อไปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วเติม extraction buffer ลงไป 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดแล้วนำไปแช่อ่างน้ำอุ่นที่ 55 °C เป็นเวลา 20 นาที
3. นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 5 นาที
4. ย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่เติม chloroform : isoamyl alcohol (41 :, 1) ปริมาตรเท่ากัน
5. ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาเป็นเวลา 2 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 นาที
6. ย้าย supernatant ไปใส่หลอดใหม่แล้วเติม 7.5 M ammonium acetate ลงไปในปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรเดิมแล้วเติม absolute ethanol (เย็นจัด) ลงไป 2 เท่าของปริมาตรเดิม แช่ไว้ในตู้แช่แข็ง (-20 C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที
8. เท supernatant ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer 50 µl

<u>การเตรียมสารละลาย</u>

1. extraction buffer (วิธีที่ 1)

9.1 g sorbitol

1.21 g Tris-base

0.94 g Na_2 EDTA

ในปริมาตรทั้งหมด 100 ml ปรับ pH เป็น 7.5 ฆ่าเชื้อโดยการออโตเครฟ

2. 20% SDS ละลาย SDS 20 กรัม ในน้ำให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 200 ml (ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ไม่ต้องออโตเครฟสารละลาย SDS เข้มข้น
3. 5 M potassium acetate
4. extraction buffer (วิธีที่ 2)

(2% CTAB , 100 mM Tris-HCl , 1.4 M NaCl , 20 mM EDTA)

CTAB	2 กรัม
1 M Tris-HCl pH 8.0	10 ml
NaCl	8.18 กรัม
0.5 M EDTA	4 ml

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ฆ่าเชื้อโดยออโตเครฟ

5. 7.5 M ammonium acetate
6. Phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 :24 :1)
   - ทำ phenol ให้เป็นของเหลวโดยนำขวด phenol ไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่ 65 °C แล้วเติม 8-hydroxyquinoline ลงไป 0.1 กรัมต่อ phenol 100 มิลลิลิตร
   - เติม 1M Tris-HCl pH 8.0 ลงไป 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ชั้น phenol และชั้นน้ำ aqueous phase แยกออกจากกัน
   - ตรวจ pH ของชั้นน้ำ (ชั้นบน) ดูว่ามากกว่า 7.5 หรือไม่ ถายังต่ำกว่า 7.6 ให้ดูดเอาชั้นน้ำทิ้งแล้วเติม 1 M Tris-HCl pH 8.0 ลงไปอีก
   - ทำซ้ำจนกว่า pH ของชั้นน้ำมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 7.5
   - เก็บ phenol เหลวไว้ในขวดสีน้ำตาลที่ 4 C โดยมี TE อยู่ชั้นบน
   - เมื่อต้องการใช้ผสม phenol กับ chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) ในสัดส่วน 1 :1
7. Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ผสม chloroform 240 ml กับ isoamyl alcohol 10 ml เก็บในขวดสีชา หรือขวดแก้วหุ้มอลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิห้อง

ปฏิบัติการที่ 10

การหาปริมาณดีเอ็นเอ และปริมาณอาร์เอ็นเอ

(Quantitative of DNA and RNA)

การหาปริมาณดีเอ็นเอ และปริมาณอาร์เอ็นเอ เป็นเทคนิคที่จำเป็นมาก เพราะเมื่อสกัด ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตได้แล้ว จำเป็นที่จะต้องทราบความเข้มข้นในตัวอย่างนั้น เพื่อที่จะทราบว่าควรจะปิเปต สารละลายกรดนิวคลีอิกปริมาตรเท่าใดไปใช้ในขั้นตอนต่อไป วิธีการที่นิยมใช้มากที่สุดมี 2 วิธี คือ

1. **วิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี** ซึ่งใช้ในกรณีที่มีปริมาณของกรด นิวคลีอิกมากพอสมควร และเป็นตัวอย่างกรดนิวคลีอิกที่มีสารปนเปื้อนเช่น โปรตีน ฟีนอล หรืออะกาโรส อยู่ในปริมาณที่ต่ำ
2. **วิธีย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์** นิยมใช้ในกรณีที่มีปริมาณของกรดนิวคลีอิกน้อย (> 250 ng/ml) และมีสารปนเปื้อนอยู่ค่อนข้างมาก

วิธีการศึกษา

การหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี

1. แบ่งสารละลายดีเอ็นเอ ที่ต้องการหาค่าความเข้มข้น มา 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมน้ำกลั่นลงไป 995 มิลลิตร แล้วนำไปหาค่า absorbance ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
2. นำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวนหาความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิก ดังนี้

   ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (μg/ml) = A_{260} x 50 μg/ml x dilution factor

   การคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย DNA

   ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (μg/ml) = A_{260} x 50 μg/ml x dilution factor

   = 0.57 x 50 x 200

   = 570 μg/ml

   = 0.57 μg/ml

   เมื่อค่า absorbanceที่ความยาวคลื่นแสง 260 = 0.57

dilution factor = 200

จากการสกัด DNA จากใบพืชแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและที่ 280 นาโนเมตร DNA ที่สกัดได้จากใบฟ้าทะลายโจร

ทำให้อยู่ในรูปหน่วย ug/ul = 0.57/1000 ug/ul

แสดงว่าใน 10 ul ของ DNA solution มีดีเอ็นเอ = 10x 0.57/1000 = 0.0057 ug

100ul มี DNA = 100 x 0.0057/10 = 0.057 ug

ในใบพืช 4 กรัม มี DNA = 0.057 ug

ถ้าใบพืช 1 กรัม มี DNA = 0.057/4 = 0.0143 ug/g

****

พระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช

พระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 ลงประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับกฤษฎีกาเล่ม 116 ตอนที่ 118 ก เมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน 2542 ซึ่งทำให้พระราชบัญญัติฉบับนี้มีผลบังคับใช้เป็นกฎหมาย ตั้งแต่วันที่ 26 พฤศจิกายน 2542

เพื่อเป็นการส่งเสริมและสร้างแรงจูงใจให้มีการพัฒนาและมีการปรับปรุงพันธุ์พืชใหม่ ภายใต้หลักความปลอดภัยทางชีวภาพ ด้วยการให้สิทธิคุ้มครองทางกฎหมาย อีกทั้งเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์ และพัฒนาการใช้ประโยชน์พันธุ์พืชพื้นเมือง และพันธุ์พืชป่า และเพื่อการกระตุ้นเร่งเร้าให้ชุมชนมีส่วนร่วมในการอนุรักษ์ และใช้ประโยชน์ในทรัพยากรทางพันธุกรรมพืชอย่างยั่งยืน

สาระสำคัญ

นิยาม <u>ความหมาย</u> ของคำภายใต้บทบัญญัติกฎหมาย

ภายใต้บทบัญญัติ ในพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 ได้กำหนดนิยามคำที่เกี่ยวข้อง เพื่อกำหนดกรอบและขอบเขตของการบังคับใช้กฎหมายให้ชัดเจน ตัวอย่างเช่น

"พืช" หมายถึง สิ่งมีชีวิตในอาณาจักรพืช และให้รวมถึง เห็ดและสาหร่าย แต่ไม่รวมถึงจุลชีพอื่น จะเห็นได้ว่าเจตนารมย์ของพระราชบัญญัติ ต้องการให้ครอบคลุมถึง เห็ดและสาหร่ายด้วย จึงได้กำหนดลงไปในคำนิยามของพืชเพื่อให้ชัดเจนยิ่งขึ้น ขณะเดียวกัน ไม่รวมถึงจุลชีพชนิดอื่น ๆ ทั้งนี้ จุลชีพชนิดใหม่ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์สามารถที่จะขอรับความคุ้มครองได้ภายใต้บทบัญญัติ ในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522 แก้ไขเพิ่มเติมตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

"พันธุ์พืช" คือ กลุ่มของพืชที่มีพันธุกรรมและลักษณะทางพฤกษศาสตร์เหมือนหรือคล้ายคลึงกัน มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่สม่ำเสมอคงตัว และแตกต่างจากกลุ่มอื่นในพืชชนิดเดียวกัน และให้หมายความรวมถึง ต้นพืชที่จะขยายพันธุ์ให้ได้กลุ่มของพืชที่มีคุณ

สมบัติข้างต้น ภายใต้บทบัญญัติดังกล่าว พันธุ์พืช (cultivated variety) เป็นกลุ่มย่อยลงมาจากชนิด (species)

"พันธุ์พืชป่า" คือ พันธุ์พืชที่มีหรือเคยมีในสภาพธรรมชาติและยังมิได้นำมาใช้เพาะปลูกอย่างแพร่หลายจะเห็นได้ว่าพันธุ์พืชป่าต้องเป็นพันธุ์พืชที่มิได้ใช้เพาะปลูกอย่างแพร่หลาย ถึงแม้ว่าพันธุ์พืชนั้นได้ถูกนำออกมาจากป่าแล้ว แต่ยังไม่ได้นำมาใช้เพาะปลูกอย่างแพร่หลายก็ตาม ภายใต้บทบัญญัติในพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืชพ.ศ. 2542 ได้กำหนดให้ผู้เก็บจัดหาหรือรวบรวมพันธุ์พืชป่า เพื่อปรับปรุงพันธุ์ ศึกษาทดลอง หรือวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์ทางการค้า จะต้องได้รับอนุญาตจากเจ้าหน้าที่และต้องทำข้อตกลงแบ่งปันผลประโยชน์กับรัฐ

"การตัดต่อสารพันธุกรรม" คือ กระบวนการในการนำสารพันธุกรรมที่มีต้นกำเนิดจากสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็นสารพันธุกรรมธรรมชาติ สารพันธุกรรมที่ ดัดแปลงจากธรรมชาติหรือสารพันธุกรรมที่สังเคราะห์ขึ้น ถ่ายเข้าไปรวมหรือร่วมอย่างถาวรกับสารพันธุกรรมเดิมของพืช ทำให้มีลักษณะที่ไม่เคยปรากฏมาก่อนตามธรรมชาติ

บทบัญญัติภายใต้พระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 กำหนดให้พันธุ์พืชใหม่ที่ได้จากการตัดต่อสารพันธุกรรม (Genetically Modified Plants) จะต้องผ่านการประเมินผลกระทบทางด้านความปลอดภัยทางชีวภาพต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพหรือสวัสดิภาพของประชาชน ก่อนที่จะจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ได้

ประโยชน์ของกฎหมายที่เกษตรกรจะได้รับ

1. เกษตรกรที่เป็นนักปรับปรุงพันธุ์พืช จะได้รับความคุ้มครองพันธุ์พืชที่ตนเองเป็นผู้ปรับปรุงพันธุ์ขึ้น

2. เกษตรกรที่รวมตัวเป็นชุมชนและมีพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น จะได้รับสิทธิเป็นเจ้าของพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่นนั้น

3. พันธุ์พืชพื้นเมืองทั่วไปและพันธุ์พืชป่าที่มีอยู่ในประเทศไทย จะได้รับความคุ้มครองในรูปแบบของการแบ่งปันผลประโยชน์ จากการใช้ประโยชน์พันธุ์พืชดังกล่าวในการศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อการค้า ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจะนำเข้าสู่ กองทุนคุ้มครองพันธุ์พืช

กำหนดความหมาย

"พืช" หมายความว่า สิ่งมีชีวิตในอาณาจักรพืชและให้หมายความรวมถึงเห็ดและสาหร่าย แต่ไม่รวมถึงจุลชีพอื่น

"พันธุ์พืช" หมายความว่า กลุ่มของพืชที่มีพันธุกรรมและลักษณะทางพฤกษศาสตร์เหมือนหรือคล้ายคลึงกัน มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่สม่ำเสมอ คงตัวและแตกต่างจากกลุ่มอื่นในพืชชนิดเดียวกัน และให้หมายความรวมถึงต้นพืชที่จะขยายพันธุ์ให้ได้กลุ่มของพืชที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น

"พันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น" หมายความว่า พันธุ์พืชที่มีอยู่เฉพาะในชุมชนใดชุมชนหนึ่งภายในราชอาณาจักร และไม่เคยจดทะเบียนเป็นพันธุ์พืชใหม่ซึ่งได้จดทะเบียนเป็นพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่นตามพระราชบัญญัตินี้

"พันธุ์พืชป่า" หมายความว่า พันธุ์พืชที่มีหรือเคยมีอยู่ในประเทศตามสภาพธรรมชาติและยังมิได้นำมาใช้เพาะปลูกอย่างแพร่หลาย

"พันธุ์พืชพื้นเมืองทั่วไป" หมายความว่า พันธุ์พืชที่กำเนิดภายในประเทศหรือมีอยู่ในประเทศ ซึ่งได้มีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายและให้หมายความรวมถึงพันธุ์พืชที่ไม่ใช่พันธุ์พืชใหม่ พันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่นหรือพันธุ์พืชป่า

"สารพันธุกรรม" หมายความว่า สารเคมีที่ทำหน้าที่กำหนดลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิต โดยสามารถเป็นต้นแบบในการจำลองตนเองและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้

"การตัดต่อสารพันธุกรรม" หมายความว่า กระบวนการในการนำสารพันธุกรรมที่มีต้นกำเนิดจากสิ่งที่มีชีวิตทั้งเป็นสารพันธุกรรมธรรมชาติ สารพันธุกรรมที่ดัดแปลงจากธรรมชาติ หรือสารพันธุกรรมที่สังเคราะห์ขึ้น ถ่ายเข้าไปรวมหรือร่วมอย่างถาวรกับสารพันธุกรรมเดิมของพืชทำให้มีลักษณะที่ไม่เคยปรากฏมาก่อนตามธรรมชาติ

"สภาพทางพันธุกรรม" หมายความว่า องค์ประกอบโดยรวมของข้อมูลพันธุกรรมที่กำหนดการแสดงออกซึ่งลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตร่วมกันสภาพแวดล้อม

"ส่วนขยายพันธุ์" หมายความว่า พืชหรือส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชที่สามารถทำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้โดยวิธีปกติ ทางเกษตรกรรม

"นักปรับปรุงพันธุ์พืช" หมายความว่า ผู้ซึ่งทำการปรับปรุงพันธุ์ หรือพัฒนาพันธุ์จนได้พันธุ์พืชใหม่

"ชุมชน" หมายความว่า กลุ่มของประชาชนที่ตั้งถิ่นฐาน และสืบทอดระบบวัฒนธรรมร่วมกันมาโดยต่อเนื่อง และได้ขึ้นทะเบียนตามพระราชบัญญัตินี้

"คณะกรรมการ" หมายความว่า คณะกรรมการคุ้มครองพันธุ์พืช

"พนักงานเจ้าหน้าที่" หมายความว่า ผู้ซึ่งรัฐมนตรีประกาศแต่งตั้งให้ปฏิบัติการตามพระราชบัญญัตินี้

"อธิบดี" หมายความว่า อธิบดีกรมวิชาการเกษตร

"รัฐมนตรี" หมายความว่า รัฐมนตรีผู้รักษาการตามพระราชบัญญัตินี้

หมวดที่ 2 พันธุ์พืช

มาตรา 11 พันธุ์พืชตามพระราชบัญญัตินี้ต้องประกอบด้วยลักษณะดังต่อไปนี้

(1) มีความสม่ำเสมอของลักษณะประจำพันธุ์ ทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา หรือคุณสมบัติอื่นที่เป็นผลเนื่องจากการแสดงออกของสภาพทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อพันธุ์พืชนั้น

(2) มีความคงตัวของลักษณะประจำพันธุ์ที่สามารถแสดงลักษณะประจำพันธุ์ได้ในทุกครั้งของการผลิตส่วนขยายพันธุ์พืชนั้น เมื่อขยายพันธุ์ด้วยวิธีทั่วไปสำหรับพืชนั้น

(3) มีลักษณะประจำพันธุ์แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างเด่นชัด ทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา หรือมีคุณสมบัติอย่างหนึ่งอย่างใด ซึ่งเป็นผลเนื่องจากการแสดงออกของ

สภาพทางพันธุกรรม ที่แตกต่างจากพันธุ์พืชอื่นลักษณะของพันธุ์พืชตาม (1) ไม่ใช้บังคับกับพันธุ์พืชป่า

การบริการตามพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช

1. รับจดทะเบียนคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่และพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น
2. ออกใบอนุญาตในการเก็บ จัดหา รวบรวม พันธุ์พืชเมืองทั่วไป พันธุ์พืชป่า หรือส่วนหนึ่ง

ส่วนใดของพันธุ์พืชดังกล่าว เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ศึกษา ทดลอง หรือวิจัย เพื่อประโยชน์ทางการค้า

3. ออกใบอนุญาตในการเก็บ จัดหา รวบรวม พันธุ์พืชเมืองทั่วไป พันธุ์พืชป่า หรือส่วนหนึ่งส่วนใด ของพันธุ์พืชดังกล่าว เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ศึกษา ทดลอง หรือวิจัย ไม่มีวัตถุประสงค์ทางการค้า
4. ทำสัญญาแบ่งปันผลประโยชน์
5. ต่ออายุ อนุญาตให้ใช้สิทธิ กำกับดูแลสิทธิและการละเมิดสิทธิ
6. ติดตามการจัดสรรผลประโยชน์
7. ตรวจสอบการแบ่งปันผลประโยชน์ในกรณีที่ใช้พันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น พันธุ์พืชป่า และพันธุ์พืชพื้นเมืองทั่วไปมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

แบ่งออกเป็น 6 ส่วน ดังนี้

1. การจดทะเบียนคุ้มครองพันธุ์พืช (กำลังดำเนินการ)
2. การขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยง
3. การขออนุญาตนำเข้าพืชอนุรักษ์
4. การขออนุญาตส่งออกพืชอนุรักษ์

5. การขออนุญาตนำผ่านพืชอนุรักษ์

6. การออกหนังสือรับรองการส่งออกพืชลูกผสมฯ

การขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยง

ผู้ซึ่งประสงค์จะทำการขยายพันธุ์เทียมพืชอนุรักษ์เพื่อการค้า ให้ยื่นคำขอขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ยื่นแบบคำขอ **พ.พ. 15** และ บัญชีประกอบแบบคำขอฯ พร้อมหลักฐานตามที่ระบุไว้ในแบบ พ.พ. 15 ต่อพนักงาน เจ้าหน้าที่ ณ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ด้วยตนเอง หรือโดยทางไปรษณีย์ ถึงพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ในกรณีขึ้นทะเบียนพืชอนุรักษ์บัญชี 1 จะต้องเสียค่าธรรมเนียมใบสำคัญ การขึ้นทะเบียน ฯ จำนวน 500 บาท (ต่อใบสำคัญการขึ้นทะเบียน 1 ฉบับ ซึ่งมีอายุ 5 ปี)

2. เมื่อเจ้าหน้าที่ได้รับแบบ พ.พ. 15 แล้วจะดำเนินการตรวจสอบเอกสาร ดังต่อไปนี้

2.1 หลักฐานประกอบแบบคำขอขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์

- ในกรณีบุคคลทั่วไป จะต้องมีสำเนาหรือรูปถ่ายบัตรประชาชน/ใบสำคัญประจำตัวอย่างอื่น ที่ราชการออกให้ และต้องมีลายมือชื่อรับรองสำเนาด้วย
- ในกรณีที่เป็นนิติบุคคล จะต้องมีสำเนาหรือรูปถ่ายหนังสือรับรองการจดทะเบียน วัตถุประสงค์ และผู้มีอำนาจลงชื่อแทนนิติบุคคลผู้ขอขึ้นทะเบียน
- ในกรณีที่ให้บุคคลใดดำเนินการแทนนิติบุคคล บุคคลนั้นต้องมีหนังสือแสดงว่าเป็นผู้ได้รับมอบหมายให้ดำเนินกิจการของนิติบุคคล

2.2 แบบบัญชีประกอบแบบคำขอขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์

- รายชื่อพืชอนุรักษ์ โดยระบุเป็นชื่อสามัญ และในกรณีที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ให้ระบุชื่อวิทยาศาสตร์ด้วย

- จำนวนพ่อ-แม่พันธุ์ที่ใช้ในการขยายพันธุ์เทียม ซึ่งจะต้องได้มาโดยชอบด้วยกฎหมาย)

- วิธีการขยายพันธุ์เทียม จำนวนเพื่อการค้าที่เป็นไปได้ตามวิธีการขยายพันธุ์เทียมนั้นการจัดการและควบคุมสภาพแวดล้อม

ในกรณีที่เอกสารไม่ครบ หรือเอกสารไม่ถูกต้องเจ้าหน้าที่จะติดต่อไปยังผู้ยื่นคำขอทางโทรศัพท์ หรือ โทรสาร หรือทาง ไปรษณีย์ ตามที่ผู้ยื่นคำขอแจ้งไว้ และผู้ยื่นคำขอต้องทำการแก้ไขให้แล้วเสร็จภายใน 30 วัน ตั้งแต่วันที่รับแจ้ง มิฉะนั้นจะถือ ว่าสละสิทธิ์ในคำขอนั้นเมื่อเจ้าหน้าที่ได้รับคำขอที่ได้แก้ไขอย่างถูกต้องแล้วจะทำการออกใบสำคัญการขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์พร้อมทั้งแบบบัญชีรายชื่อพืชอนุรักษ์ที่มีอยู่ในสถานที่เพาะเลี้ยงนั้นให้ผู้ยื่นคำขอภายใน 30 วัน

5. เมื่อผู้ยื่นคำขอได้รับใบสำคัญการขึ้นทะเบียนแล้วจะต้องปฏิบัติตามเงื่อนไขของประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องการขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยง ดังต่อไปนี้

5.1ภายในวันที่ 31 มกราคม ของแต่ละปี จะต้องจัดทำบัญชีแสดงจำนวนพืชอนุรักษ์ที่เปลี่ยนแปลงในรอบปีปฏิทิน ตามแบบ พ.พ. 17 ซึ่งในทางปฏิบัติก่อนถึงสิ้นปีปฏิทินกรมวิชาการเกษตรจะมีหนังสือเพื่อเตือนให้ทราบ

5.2 ในกรณีที่มีการเพิ่มหรือลดชนิด และจำนวนของพืชอนุรักษ์จะต้องแจ้งให้เจ้าหน้าที่ทราบโดยใช้แบบ พ.พ.18

5.3 ในกรณีที่มีการเปลี่ยน ชื่อตัว ชื่อสกุล ชื่อสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์หรือชื่อผู้ดำเนินกิจการเพิ่ม หรือ ลด หรือย้ายสถานที่เพาะเลี้ยงจะต้องแจ้งให้เจ้าหน้าที่ทราบโดยใช้แบบ พ.พ.21

6.กรณีที่ผู้มีใบสำคัญฯไม่ปฏิบัติตามข้อ 5.1 และข้อ 5.3 พนักงานเจ้าหน้าที่จะมีหนังสือสั่งการให้ผู้ได้รับใบสำคัญฯ ปฏิบัติให้ถูกต้องภายในเวลา 45 วัน ถ้าพ้นกำหนดนี้แล้วพนักงานเจ้าหน้าที่จะทำการยกเลิกใบสำคัญฯนั้น ผู้ได้รับใบสำคัญที่ถูกยกเลิกนั้น อาจขอยื่นใบสำคัญใหม่ได้ต่อเมื่อพ้นระยะเวลา 2 ปี นับตั้งแต่ใบสำคัญนั้นถูกยกเลิก

7. ใบสำคัญการขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์มีอายุ 5 ปี ดังนั้นก่อนที่ใบสำคัญจะหมดอายุ ให้ผู้ที่ได้รับใบ สำคัญฯที่มีความประสงค์จะต่ออายุใบสำคัญฯให้ยื่นคำขอตามแบบ พ.พ. 19 ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร (ควรยื่นก่อน 30 วัน ก่อนที่ใบสำคัญจะหมดอายุ)

8. ในกรณีที่ผู้มีใบสำคัญฯประสงค์จะขอใบแทนใบสำคัญฯ ให้ยื่นคำขอตามแบบ พ.พ. 20 ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ กอง คุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

การขออนุญาตนำเข้าพืชอนุรักษ์

ผู้ที่มีความประสงค์จะนำเข้าพืชหรือผลิตภัณฑ์พืชนอกจาก จะต้องปฏิบัติตามพระราชบัญญัติกักพืชแล้วจะต้องขออนุญาตนำเข้าพืชอนุรักษ์นั้น โดยปฏิบัติตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การขออนุญาตนำเข้าพืชอนุรักษ์และซากของพืชอนุรักษ์ตามวงศ์ และชนิดที่ระบุในบัญชี 1 และ 2

1.1 ยื่นคำขอตามแบบ **พ.พ. 13** ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ ด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร พร้อมเอกสารประกอบการนำเข้า ซึ่งได้แก่ หนังสืออนุญาตส่งออก จากประเทศต้นทาง (CITES Export Permit) ฉบับตัวจริง

1.2 เจ้าหน้าที่ตรวจสอบจำแนกชนิดพืชอนุรักษ์ ว่าถูกต้องตรงตามหนังสืออนุญาตส่งออกจากประเทศต้นทาง จึงจะออกหนังสืออนุญาตนำเข้า โดยลงลายมือชื่อกำกับในช่อง 13 และช่อง 14 ของแบบหนังสืออนุญาต (พ.พ. 14)

1.3 สำหรับเอกสารประกอบการนำเข้านั้นอาจใช้ใบรับรองปลอดศัตรูพืช (Phytosanitary Certificate) ฉบับตัวจริง

ในกรณีที่นำเข้าชนิดพืชอนุรักษ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (Artificially Propagated) เฉพาะจาก 10 ประเทศดังต่อไปนี้ Austria, Belgium, Denmark, Canada, Germany, Italy, Luxemburge, Netherlands, Republic of Korea, Singapore, Sweden, Switzerland

2. การขออนุญาตนำเข้าล่วงหน้าซึ่งพืชอนุรักษ์ และซากของพืชอนุรักษ์ตามวงศ์และชนิดที่ระบุในบัญชี 1 และ 2 เพื่อนำไปเป็นหลักฐานการขอหนังสืออนุญาตส่งออกจากประเทศต้นทาง

2.1 ยื่นคำขอตามแบบ พ.พ. 13 ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

2.2 พนักงานเจ้าหน้าที่ออกหนังสืออนุญาตนำเข้าโดยลงลายมือชื่อกำกับในช่อง 13 ของแบบหนังสืออนุญาต (พ.พ. 14)

2.3 เมื่อจะนำเข้าพืชอนุรักษ์และซากของพืชอนุรักษ์ดังกล่าว ให้ผู้รับหนังสืออนุญาตนำเข้ายื่นหนังสือนำเข้าพร้อมทั้งเอกสารประกอบการนำเข้าต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ ด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร

2.4 พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจสอบพืชอนุรักษ์และซากของพืชอนุรักษ์ที่นำเข้าว่าถูกต้องตรงตามที่แสดงไว้ในหนังสืออนุญาตส่งออกจากประเทศต้นทางแล้ว จึงลงลายมือชื่อกำกับในช่อง 14 ของแบบหนังสืออนุญาต หนังสืออนุญาตจึงจะสมบูรณ์

3. การขออนุญาตนำเข้าพืชอนุรักษ์และซากของพืชอนุรักษ์ตามวงศ์และชนิดที่ระบุไว้ในบัญชีที่ 3

3.1 ผู้นำเข้าพืชอนุรักษ์หรือซากของพืชอนุรักษ์บัญชีที่ 3 ที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศเนปาล โบลิเวีย บราซิล คอสตาริกาและ เมกซิโก จะต้องยื่นแบบคำขอ พ.พ.13 พร้อมหนังสืออนุญาตส่งออกจากประเทศต้นทางดังกล่าว ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ ด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร

ในกรณีที่นำเข้าพืชอนุรักษ์หรือซากของพืชอนุรักษ์ที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศอื่นที่นอกเหนือจากประเทศดังกล่าวข้างต้น ผู้นำเข้าจะต้องยื่นหลักฐานอื่นประกอบเช่น หนังสือรับรองแหล่งกำเนิด (Certificate of Origin) เป็นต้น

3.2 พนักงานเจ้าหน้าที่จะทำการตรวจสอบพืชอนุรักษ์หรือซากของพืชอนุรักษ์ที่นำเข้านั้นว่าถูกต้องตรงกับที่แสดงไว้ใน

3.3 หนังสืออนุญาตส่งออก จึงออกหนังสือนำเข้า โดยลงลายมือชื่อกำกับในช่อง 13 และ 14 ของแบบหนังสืออนุญาต (พ.พ. 14)

4. กรณีที่มีการนำเข้าพืชอนุรักษ์และซากของพืชอนุรักษ์ที่มาจากประเทศที่ไม่ได้เป็นภาคีอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่าง

ประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่า และพืชป่าที่กำลังจะสูญพันธุ์ (CITES) สามารถใช้ใบรับรองซึ่งลงนามโดยเจ้าหน้าที่ที่มีอำนาจจากประเทศเหล่านั้นได้

การขออนุญาตส่งออกพืชอนุรักษ์

ผู้ที่มีความประสงค์จะส่งออกซึ่งพืชอนุรักษ์หรือซากของพืชอนุรักษ์จะต้องขออนุญาตส่งออกกับกรมวิชาการเกษตร โดยปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

1. การขออนุญาตส่งออกพืชอนุรักษ์และซากของพืชอนุรักษ์ตามวงศ์และชนิดที่ระบุไว้ใน บัญชีที่ 1 และ 2 ที่ได้จากการ ขยายพันธุ์เทียม

1.1 ยื่นแบบคำขอ **พ.พ.13** พร้อมหลักฐานแสดงแหล่งที่มา วิธีการขยายพันธุ์เทียม หรือหมายเลขใบสำคัญการขึ้นทะเบียน สถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์ ฯ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

- ในเขตกรุงเทพมหานคร ให้ยื่น ณ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

- ในจังหวัดอื่นให้ยื่น ณ ด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร ตามที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนดไว้ดังนี้

1. ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานภูเก็ต

2. ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานหาดใหญ่

3. ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานเชียงใหม่

พนักงานเจ้าหน้าที่ออกหนังสืออนุญาตส่งออก โดยลงลายมือชื่อกำกับในช่องที่ 13 ของแบบหนังสืออนุญาต

1.3 ก่อนที่จะทำการส่งออก พนักงานเจ้าหน้าที่จะทำการตรวจพืชอนุรักษ์หรือซากของพืชอนุรักษ์ที่ส่งออกว่าถูกต้องตรง กับที่แสดงไว้ในหนังสืออนุญาตส่งออกเสร็จแล้วจึงลงลายมือชื่อกำกับในช่องที่ 14 ของแบบหนังสืออนุญาต จึงจะถือว่าเป็นหนังสือ อนุญาตส่งออกที่สมบูรณ์

2. การขออนุญาตส่งออกพืชอนุรักษ์และซากของพืชอนุรักษ์ตามวงศ์และชนิดที่ระบุไว้ใน บัญชี 1 ที่ไม่ได้มาจากการขยายพันธุ์เทียม

2.1 ยื่นแบบคำขอ พ.พ. 13 พร้อมสำเนาหนังสืออนุญาตนำเข้าจากประเทศปลายทางและวัตถุประสงค์ในการส่งออกต่อ พนักงานเจ้าหน้าที่ ณ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

2.2 พนักงานเจ้าหน้าที่จะออกหนังสืออนุญาตให้ได้ก็ต่อเมื่อ เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิชาการพืชอนุรักษ์ที่กรมวิชาการเกษตร แต่งตั้ง ขึ้นให้ความเห็นชอบว่าการส่งออกพืชอนุรักษ์หรือซากของพืชอนุรักษ์ดังกล่าว จะไม่กระทบกระเทือนต่อการอยู่รอดของพืชอนุรักษ์ ชนิดนั้นในธรรมชาติ

2.3 เมื่อเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิชาการพืชอนุรักษ์เห็นชอบ พนักงานเจ้าหน้าที่จึงออกหนังสืออนุญาตส่งออก โดยลงลายมือชื่อ กำกับในช่องที่ 13 ของแบบหนังสืออนุญาต

2.4 ก่อนที่จะทำการส่งออก พนักงานเจ้าหน้าที่จะทำการตรวจพืชอนุรักษ์หรือซากของพืชอนุรักษ์ที่ส่งออกนั้น ว่าถูกต้อง ตรงกับที่แสดงไว้ในหนังสืออนุญาตส่งออกจึงลงลายมือชื่อกำกับในช่องที่ 14 ของแบบหนังสืออนุญาต จึงจะถือว่าหนังสืออนุญาตนั้นสมบูรณ์ หนังสืออนุญาตส่งออกพืชอนุรักษ์และซากของพืชอนุรักษ์ตามวงศ์ และชนิดที่ระบุไว้ในบัญชี 1 ที่ไม่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงดังกล่าวนี้ จะออกให้ได้เฉพาะการส่งออกที่มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษา ทางวิทยาศาสตร์เท่านั้น

การขออนุญาตส่งออกพืชอนุรักษ์และซากของพืชอนุรักษ์ตามวงศ์และชนิดที่ระบุไว้ใน บัญชี 2 ที่ไม่ได้มาจากการขยายพันธุ์เทียม

3.1 ยื่นคำขอแบบ พ.พ. 13 พร้อมแนบสำเนาใบอนุญาตค้าของป่าหวงห้าม หรือ หลักฐานแสดงแหล่งที่มา กรณีไม่ใช่ ของป่าตามพระราชบัญญัติป่าไม้ พ.ศ. 2484 แล้วแต่กรณี ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

- ในเขตกรุงเทพมหานคร ให้ยื่น ณ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

BO 453 บทที่ 54

- ในจังหวัดอื่นให้ยื่น ณ ด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร ตามที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตร กำหนดไว้ดังนี้

1. ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานภูเก็ต
2. ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานหาดใหญ่
3. ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานเชียงใหม่

3.2พนักงานเจ้าหน้าที่ออกหนังสืออนุญาตส่งออก โดยลงลายมือชื่อกำกับในช่องที่ 13 ของแบบหนังสืออนุญาต

3.3 ก่อนที่จะทำการส่งออก พนักงานเจ้าหน้าที่จะทำการตรวจพืชอนุรักษ์หรือซากของพืชอนุรักษ์ที่ส่งออกว่าถูกต้องตรง

กับที่แสดงไว้ในหนังสืออนุญาตส่งออก เสร็จแล้วจึงลงลายมือชื่อกำกับในช่องที่ 14 ของแบบหนังสืออนุญาต จึงจะถือว่าเป็นหนังสืออนุญาตส่งออกที่สมบูรณ์

การขออนุญาตนำผ่านพืชอนุรักษ์

ต้องปฏิบัติตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ยื่นแบบคำขอ **พ.พ. 13** พร้อมหนังสือส่งออกจากประเทศต้นทางต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ ด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตรที่นำเข้า

2. พนักงานเจ้าหน้าที่ออกหนังสืออนุญาตนำผ่าน โดยลงลายมือชื่อกำกับในช่องที่ 13 ของแบบหนังสืออนุญาต

3. ผู้รับหนังสืออนุญาตนำผ่านพืชอนุรักษ์ หรือซากของพืชอนุรักษ์ จะต้องแสดงหนังสืออนุญาตนำผ่านพร้อมพืชอนุรักษ์หรือ ซากของพืชอนุรักษ์ที่จะนำผ่าน ให้พนักงานเจ้าหน้าที่ ณ ด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตรที่จะทำการส่งออกตรวจ

4. เมื่อพนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจสอบแล้วว่า พืชอนุรักษ์หรือซากของพืชอนุรักษ์ที่นำผ่าน ถูกต้องตรงกับที่แสดงไว้ ในหนังสือ อนุญาตนำผ่าน พนักงานเจ้าหน้าที่จึงลงลายมือชื่อกำกับในช่อง 14 ของแบบหนังสืออนุญาต จึงจะถือว่าหนังสืออนุญาตนั้นสมบูรณ์

การออกหนังสือส่งออกพืชลูกผสมฯ

นิยามคำว่าพืชลูกผสมในที่นี้ หมายถึง " พืชซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ต่างชนิดกัน โดยมีพ่อพันธุ์หรือแม่พันธุ์ หรือพ่อและแม่พันธุ์ เป็นพืชอนุรักษ์บัญชีที่ 2 หรือพืชซึ่งมีบรรพบุรุษเป็นพืช ตามอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่กำลังจะสูญพันธุ์ "

ดังนั้นผู้ที่มีความประสงค์ จะให้กรมวิชาการเกษตรออกหนังสือรับรองการส่งออกพืชลูกผสมของพืชในบัญชีแนบท้ายอนุสัญญา
ว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่กำลังจะสูญพันธุ์ให้ปฏิบัติดังนี้

1. ยื่นคำขอตามแบบคำขอ ฯ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร หรือด่านตรวจพืช กรมวิชาการเกษตร ที่จะทำการส่งออก

2. พนักงานเจ้าหน้าที่จะออกหนังสือรับรอง ฯ ให้ โดยพนักงานเจ้าหน้าที่ผู้มีอำนาจลงนาม จะลงลายมือชื่อกำกับในช่อง 13

3. เมื่อจะส่งออก พนักงานเจ้าหน้าที่จะทำการตรวจพืชลูกผสมว่าถูกต้องตรงกับที่แสดงไว้ในหนังสือรับรองฯ เสร็จแล้วจึงลงลายมือชื่อ กำกับในช่อง 14 จึงจะถือว่าหนังสือรับรองฉบับนั้นสมบูรณ์

สถานที่ติดต่อปรึกษาปัญหา

ส่วนกลาง

1. กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ
โทรศัพท์ 02-9405628 ต่อ 109-111
โทรสาร 02-9405628

2. กลุ่มนิติการและสิทธิประโยชน์ สำนักงานเลขานุการกรม กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ
โทรศัพท์ 02-5790151-7 ต่อ 111
โทรสาร 02-940-7452

3. ฝ่ายประชาสัมพันธ์ สำนักงานเลขานุการกรม กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ
โทรศัพท์ 02-5790151-7 ต่อ 109
โทรสาร 02-5794406

ส่วนภูมิภาค

1. ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ตู้ ป.ณ. 170 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50202
โทร. 053-498864 FAX. 053-498864

2. ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 2 ภายในบริเวณศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก ต.วังทอง อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130
โทร.055-311305, 311990 FAX.055-311406

3. ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ภายในบริเวณศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ถ.มิตรภาพ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000
โทร.043-241286-7 FAX.043-241286-7

4. ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 ภายในบริเวณศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี ตู้ ป.ณ.79 อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000
โทร.045-244453 FAX.045-244453

5. ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 ภายในบริเวณศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท ต.บางหลวง อ.สรรพยา จ.ชัยนาท 17150
โทร.056-413044-5 FAX.056-413044-5

6. ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6ต.พลิ้ว อ.แหลมสิงห์ จ.จันทบุรี 22190
โทร./FAX. 039-397134, 397076

7.ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7ตู้ ป.ณ.125 อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี 84000
โทร.077-286933 FAX.077-286933

8. ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 ภายในบริเวณศูนย์วิจัยยางสงขลา อ.หาดใหญ่
จ.สงขลา 90110 โทร./FAX.074-212407-8

พันธุ์พืชภายใต้บทบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ.2542

ต้องประกอบด้วยลักษณะดังนี้

1. มีความสม่ำเสมอ หมายความว่า พันธุ์พืชนั้น ๆ มีลักษณะของส่วนต่าง ๆ ที่เหมือนกัน เช่น ลักษณะต้น รูปร่างของดอก สีของดอก ลักษณะผล หรือคุณสมบัติเฉพาะอย่างหนึ่งอย่างใดที่เป็นผลจากสภาพทางพันธุกรรม

2. มีความคงตัว หมายความว่า พันธุ์พืชนั้นต้องสามารถแสดงลักษณะต่าง ๆ ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ได้ทุกครั้งที่มีการ ขยายพันธุ์ หรืออาจจะกล่าวได้ว่า จะต้องแสดงลักษณะประจำพันธุ์ที่เหมือนเดิมทุกครั้งเมื่อนำส่วนขยายพันธุ์ไปปลูก

3. มีลักษณะประจำพันธุ์แตกต่างจากพันธุ์อื่น หมายความว่า พันธุ์พืชนั้นต้องมีลักษณะที่สามารถมองเห็นได้ว่ามีความแตกต่าง จากพันธุ์อื่นอย่างเด่นชัด หรือมีคุณสมบัติอย่างใดเป็นพิเศษ ที่ทำให้แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างเด่นชัด เช่น มีความต้านทานต่อโรค พืชชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างเด่นชัด มีความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างเด่นชัด เหล่านี้เป็นต้น ลักษณะต่าง ๆ เหล่านี้ต้องเป็นผลเนื่องมาจากพันธุกรรมสำหรับพืชป่ายกเว้นลักษณะในข้อ 1 หมายความว่า พืชป่าไม่ จำเป็นต้องมีลักษณะ ตามข้อ 1 คือความสม่ำเสมอ

พันธุ์พืชที่จะได้รับความคุ้มครองตาม พ.ร.บ. คุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542

1. **<u>พันธุ์พืชใหม่</u>** หมายความว่า เป็นพันธุ์พืชที่มีลักษณะคุณสมบัติที่ไม่เคยปรากฏมาก่อนในพันธุ์นั้น

2. **<u>พันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น</u>** หมายความว่า พันธุ์พืชที่มีอยู่ใน ชุมชนใดชุมชนหนึ่งโดยเฉพาะ

3. **<u>พันธุ์พืชพื้นเมืองทั่วไป</u>** หมายความว่า พันธุ์พืชที่กำเนิดในประเทศ หรือมีอยู่ในประเทศ และได้มีการใช้ ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เป็นที่รู้จักโดยทั่วไป

4. **<u>พันธุ์พืชป่า</u>** หมายความว่า พันธุ์พืชที่มีหรือเคยมีอยู่ในประเทศตามสภาพธรรมชาติ และไม่ได้นำมาใช้ เพาะปลูกอย่างแพร่หลาย

ลักษณะการคุ้มครอง

ภายใต้พระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช การคุ้มครองพันธุ์พืชมีลักษณะแตกต่างออกไป โดยสามารถแบ่งออก เป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. พันธุ์พืชที่ได้รับความคุ้มครอง ที่ต้องจดทะเบียน ก่อนที่จะได้รับความคุ้มครอง ได้แก่ พันธุ์พืชใหม่ และพันธุ์พืช พื้นเมืองเฉพาะถิ่น

2. พันธุ์พืชที่ได้รับความคุ้มครอง โดยไม่ต้องจดทะเบียนการคุ้มครองเป็นไปโดยอัตโนมัติ กล่าวคือ ใครนำพันธุ์พืชกลุ่มนี้ไป ศึกษา ทดลอง หรือวิจัย เพื่อประโยชน์ในทางการค้า จะต้องได้รับอนุญาตจากพนักงานเจ้าหน้าที่และทำข้อตกลง แบ่งปันผลประโยชน์ โดยให้นำเงินรายได้ตามข้อตกลงแบ่งปันผลประโยชน์ส่งเข้าสู่กองทุนคุ้มครองพันธุ์พืช พืชในกลุ่มนี้ได้แก่ พันธุ์พืชพื้นเมืองทั่วไปและพันธุ์พืชป่า

คุณสมบัติของพันธุ์พืชใหม่ที่จะขอจดทะเบียน

พันธุ์พืชใหม่ที่จะนำมาขอจดทะเบียนจะต้องมีคุณสมบัติ และองค์ประกอบที่สำคัญดังนี้

1. แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างเด่นชัด

2. ต้องมีความสม่ำเสมอของพันธุ์
3. มีความคงตัวของพันธุ์

นอกจากองค์ประกอบที่เป็นลักษณะของพันธุ์พืชแล้วยังมีองค์ประกอบอื่นในการพิจารณามายื่นขอความคุ้มครองนั่นคือ พันธุ์พืชใหม่ที่จะขอความคุ้มครองต้องเป็นพันธุ์พืชที่ไม่เคยนำส่วนขยายพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ไม่ว่าในกรณีใด ๆ เกินกว่า 1ปี ก่อนวันยื่นขอความคุ้มครอง

ในการกำหนดว่าพืชชนิดใดที่ จะขอความคุ้มครองเป็นพันธุ์พืชใหม่ได้นั้น รัฐมนตรีต้องประกาศ กำหนดชนิด ที่จะมาขอรับความคุ้มครองเช่น ณ เวลานี้ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ประกาศกำหนด พืช 4 ชนิดที่ สามารถมาขอรับความคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ ดังกล่าวคือ มะม่วง ทุเรียน ข้าว และกล้วยไม้สกุลหวาย

สำหรับพันธุ์พืชใหม่ที่ปรับปรุงได้ โดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมหรือการตัดต่อพันธุกรรมพันธุ์พืช สามารถที่จะขอรับความคุ้มครองแต่มีเงื่อนไข ว่าต้องผ่านการประเมินผลกระทบต่อ สิ่งแวดล้อม สุขภาพ หรือสวัสดิภาพ ของประชาชน จากกรมวิชาการเกษตร หรือหน่วยงานที่ คณะกรรมการคุ้มครองพันธุ์พืชกำหนดเสียก่อนถึงจะได้รับการจดทะเบียนพันธุ์

การคุ้มครองพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น

ในการคุ้มครองพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่นนั้น พันธุ์พืชนั้นจะต้องมี คุณสมบัติคือมีความคงตัวสม่ำเสมอ และความแตกต่างจากพันธุ์อื่นแล้วมีอยู่ภายในชุมชนใดชุมชนหนึ่ง ภายในราชอาณาจักร ชุมชนนั้นจะต้องมาขอขึ้นทะเบียนชุมชนเสียก่อนจึงสามารถมาขอรับความคุ้มครองเป็นพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่นได้

การคุ้มครองพันธุ์พืชพื้นเมืองทั่วไปและพันธุ์พืชป่า

การคุ้มครองพันธุ์พืชพื้นเมืองทั่วไปและพันธุ์พืชป่า จะได้รับความคุ้มครองในลักษณะของผู้ใดที่นำพันธุ์พืชดังที่กล่าว แล้วไปใช้ประโยชน์ในการศึกษา วิจัย ปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อประโยชน์ทางการค้าจะต้องขออนุญาต ต้องขออนุญาตกับพนักงานเจ้าหน้าที่จะต้องทำสัญญาแบ่งปันผลประโยชน์ หมายความว่าพันธุ์พืชที่อยู่ในประเทศ

ทุกชนิดจะ ได้รับความคุ้มครอง การเข้าถึงพันธุ์พืชทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าว เพื่อประโยชน์ทางการค้า เมื่อมีผลประโยชน์ทางการค้าเกิดขึ้นต้องแบ่งปันผลประโยชน์เข้าสู่กองทุนคุ้มครองพันธุ์พืช

สิทธิที่เกิดขึ้นจากการได้รับการจดทะเบียนพันธุ์พืช

สำหรับพันธุ์พืชใหม่ ผู้เป็นเจ้าของสิทธิหรือเรียกว่าผู้ทรงสิทธิ มีสิทธิแต่ผู้เดียวในการผลิต ขาย จำหน่าย นำเข้า และส่งออกนอกราชอาณาจักร หรือมีไว้กระทำอย่างหนึ่งอย่างใด ซึ่งส่วนขยายพันธุ์ของพันธุ์พืชใหม่

สำหรับพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น ชุมชนมีสิทธิที่จะปรับปรุงพันธุ์ ศึกษา ค้นคว้า ทดลอง วิจัย ผลิต ขาย ส่งออกนอกราชอาณาจักรหรือจำหน่ายด้วยประการใด ๆ ซึ่งส่วนขยายพันธุ์ ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากพันธุ์พืชเป็นผู้กำหนด โดยให้จัดสรุปในอัตราส่วนดังนี้ผู้อนุรักษ์ 20% ชุมชน 60% องค์กรปกครองส่วนท้องถิ่น กลุ่มเกษตรกร หรือ สหกรณ์ที่เป็นผู้ทำนิติกรรม 20%

ในการขายส่วนขยายพันธุ์ของพันธุ์พืชใหม่ จะต้องแสดงเครื่องหมายให้ปรากฏที่ส่วนขยายพันธุ์ ภาชนะบรรจุหรือหีบห่อ

การคุ้มครองสิทธิของผู้ทรงสิทธิในพันธุ์พืชใหม่และพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น สิทธิของผู้ที่ได้รับความคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่มีสิทธิแต่เพียงผู้เดียวในการจำหน่าย จ่ายแจก ผลิตหรือนำเข้า ส่งออกนอกราชอาณาจักร หรือมีไว้เพื่อกระทำการอย่างใดอย่างหนึ่ง ในกรณีของพันธุ์พืชใหม่เกษตรกรได้รับอนุญาตให้ใช้ส่วนขยายพืชจากพืชที่ปลูก โดยไม่ถือว่าเป็นการละเมิดสิทธิ สำหรับสิทธิของชุมชนที่เป็นเจ้าของพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น มีเช่นเดียวกับสิทธิพันธุ์พืชใหม่ ในกรณีที่มีการฝ่าฝืนสิทธิในพันธุ์พืชใหม่หรือผู้ทรงสิทธิในพันธุ์พื้นเมืองเฉพาะถิ่น ค่าเสียหายที่เกิดขึ้นศาลอาจจะมีความเห็นให้ผู้ละเมิดชดใช้ค่าเสียหาย ทั้งนี้ก็แล้วแต่ความรุนแรงของความเสียหายที่เกิดขึ้น หรือศาลจะสั่งริบพันธุ์พืชหรือสิ่งที่อยู่ในครอบครองของผู้ละเมิด หรือผู้ฝ่าฝืนสิทธิของผู้ทรงสิทธิ นอกจากนี้ยังมีโทษทางอาญาสำหรับผู้ฝ่าฝืนหรือละเมิดสิทธิของผู้ทรงสิทธิไม่ว่าจะเป็นพันธุ์พืชใหม่หรือชุมชนซึ่งเป็นเจ้าของ พันธุ์พืชพื้นเมือง

เฉพาะถิ่นซึ่งมีโทษจำคุก ไม่เกิน 2 ปี หรือปรับไม่เกิน 400,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ข้อยกเว้นสิทธิ

ข้อยกเว้นสิทธิสำหรับการกระทำดังต่อไปนี้ไม่ถือว่าเป็นการละเมิด

1. การกระทำโดยไม่มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นส่วนขยายพันธุ์
2. การกระทำโดยไม่มีวัตถุประสงค์เพื่อการค้า

3. การเพาะปลูกหรือขยายพันธุ์โดยเกษตรกร ใช้ส่วนขยายพันธุ์ที่ตนเองเป็นผู้ผลิตในการเพาะปลูก สำหรับพันธุ์พืชที่รัฐมนตรีโดยความเห็นชอบของคณะกรรมการคุ้มครองพันธุ์พืช ประกาศให้เป็นพันธุ์พืชที่ควรส่งเสริมการปรับปรุงพันธุ์ให้เกษตรกรสามารถเพาะปลูกหรือขยายพันธุ์ได้ไม่เกิน 3 เท่าที่ได้มา

4. การกระทำโดยสุจริต

ระยะเวลาในการคุ้มครองพันธุ์พืช

ผู้ที่ได้รับการคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ ระยะเวลาในการคุ้มครองแตกต่างกัน เป็นไปตามกลุ่มพืช

1. พืชที่จะได้รับความคุ้มครอง 12 ปี เป็นพืชที่ให้ผลผลิตตามลักษณะประจำพันธุ์ได้หลังจากปลูกจากส่วนขยายพันธุ์ภาย ในเวลาไม่เกิน 2 ปี เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง

2. กลุ่มที่ 2 พืชยืนต้นหรือพืชที่ให้ผลผลิตตามลักษณะประจำพันธุ์ได้หลังจากปลูกจากส่วนขยายพันธุ์ เกินกว่า 2 ปี ระยะเวลาในความคุ้มครอง 17 ปี พืชในกลุ่มคือกลุ่มไม้ผล เช่น มะม่วงทุเรียน

3. กลุ่มที่ 3 ป็นกลุ่มพืชที่ใช้ประโยชน์จากเนื้อไม้ เป็นไม้ยืนต้น หรือเป็นพืชที่ใช้ประโยชน์จากเนื้อไม้ที่ให้ผลผลิตตามลักษณะประจำพันธุ์ หลังจากปลูกจากส่วนขยายพันธุ์ในเวลาเกินกว่า 2 ปี ระยะเวลาในการคุ้มครองในกลุ่มนี้มีอายุในการคุ้มครอง 27 ปี เช่น ต้นสัก เป็นต้น

สำหรับอายุในการคุ้มครองพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น มีอายุความคุ้มครองในแต่ละพันธุ์พืชเช่นเดียวกับพันธุ์พืชใหม่ แต่สำหรับพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่น อายุคุ้มครองสามารถยืดออกไปได้เป็นครั้งคราว ซึ่งแตกต่างจากการคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ที่สามารถยืดอายุความคุ้มครองได้

การระงับและเพิกถอนสิทธิพันธุ์พืชใหม่

เมื่อมีเหตุจำเป็นในการป้องกันรักษาโรค และส่งเสริมสุขภาพ การรักษาสวัสดิภาพของประชาชน การรักษาและอนุรักษ์ สิ่งแวดล้อม และความหลากหลายทางชีวภาพ หรือเพื่อประโยชน์สาธารณะอย่างอื่น หรือเพื่อประโยชน์ต่อความมั่นคงของประเทศ ในการรักษาความมั่นคงทางอาหาร การป้องกันการผูกขาดทางการค้าหรือเพื่อสาธารณะอย่างอื่น รัฐมนตรีโดยความเห็นชอบของคณะกรรมการคุ้มครองพันธุ์พืชมีอำนาจดังนี้ :-

1. ประกาศห้ามมิให้ผลิต ขาย หรือจำหน่าย นำเข้ามาในราชอาณาจักร หรือส่งออกนอกราชอาณาจักร ซึ่งพันธุ์พืชใหม่

2. อนุญาตให้บุคคลอื่นกระทำการผลิต ขาย หรือจำหน่าย นำเข้ามาในราชอาณาจักร หรือส่งออกนอกราชอาณาจักร โดยเสียค่าตอบแทนที่เหมาะสมแก่ผู้ทรงสิทธิ

3. เพิกถอนหนังสือสำหรับแสดงการจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่

บทลงโทษ

1. พระราชบัญญัติฉบับนี้ ได้กำหนดบทลงโทษพนักงานเจ้าหน้าที่ไว้ด้วยในมาตรา 63 ในกรณีที่เปิดเผยข้อมูล หรือให้ผู้อื่นใช้ส่วนขยายพันธุ์ที่ได้รับมอบโดยไม่ได้รับคำยินยอมจากเจ้าของ หรือมิชอบด้วยกฎหมาย ซึ่งมีโทษจำคุกไม่เกิน 2 ปี หรือปรับไม่เกิน 400,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

2. สำหรับผู้ละเมิดสิทธิ (ตามมาตรา 33 หรือ 47) จำคุกไม่เกิน 2 ปี หรือปรับไม่เกิน 400,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

3. สำหรับผู้ทรงสิทธิในพันธุ์พืชใหม่ ที่ไม่แสดงเครื่องหมายตามที่กำหนดไว้ โทษจำคุกไม่เกิน 1 เดือน ปรับไม่เกิน 20,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

4. สำหรับผู้ปลอมแปลง หรือใช้เครื่องหมายเลียนแบบทำให้ผู้อื่นเข้าใจผิดว่าพันธุ์

พืชนั้นเป็นพันธุ์พืชที่ได้รับความคุ้มครอง ทั้งที่รู้อยู่แล้วว่าไม่เป็นจริงตามนั้น มีโทษจำคุกตั้งแต่ 6 เดือน - 5 ปี และปรับตั้งแต่ 20,000 บาท ถึง 200,000 บาท (มาตรา 67)

5. การแสดงหรือแจ้งข้อความเป็นเท็จในการขอจดทะเบียน มีโทษจำคุก ไม่เกิน 2 ปี หรือปรับไม่เกิน 400,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ (มาตรา 68)

6. ผู้แทนนิติบุคคลจะต้องรับโทษด้วยในกรณีที่นิติบุคคลเป็นผู้รับโทษตามพระราชบัญญัตินี้ เว้นแต่จะพิสูจน์ได้ว่าตนมิได้รู้เห็นหรือยินยอมด้วยในการกระทำของนิติบุคคลนั้น

การคุ้มครองสิทธิของผู้ทรงสิทธิในพันธุ์พืช

มาตรา 61 ในกรณีที่มีการฝ่าฝืนสิทธิของผู้ทรงสิทธิในพันธุ์พืชใหม่ หรือผู้ทรงสิทธิในพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่นตามมาตรา 33 หรือมาตรา 47 แล้วแต่กรณี ศาลมีอำนาจสั่งให้ฝ่าฝืนชดใช้ค่าเสียหายแก่ผู้ทรงสิทธิตามจำนวนที่ศาลเห็นสมควร โดยคำนึงถึงความร้ายแรงของความเสียหาย รวมทั้งการสูญเสียผลประโยชน์และค่าใช้จ่ายอันจำเป็นในการบังคับตามสิทธิของผู้ทรงสิทธิด้วย

มาตรา 62 บรรดาพันธุ์พืช หรือสิ่งที่อยู่ในความครอบครองของผู้กระทำการ อันเป็นการฝ่าฝืนสิทธิของผู้ทรงสิทธิในพันธุ์พืชใหม่ หรือผู้ทรงสิทธิในพันธุ์พืชพื้นเมืองเฉพาะถิ่นตามมาตรา 33 หรือมาตรา 47 แล้วแต่กรณี ให้ศาลสั่งริบเสียทั้งสิ้นบรรดาสิ่งที่ศาลสั่งริบให้ตกเป็นของแผ่นดิน และให้กรมวิชาการเกษตรนำไปดำเนินการตามระเบียบที่อธิบดีกำหนด โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการ

อัตราค่าธรรมเนียม

อัตราค่าธรรมเนียมที่กำหนดไว้ในพระราชบัญญัติมีดังนี้

1. คำขอจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ ฉบับละ 100 บาท
2. คำคัดค้านการขอจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ ฉบับละ 100 บาท
3. หนังสือสำคัญแสดงการจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ ฉบับละ 500 บาท
4. ค่าธรรมเนียมรายปีสำหรับคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ฉบับละ 1,000 บาท

5. คำขอจดทะเบียนการอนุญาตให้ใช้สิทธิ ตามหนังสือสำคัญแสดงการจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ ฉบับละ 500 บาท

6. คำขอจดทะเบียนการโอนสิทธิตามหนังสือสำคัญ แสดงการจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ ฉบับละ 500 บาท

7. ใบแทนหนังสือสำคัญแสดงการจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ ฉบับละ 500 บาท

แบบฟอร์ม

แบบ พ.พ. 13 คำขอรับหนังสืออนุญาตนำเข้า ส่งออก นำผ่าน พืชอนุรักษ์หรือซากพืชอนุรักษ์ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518

แบบ พ.พ. 15 คำขอขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์

แบบ พ.พ. 16 ใบสำคัญการขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์

แบบ พ.พ. 17 บัญชีแสดงจำนวนพืชอนุรักษ์ที่เปลี่ยนแปลงในรอบปีปฏิทิน

แบบ พ.พ. 18 บัญชีเพิ่มหรือลดชนิดพืชอนุรักษ์หรือจำนวนพ่อแม่พันธุ์

แบบ พ.พ. 19 คำขอต่ออายุใบสำคัญ การขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์

แบบ พ.พ. 20 คำขอใบแทนใบสำคัญ การขึ้นทะเบียนสถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์

แบบ พ.พ. 21 คำขอแก้ไขรายการใบสำคัญการขึ้นทะเบียน เพิ่ม ลด สถานที่เพาะเลี้ยงพืชอนุรักษ์

แบบคำขอรับหนังสืออนุญาตนำเข้า ส่งออก นำผ่าน พืชอนุรักษ์หรือซากพืชอนุรักษ์

ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518

Application Form for Import Export and Re-export Permit of Conserved Plants Under Plant Act B.E. 2518

เขียนที่.....Place.....

วันที่.....Date.....

ข้าพเจ้า.....

อายุ..... ปี สัญชาติ.....

Mr./Mrs./Miss Family name Age Nationality

ที่อยู่.....

Address

ขอรับหนังสืออนุญาต(เขียนเครื่องหมาย / ในช่อง [ ]ตามประเภทหนังสืออนุญาตที่ขอ)

requests for permit (please check at appropriate boxes)

[ ] หนังสืออนุญาตนำเข้า

Import permit

[ ] หนังสืออนุญาตส่งออก

Export permit

[ ] หนังสืออนุญาตนำผ่าน

Re-export permit

สำหรับพืชอนุรักษ์หรือซากพืชอนุรักษ์ ดังรายการด้านหลัง

for live or dead conserved plants as listed overleaf

ที่อยู่ผู้ส่ง.....

.....

Name & Address of Permittee

ชื่อที่อยู่ผู้รับ.....

.....

Name & Address of Consignee

เครื่องหมายที่สังเกตบนหีบห่อ..... มูลค่า.....

โดยพาหนะ.....

Distinguishing Marks Values Means of Conveyance

นำเข้าประเทศปลายทาง.....ประมาณวันที่.....

Point of Entry Date.....

ลายมือชื่อ.....

Signature

แบบ พ.พ. 13

รายชื่อพืชอนุรักษ์ หรือซากพืชอนุรักษ์.....

(List of Conserved Plants)

ลำดับที่.....

(Number)

ชื่อวิทยาศาสตร์.....

(Scientific Name of Plants)

บัญชีหมายเลขและแหล่งที่มา.....

(Appendix No. and Source)

จำนวน .....

(Quantity)

แบบคำขอหนังสือรับรองการส่งออกพืชลูกผสมของพืช ในบัญชีแนบท้ายอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่ง ชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่กำลังจะสูญพันธุ์

Application Form for Certificate of Exportation of Hybrids Plants under CITES List

เขียนที่.....

Place

วันที่.....

Date

ข้าพเจ้า..... อายุ.....ปี

สัญชาติ.....

Mr./Mrs./Miss Family name Age Nationality

ที่อยู่.....

Address

ขอรับหนังสือรับรองการส่งออกพืชลูกผสมของพืช ในบัญชีแนบท้ายอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่กำลังจะสูญพันธุ์ดังรายการด้านหลัง

request for a certification of exportation of hybrids plants under CITES list as indicated overleaf

ที่อยู่ผู้ส่ง.....

.....

Name & Address of Permittee

ชื่อที่อยู่ผู้รับ.....

.....

Name & Address of Consignee

เครื่องหมายที่สังเกตบนหีบห่อ..... มูลค่า.....

โดยพาหนะ.....

Distinguishing Marks Values Means of Conveyance

นำเข้าประเทศปลายทาง.....ประมาณวันที่.....

Point of Entry Date

.....

ลายมือชื่อ.....

Signature

รายชื่อพืช.....

(List of of Plants)

ลำดับที่.....

Number

ชื่อวิทยาศาสตร์.....

Scientific Name

จำนวน.....

Quantity.....

หมายเหตุ.....

Remarks

****

คำชี้แจงตำราศึกษาด้วยตนเอง

กระบวนวิชา การผสมพันธุ์พืช (PLANT BREEDING) รหัสวิชา BO 453

การใช้ตำราศึกษาด้วยตนเอง

1. ตำรากระบวนวิชานี้ได้แบ่งเป็นบทต่าง ๆ ดังนี้

บทที่ 1 บทบาทและความสำคัญของการผสมพันธุ์พืช

บทที่ 2 เซลล์และการแบ่งเซลล์

บทที่ 3 พันธุศาสตร์ตามหลักของเมนเดล

บทที่ 4 ส่วนต่าง ๆ ของพืช

บทที่ 5 วิวัฒนาการและการสืบพันธุ์ของพืช

บทที่ 6 การกำเนิดพืชมีดอก

บทที่ 7 การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์จากพืช

บทที่ 8 การปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีการต่าง ๆ

บทที่ 9 การผสมกลับ และการกลายพันธุ์

บทที่ 10 เทคโนโลยีชีวภาพกับการผสมพันธุ์พืช

บทที่ 11 การส่งถ่ายยีนสู่พืชกับการปรับปรุงพันธุ์พืช

บทที่ 12 การดำเนินการเกี่ยวกับพืชพันธุ์ใหม่

ภาคผนวก

2. วิธีเรียน

2.1 ให้นักศึกษาทำแบบฝึกหัดประเมินผลก่อนเรียน แล้วตรวจสอบคำตอบจากเฉลย เพื่อจะได้รู้ว่านักศึกษามีความรู้ในเนื้อหากระบวนวิชานี้มากน้อยเพียงใด

2.2 ให้นักศึกษาอ่านเนื้อหาในตำราแต่ละบทให้เข้าใจ แล้วทำแบบฝึกหัดที่กำหนด

2.3 ตรวจสอบการทำแบบฝึกหัดจากแนวตอบและแนวเฉลยท้ายเล่ม ถ้าคำตอบของนักศึกษาไม่ตรงหรือคล้ายกับแนวคำตอบ นักศึกษาควรย้อนกลับไปอ่านและทบทวนเนื้อหาในบทนั้น ๆ อีกครั้ง ทำแบบฝึกหัดข้อที่ผิดใหม่ แล้วจึงอ่านและทำความเข้าใจกับเนื้อหาตอนต่อไปจนจบบท

2.4 เมื่อศึกษาและอ่านเนื้อหาจนจบหมดทุกหมดแล้ว ให้ทำแบบประเมินผลหลัง

เรียนซึ่งเป็นการวัดความรู้ในกระบวนวิชานี้ทั้งหมด ตรวจสอบคำตอบจากเฉลย ให้นักศึกษาเปรียบเทียบผลการประเมินหลังเรียนและผลประเมินก่อนเรียนว่ามีการพัฒนาในการเรียนมากน้อยเพียงใด

แบบประเมินผลก่อนเรียน

จงเลือกคำตอบถูกต้องที่สุดเพียงข้อเดียว ระบายลงในกระดาษคำตอบ

1. ข้อใดคือเป้าหมายของการปรับปรุงพันธุ์พืช ?
   1. เพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนปัจจัยสี่ 2. เพื่อเพิ่มสารอาหาร
   3. เพิ่มคุณภาพของอาหาร 4. เพิ่มรสชาติอาหาร
2. The green revolution คืออะไร ?
   1. วิทยาศาสตร์การเกษตรที่ใช้แก้ไขการขาดแคลนอาหารของโลก
   2. การปฏิวัติเขียว
   3. การเกษตรแผนใหม่
   4. การใช้เทคนิคการผสมเกสรเทียม
3. The Chinese Center เป็นถิ่นกำเนิดของพืชชนิดใด ?
   1. ยางพารา 2. ถั่วเหลือง
   3. อัลฟัลฟา 4. ยาสูบ
4. ยางพาราเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเขตใด ?
   1.The Indian Center 2. The Mediterranean Center
   3. The South American Center 4. ถูกทุกข้อ
5. การผสมพันธุ์ระหว่างข้าวสาลีกับหญ้า ข้อใดกล่าวถูกต้อง ?
   1. Intergeneric hybridization 2. Interspecific hybridization
   3. Polyploidy 4. Mutation
6. การเพิ่มชุดโครโมโซมของตัวเองเท่ากับจำนวนชุดเดิม เรียกว่าอะไร ?
   1. Autopolyploid 2. Allopolyploid
   3. Mendelian variation 4. Mutation
7. ข้อใดไม่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ ?

1. การใช้รังสี
2. การใช้สารเคมี
3. การใช้ tretment
4. การใช้แมลงผสมพันธุ์

8. โครงสร้างใดของพืชที่ใช้ล่อแมลง ?
1. Sepal
2. Petal
3. Anther
4. Ovary

9. สเปิร์มเซลล์ผสมกับ โพลาร์นิวคลีไอ ได้ส่วนที่เรียกว่า ?
1. Endosperm
2. Zygote
3. Embryo
4. Seed

10. Vegetative apomixis คืออะไร ?
1. การผสมเทียม
2. การเกิดต้นเล็ก ๆ บนช่อดอก
3. การตอนกิ่ง
4.การเลี้ยงเนื้อเยื่อ

11. อาหารส่วนที่เลี้ยง เอ็มบริโอและเมล็ดคือส่วนใด ?
1. nucellus
2. Integument
3. food layer
4. ถูกทุกข้อ

12. บุคคลใดที่ได้รับรางวัลโนเบลสาขาสันติภาพ ที่เกี่ยวข้องกับการผสมพันธุ์พืช ?
1. Mendel
2. Borlaug
3. Biffen
4. Stadler

13. พืชที่มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละต้นเรียกว่า ?
1. dioecious plant
2. Monoecious plant
3. Protandry
4. Sterility

14. พืชที่มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่บนต้นเดียวกันเรียกว่า ?
1. dioecious plant
2. Monoecious plant
3. Protandry
4. Sterility

15. พืชที่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียเป็นหมันเรียกว่า ?
1. dioecious plant
2. Monoecious plant
3. Protandry
4. Sterility

16. ละอองเกสรตัวผู้แก่ก่อนและพร้อมที่จะผสมก่อนดอกตัวเมียเรียกว่า ?

1. dioecious plant 2. Monoecious plant

3. Protandry 4. Sterility

17. มีปฏิกิริยาทางชีวเคมีบางอย่างทำให้เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียไม่สามารถผสมกันเองได้ ?

1. Self-incompatibility 2. Monoecious plant

3. Protandry 4. Sterility

18. ขั้นตอนแรกของการคัดเลือกพันธุ์แท้บริสุทธิ์คืออะไร ?

1. ปลูกเป็นพันธุ์ต่อแถว 2. ปลูกเป็นต้นต่อแถว

3. ปลูกเมล็ดแบบสุ่ม 4. ไม่มีข้อใดถูก

19. ข้อใดต่อไปนี้คือ Emasculation ?

1. การดึงอับเรณู 2. Clipping

3. การใช้ลมร้อน 4. ถูกทุกข้อ

20. จงคำนวณหาสัดส่วนความเป็นพันธุ์แท้ (Proportion of homozygosity) ในรุ่น F2 ในการผสมพันธุ์พืชที่มีจีโนไทป์ แบบ BB และ bb

1. 50% 2. 25%

3. 12.5% 4. 6.25%

21. สัดส่วนความเป็นพันธุ์ทาง ในรุ่น F2 เท่ากับเท่าใด ?

1. 50% 2. 25%

3. 12.5% 4. 6.25%

22. การคัดเลือกพันธุ์แบบบันทึกประวัติเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ?

1. Pedigree method 2. Single seed descent method

3. Bulk- population method 4. Combination method

23. เพราะเหตุใดจึงต้องมีการผสมกลับ ?

1. เพื่อต้องการลักษณะที่ดีจากพ่อแม่พันธุ์ดี
2. เพื่อให้เกิดความคงที่ของยีน
3. เพื่อให้มีการแสดงออกหลาย ๆ ลักษณะ
4. เพื่อข่มลักษณะที่ไม่ดีไม่ให้แสดงออก

24. วิธีการผสมกลับมีกี่วิธี ?

1. 1 วิธี
2. 2 วิธี
3. 3 วิธี
4. 4 วิธี

25. ข้อใดกล่าวไม่ถูกต้องเกี่ยวกับการผสมกลับ ?

1. สามารถคาดคะเนผลได้ล่วงหน้า
2. จำนวนครั้งของการผสมยิ่งมากยิ่งดี
3. ตัวรับที่ดีควรมีการแสดงออกต่ำ
4. ตัวให้ต้องมีลักษณะพิเศษที่ต้องการ

26. การผสมตัวเองไม่ติดเกี่ยวข้องกับข้อใดบ้าง ?

1. gametophytic incompatibility
2. sporophytic incompatibility
3. heteromorphic incompatibility
4. ถูกทุกข้อ

27. การแก้ไขการผสมตัวเองไม่ติดหมายถึงข้อใดดังต่อไปนี้ ?

1. การผสมเกสรในที่อุณหภูมิสูง
2. การตัดยอดเกสรตัวเมียทิ้ง
3. การตัดเกสรตัวผู้ทิ้ง
4. การทำให้ S allele กลายพันธุ์

28. เกสนตัวผู้เป็นหมันที่ขึ้นอยู่กับหน่วยพันธุกรรมในไซโตพลาซึมคือข้อใด ?

1. genetic male sterility
2. cytoplasmic male sterility
3. cytoplasmic genetic male sterility
4. ถูกทั้งหมด

29. ข้อใดคือการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผสมพันธุ์พืช ?

1. plant germplasm conservation
2. in vitro plant germplasm exchange
3. in vitro plant breeding
4. ที่กล่าวมาไม่มีข้อใดผิด

30. ข้อเสียเปรียบของการผสมพันธุ์พืชแบบดั้งเดิมเมื่อเทียบกับวิธีสมัยใหม่ข้อใดเด่นชัดที่สุด ?

1. ใช้พื้นที่มาก
2. ใช้จำนวนคนมาก
3. ใช้เวลามาก
4. ใช้เงินลงทุนมาก

31. สัดส่วนของจำนวนครั้งที่เกิดเหตุการณ์ใดเหตุการณ์หนึ่งจะเกิดขึ้นได้จากจำนวนเหตุการณ์ทั้งหมดคือ ?

1. ความน่าจะเป็น
2. การพยากรณ์

3. การเดา 4. การสุ่ม

32. ค่าของความน่าจะเป็นมีค่าอยู่ระหว่างค่าใด ?

1. 0.1-1.1 2. 0.2-2.0

3. 0-1.0 4. 1.0-3.0

33. ถุงหนึ่งใบมีลูกบอล 10 ลูก สีเขียว 3 ลูก สีแดง 2 ลูก และสีขาว 5 ลูก ถ้าเราต้องการหยิบให้ได้ลูกบอลสีขาวหนึ่งลูก ความน่าจะเป็นในเหตุการณ์นี้คือเท่าใด ?

1. 0.2 2. 0.3

3. 0.4 4. 0.5

34. ในการคำนวณค่าความน่าจะเป็นนั้นถ้าเหตุการณ์สองอย่างหรือมากกว่าเป็นอิสระต่อกันค่าความน่าจะเป็นที่เหตุการณ์ทั้งสองหรือมากกว่าจะเกิดขึ้นร่วมกันคือข้อใด ?

1. ผลคูณของความน่าจะเป็นของแต่ละเหตุการณ์
2. ผลรวมของความน่าจะเป็นของแต่ละเหตุการณ์
3. ผลต่างของความน่าจะเป็นของแต่ละเหตุการณ์
4. ไม่มีข้อใดผิด

35. ในการผสมพันธุ์พืชที่มี Genotype Aa กับ Genotype aa โอกาสที่ได้รุ่นลูก ที่มี Genotype Aa เป็นเท่าใด ?

1. 0.25 2. 0.5

3. 0.6 4. 0.7

36. พันธุศาสตร์ตามหลักของเมนเดล คำว่า factors คือข้อใด ?

1. เซลล์ 2. นิวเคลียส

3. ยีน 4. เซลล์สืบพันธุ์

37. ตามกฎข้อที่ 1 ของเมลเดลลูกผสมในรุ่น F1 จะแสดงออกกี่ลักษณะ ?

1. ลักษณะเดียว 2. สองลักษณะ

3. หลายลักษณะ 4. ถูกทุกข้อ

38.จากกฎข้อที่ 1 ลักษณะที่หายไปในรุ่น F1 จะกลับมาแสดงออกในรุ่น F2 ในอัตราส่วนเท่าใดของรุ่นลูกทั้งหมด ?

1. ¼ 2.1/2

3. ¾ 4. 1/1

39. ในการผสมพันธุ์พืชที่มีลักษณะแตกต่างกันสองคู่พร้อมกันเรียกว่า ?

1. Dihybrid cross 2. Trihybrid cross

3. Monohybrid cross 4. Polyhybrid cross

40. ต้องการผสมพันธุ์แตงโมที่มีลักษณะเมล็ดเรียบ-สีเหลือง (RR-YY) กับพันธุ์ที่มีเมล็ดขรุขระ- สีเขียว (rr-yy) ซึ่งมีการข่มของยีนเด่นต่อยีนด้อยแบบสมบูรณ์ ลูกผสมรุ่นที่ 1 สร้างแกมีตได้กี่แบบ ?

1. 2 แบบ 2. 3 แบบ

3. 4 แบบ 4. 5 แบบ

41. จากข้อ 40 เมื่อลูกผสมรุ่นที่ 1 ผสมกันได้ลูกผสมรุ่นที่ 2 ได้ Genotype กี่แบบ ?

1. 6 แบบ 2. 7 แบบ

3. 8 แบบ 4. 9 แบบ

42. จากข้อ 41 ลูกผสมรุ่นที่ 2 ได้ Phenotype กี่แบบ ?

1. 4 แบบ 2. 6 แบบ

3. 8 แบบ 4. 10 แบบ

43. ข้อใดคือ in vitro plant breeding ?

1. anther culture 2. Embryo culture

3. field gene bank 4. ถูกเฉพาะข้อ 1 และ 2 เท่านั้น

44. ข้อใดคือประโยชน์การส่งถ่ายยีนสู่พืช โดยการสร้างพืชต้านทานต่อโรค ?

1. bt toxin 2. Coat protein

3. Acc oxidase 4. Glyphosate

45. การสร้างพืชต้านทานแมลงคือข้อใด ?

1. bt toxin 2. Coat protein

3. Acc oxidase 4. Glyphosate

46. การสร้างพืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชคือข้อใด ?

1. bt toxin 2. Coat protein

3. Acc oxidase 4. Glyphosate

47. การสร้างพืชที่มีระยะการเก็บเกี่ยวได้นาน?

1. bt toxin
2. Coat protein
3. Acc oxidase
4. Glyphosate

48. ข้อใดไม่ใช่ประโยชน์จากการส่งถ่ายยีนสู่พืช ?

1.ส่งถ่ายยีนหลายยีนได้
2. ได้พืชที่มีลักษณะดีกว่าเดิม
3. สร้างพืชที่ดรึงไนโตรเจนได้
4. ลดการเข้าคู่ของยีนไม่ได้

49. ขั้นตอนการนำยีนที่สนใจเข้าสู่พืชคือข้อใด ?

1. vector
2. Incorporation
3. transcription, translation
4. ทุกข้อ

50. ต้องมีการรวมตัวกันของยีนภายนอกกับโครโมโซมพืช ?

1.ส่งถ่ายยีนหลายยีนได้
2. ได้พืชที่มีลักษณะดีกว่าเดิม
3. สร้างพืชที่ดรึงไนโตรเจนได้
4. ลดการเข้าคู่ของยีนไม่ได้

51. ต้องมีการรวมตัวของยีนอย่างคงที่และผ่านขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีน ?

1.ส่งถ่ายยีนหลายยีนได้
2. ได้พืชที่มีลักษณะดีกว่าเดิม
3. สร้างพืชที่ดรึงไนโตรเจนได้
4. ลดการเข้าคู่ของยีนไม่ได้

52. พาหะที่ใช้นำยีนเข้าสู่พืชได้แก่ ?

1. Plasmid
2. Lambda phage
3. YAC
4. ทุกข้อ

53. พาหะที่ได้มาจากไวรัสคือข้อใด ?

1. Plasmid
2. Lambda phage
3. YAC
4. CaMV

54. enzyme ชนิดใดที่ใช้เชื่อมดีเอ็นเอสายผสมเข้าด้วยกันคือข้อใด ?

1. DNA ligase
2. RNA polymerase
3. RNA ligase
4. ทุกข้อ

55. ขั้นตอนการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* หลังจากการนำยีนเข้าสู่เซลล์แล้วควรทำอย่างไรต่อไป ?

1. ตรวจสอบการแสดงออกของยีน
2. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น

3. บ่ม *Agrobacterium* 4. วางแผนการทดลองต่อไป

56. ปัญหาการส่งถ่ายยีนโดย *Agrobacterium* มีหลายปัจจัยยกเว้นข้อใด ?

1. พืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิดไม่เป็น host 2. สายพันธุ์จำเพาะมากเกินไป
3. เนื้อเยื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นยาก 4. การแสดงออกของยีนคงที่มาก

57. พืชในกลุ่มใดที่มีปัญหาการชักนำให้เจริญเป็นต้นยากมาก ?

1. พืชใบเลี้ยงเดี่ยว 2. พืชมีเนื้อไม้
3. พืชตระกูลถั่ว 4. ทุกข้อ

58. enzyme ชนิดใดที่ใช้ตัดดีเอ็นเอให้ขาดเป็นท่อนคือข้อใด ?

1. DNA ligase 2. RNA polymerase
3. RNA ligase 4. Restriction endonuclease

59. ข้อใดกล่าวถูกต้อง ?

1. ชิ้น DNA –vector กับ DNA ที่ต้องการเชื่อมต้องตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน
2. ชิ้น DNA –vector กับ DNA ที่ต้องการเชื่อมต้องตัดด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกัน
3. ชิ้น DNA –vector กับ DNA ที่ต้องการเชื่อมต้องตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันหรือต่างกันก็ได้
4. ทุกข้อ

60. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนวิธีใดที่นิยมมากที่สุด ?

1. antibiotic 2. Gus assay
3. southern blotting 4. LISA

61. X-Gluc สัมพันธ์กับข้อใด ?

1. antibiotic 2. Gus assay
3. southern blotting 4. acetolysis

62. hygromycin สัมพันธ์กับข้อใด ?

1. antibiotic 2. Gus assay
3. southern blotting 4. acetolysis

63. ใช้วิธี electrophoresis ใน agarose gel สัมพันธ์กับข้อใด ?

1. antibiotic 2. Gus assay

3. southern blotting 4. acetolysis

64. ช่วงโมเลกุลของดีเอ็นเอเป็นบริเวณที่ RNA polymerase เข้ามาเกาะและเริ่มต้นการถอดรหัสเพื่อสร้าง RNA เรียกว่า ?

1. promotors 2. Reporter

3. selectable 4. Screenable

65. gene รายงานผลที่เราได้จากการสกัดจากแมลงหิ่งห้อยคือข้อใด ?

1. luciferase gene 2. Cat gene

3. gus gene 4. Tn 9 bacteria

66. การส่งถ่ายยีนวิธีตรงทำให้เกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์เกี่ยวข้องข้อใด ?

1. PEG 2. Electroporation

3. particle gun 4. Microinjection

67. การส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าคือ ?

1. PEG 2. Electroporation

3. particle gun 4. Microinjection

68. การเคลือบกระสุนดีเอ็นเอด้วยทังสะเตนหรือทองคำ คือ ?

1. PEG 2. Electroporation

3. particle gun 4. Microinjection

69. การใช้ปิเปตแก้วขนาดเล็กฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ผู้รับคือ ?

1. PEG 2. Electroporation

3. particle gun 4. Microinjection

70. การส่งถ่ายยีนด้วยวิธีอื่น ๆ ได้แก่ข้อใดบ้าง ?

1. pollen tube transfer 2. Laser beam transfer

3. whole plant transfromation 4. ถูกทุกข้อ

71. การดำเนินการเกี่ยวกับพืชพันธุ์ใหม่สมาคมที่รองรับพันธุ์ได้แก่ ?

1. ICIA 2. ISTA

3. AOSA 4. ถูกทุกข้อ

72. สมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์พืชนานาชาติคือข้อใด ?

1. ICIA 2. ISTA

3. AOSA 4. ถูกทุกข้อ

73. สมาคมวิเคราะห์เมล็ดพันธุ์พืชคือข้อใด ?

1. ICIA 2. ISTA

3. AOSA 4. ถูกทุกข้อ

74. ขั้นตอนการดำเนินการเกี่ยวกับพืชพันธุ์ใหม่ได้แก่ ?

1. การปล่อยพันธุ์ 2. การผลิตเมล็ดพันธุ์

3. การเผยแพร่เมล็ดพันธุ์ 4. ไม่มีข้อใดผิด

75. การส่งเมล็ดพันธุ์ไปให้แก่เกษตรกรจัดเป็นขั้นตอนใด ?

1. การปล่อยพันธุ์ 2. การผลิตเมล็ดพันธุ์

3. การเผยแพร่เมล็ดพันธุ์ 4. ไม่มีข้อใดผิด

กระดาษคำตอบแบบประเมินผลก่อนเรียน

ข้อ	1	2	3	4	ข้อ	1	2	3	4	ข้อ	1	2	3	4
1					26					51				
2					27					52				
3					28					53				
4					29					54				
5					30					55				
6					31					56				
7					32					57				
8					33					58				
9					34					59				
10					35					60				
11					36					61				
12					37					62				
13					38					63				
14					39					64				
15					40					65				
16					41					66				
17					42					67				
18					43					68				
19					44					69				
20					45					70				
21					46					71				
22					47					72				
23					48					73				
24					49					74				
25					50					75				

แบบเฉลยคำตอบแบบประเมินผลก่อนเรียน

ข้อ	1	2	3	4	ข้อ	1	2	3	4	ข้อ	1	2	3	4
1	X				26				X	51			X	
2	X				27				X	52				X
3			X		28		X			53				X
4			X		29				X	54	X			
5	X				30			X		55		X		
6	X				31	X				56				X
7				X	32			X		57				X
8		X			33				X	58				X
9	X				34	X				59	X			
10		X			35		X			60		X		
11	X				36			X		61		X		
12		X			37	X				62	X			
13	X				38	X				63			X	
14		X			39	X				64	X			
15				X	40			X		65	X			
16			X		41				X	66	X			
17	X				42	X				67		X		
18	X				43				X	68			X	
19				X	44		X			69				X
20	X				45	X				70				X
21	X				46				X	71				X
22	X				47			X		72		X		
23	X				48	X				73			X	
24		X			49				X	74				X
25			X		50		X			75			X	

แบบประเมินผลหลังเรียน

จงเลือกคำตอบที่ถูกต้องเพียงข้อเดียว

1. ข้อใดคือความหมายที่ถูกต้องของการปรับปรุงพันธุ์พืช ?
   1) การนำความรู้ทางพันธุศาสตร์มาประยุกต์ให้เกิดประโยชน์แก่มนุษย์
   2) การนำความรู้ทางศิลปะมาประยุกต์ให้เกิดประโยชน์แก่มนุษย์
   3) การนำความรู้ทางเขตกรรมมาประยุกต์ให้เกิดประโยชน์แก่มนุษย์
   4) การนำความรู้ทางพฤกษศาสตร์ประยุกต์ให้เกิดประโยชน์แก่มนุษย์
2. เป้าหมายสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์พืชคือข้อใด ?
   1) แก้ไขปัญหาการขาดแคลนอาหาร
   2) แก้ไขปัญหาการขาดแคลนที่อยู่อาศัย
   3) แก้ไขปัญหาการขาดแคลนยารักษาโรคและเครื่องนุ่งห่ม
   4) แก้ไขปัญหาการขาดแคลนปัจจัยสี่
3. ปัจจัยขั้นพื้นฐานที่มนุษย์มีความต้องการมากที่สุดคือ ?
   1) อาหาร
   2) ที่อยู่อาศัย
   3) ยารักษาโรค
   4) เครื่องนุ่งห่ม
4. การเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ทางการเกษตรได้แก่วิธีใด ?
   1) การใช้วิธีการทางเขตกรรมที่ถูกวิธี
   2) การใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรทุ่นแรง
   3) การใช้เมล็ดพันธุ์ที่ดี
   4) ทุกข้อที่กล่าวมา
5. การเพิ่มจำนวนประชากรที่สูงในปัจจุบันก่อให้เกิดปัญหาใดตามมา ?
   1) การขาดแคลนด้านอาหาร
   2) การขาดแคลนด้านอยู่อาศัย

3) การขาดแคลนด้านที่อยู่อาศัยและยารักษาโรค

4) ถูกทุกข้อ

6. การชลประทานจัดเป็นการเพิ่มผลผลิตแบบใด ?

1) การใช้วิธีการทางเขตกรรมที่ถูกวิธี

2) การใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรทุ่นแรง

3) การใช้เมล็ดพันธุ์ที่ดี

4) ทุกข้อที่กล่าวมา

7. การปรับปรุงพืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ดีกว่าเดิมได้แก่ด้านใดบ้าง ?

1) ด้านผลผลิต

2) ด้านคุณภาพ และลักษณะพิเศษ

3) ทรงต้นและการเจริญเติบโต

4) ถูกทุกข้อ

8. การปรับปรุงพันธุ์ให้เมล็ดถั่วเหลืองมีโปรตีนสูงจัดเป็นลักษณะที่ดีด้านใด ?

1) ด้านผลผลิต

2) ด้านคุณภาพ

3) ทรงต้นและการเจริญเติบโต

4) ลักษณะพิเศษ

9. ลักษณะการต้านทานต่อโรคและแมลงจัดเป็นผลดีต่อมนุษย์ด้านใด ?

1) ความปลอดภัยด้านสุขภาพ

2) ด้านสิ่งแวดล้อม

3) ด้านสังคม

4) ข้อ 1) และ 2) ถูกต้อง

10. สาขาวิชาใดที่จำเป็นต่อวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช ?

1) สาขาพฤกษศาสตร์

2) สาขาพันธุศาสตร์

3) สาขาสถิติ

4) ทุกข้อ

11. สาขาใดที่ทำให้ผู้วิจัยรู้จักชื่อสกุลและชนิดของพืชได้ถูกต้อง ?

1) สาขาพฤกษศาสตร์

2) สาขาพันธุศาสตร์

3) สาขาสรีรวิทยาของพืช

4) เทคโนโลยีชีวภาพของพืช

12. สาขาใดที่จำเป็นสำหรับการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อโรคและแมลง ?

1) สาขาพฤกษศาสตร์

2) สาขาสรีรวิทยาของพืช

3) สาขาสถิติ

4) กีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา

13. สาขาใดที่จำเป็นสำหรับการคาดคะเนผลที่เกิดขึ้นในอนาคต ?

1) สาขาพฤกษศาสตร์

2) สาขาพันธุศาสตร์

3) สาขาสถิติ

4) ทุกข้อ

14. การศึกษาด้านการเจริญเติบโตของพืชคือศาสตร์ด้านใด ?

1) สาขาพฤกษศาสตร์

2) สาขาสรีรวิทยาของพืช

3) สาขาสถิติ

4) กีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา

15. การผสมพันธุ์พืชให้มีสารอาหารสูง ผู้วิจัยควรมีความรู้ด้านใด ?

1) สาขาพฤกษศาสตร์

2) สาขาพันธุศาสตร์

3) สาขาสถิติ

4) ชีวเคมี

14. พืชปลูกในปัจจุบันได้มาจากแหล่งใด ?

1) พืชพันธุ์ป่า

2) พืชพันธุ์ปลูก

3) พืชกลายพันธุ์

4) ถูกทุกข้อ

15. การผสมข้ามชนิดก่อให้เกิดกระบวนการใดตามมา ?

1) introgression

2) deletion

3) addition

4) ทุกข้อ

16. วิวัฒนาการของพืชปลูกมีหลายขั้นตอนได้แก่ ?

1) การผสมข้ามชนิด

2) การเกิดโพลิพลอยดี้

3) การกลายพันธุ์

4) ทุกข้อ

17. การเพิ่มชุดโครโมโซมโดยชุดที่เพิ่มขึ้นมาเหมือนชุดเดิมเรียกว่า ?

1) allopolyploid

2) autopolyploid

3) chromosome polyploid

4) ทุกข้อ

18. กระบวนการ introgression หมายถึงข้อใด ?

1) ชิ้นส่วนของโครโมโซมถูกถ่ายทอดไปสู่พืชชนิดหนึ่ง

2) การหายไปของโครโมโซม

3) การเพิ่มขึ้นของโครโมโซม

4) การการลดลงของชิ้นส่วนของโครโมโซม

19. ข้าวสาลีเกิดจากการผสมแบบใด ?

1) การผสมข้ามชนิด

2) การผสมข้ามสกุล

3) การผสมในชนิดเดียวกัน

4) การผสมในสกุลชนิดเดียวกัน

20. การเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม ถ้ามีชุดที่เพิ่มขึ้นมาต่างจากชุดเดิมเรียกว่า ?

1) allopolyploid

2) autopolyploid

3) chromosome polyploid

4) ทุกข้อ

21. สารที่ทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ในพืชเรียกว่า ?

1) mutagent

2) chemical

3) hormone

4) ทุกข้อ

22. เกณฑ์ใดที่ใช้กำหนดให้พื้นที่นั้นเป็นถิ่นกำเนิดพืชได้แก่ ?

1) มีพืชพันธุ์ป่าและมีการกลายพันธุ์

2) fossil

3) มีพื้นที่เป็นหุบเขา

4) ทุกข้อ

23. ตามแนวคิดของ vavilov แบ่งถิ่นกำเนิดพืชได้เป็นกี่ถิ่น ?

1) 6 ถิ่น

2) 8 ถิ่น

3) 10 ถิ่น

4) 12 ถิ่น

24. ประเทศจีน พืชที่กำเนิดในถิ่นนี้คือ ?

1) ถั่วเหลือง

2) ข้าว

3) พริกไทย

4) กระเทียม

25. อเมริกาใต้ พืชที่กำเนิดในถิ่นนี้คือ ?

1) มันฝรั่ง

2) มะเขือเทศ

3) ยางพารา

4) ถูกทุกข้อ

26. ข้าวถือกำเนิดในประเทศใด ?

1) อินเดีย

2) จีน

3) อบิสสิเนีย

4) เมดิเตอร์เรเนียน

27. ถิ่นอบิสสิเนียให้กำเนิดพืชชนิดใด ?

1) ข้าวบาเลย์

2) ถั่วลันเตา

3) กะหล่ำ

4) อัลฟัลฟา

28. เมดิเตอร์เรเนียน เป็นถิ่นกำเนิดพืชชนิดใด ?

1) ข้าวโพด

2) ยางพารา

3) ข้าวสาลี

4) สับปะรด

29. ส่วนของพืชที่ใช้ในการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า ?

1) โคลน

2) เมล็ด

3) ใบพืช

4) ผล

30. พืชชนิดใดมีลำต้นแบบ stolon ?

1) สตรอเบอรี่

2) ข้าว

3) พริกไทย

4) กระเทียม

31. พืชชนิดใดมีลำต้นแบบเดียวกับกระเทียม ?

1) หอม

2) ทิวลิป

3) หญ้าแพรก

4) ข้อ 1) และข้อ 2 ถูก

32. พืชที่มีลำต้นแบบ corm คือ ?

1) เผือก

2) มันเทศ

3) มันฝรั่ง

4) กระเทียม

33. เมล็ดพืชที่เจริญมาจากส่วนของรังไข่โดยไม่ได้รับการผสมเรียกว่า ?

1) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

2) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

3) อโปมิกซิส

4) โคลน

34. vegetative apomixis พบในพืชชนิดใด ?

1) ปำนศรนารายณ์

2) หอมหัวใหญ่

3) ลิ้นมังกร

4) ทุกข้อ

35. เมล็ดเจริญจากรังไข่และนิวเซลลัส มีพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการเรียกว่า ?

1) adventitious embryony

2) parthenogenesis

3) embryo genesis

4) ทุกข้อ

36. การสืบพันธุ์แบบอาศัยของพืชมีดอกข้อใดกล่าวถูกต้อง ?

1) มีระยะสปอโรไฟต์เด่น

2) มีระยะแกมีโตไฟต์เด่น

3) เกิดการปฏิสนธิสองครั้ง

4) ข้อ 1) และ 2) ถูกต้อง

37. ส่วนของดอกไม้ที่มีสีสันสวยงามใช้ล่อแมลงผสมเกสรคือ ?

1) ฐานรองดอก

2) กลีบดอก

3) กลีบเลี้ยง

4) เกสรตัวเมีย

38. โพลาร์นิวคลีไอ ภายในรังไข่มีชุดโครโมโซมจำนวนเท่าใด ?

1) จำนวน 2 ชุด

2) จำนวน 3 ชุด

3) จำนวน 4 ชุด

4) จำนวน 5 ชุด

39. ก่อนการผสมกับไข่ เจเนอเรทีฟ นิวเคลียส มีการแบ่งตัวแบบใด ?

1) meiosis

2) mitosis

3) binary fission

4) ทุกข้อ

40. double fertilization ผลที่เกิดขึ้นคือ ?

1) ไซโกต

2) เอนโดสเปิร์ม

3) นิวเซลลัส

4) 1) และ 2) ถูกต้อง

41. ละอองเกสรจากต่างที่กันผสมกับไข่และโพลาร์นิวคลีไอในรังไข่เดียวกันเรียกว่า ?

1) homozygote

2) heterozygote

3) heterofertilization

4) homofertilization

42. พืชที่ผสมตัวเองถ้ามีการถ่ายละอองเกสรเกิดขึ้นก่อนดอกบาน เรียกว่า ?

1) chasmogamy

2) allogamy

3) cleistogamy

4) ทุกข้อ

43. มะละกอ จัดเป็นพืชที่มีการสืบพันธุ์ในลักษณะใด ?

1) protrandy

2) diecious

3) monoecious

4) protogyny

44. พืชที่มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่บนต้นเดียวกัน เรียกว่า ?

1) protrandy

2) diecious

3) monoecious

4) protogyny

45. พืชที่มีเกสรตัวเมียแก่ก่อนเกสรตัวผู้เรียกว่า ?

1) protrandy

2) diecious

3) monoecious

4) protogyny

46. ลักษณะที่ละอองเกสรตัวผู้ไม่งอกหรืองอกได้ช้าบนยอดเกสรตัวเมียเรียกว่า ?

1) sporophytic incompatibility

2) gametophytic incompatibility

3) heteromorphic incompatibility

4) homomorphic incompatibility

47. ดอกไม้แบบ thrum มีลักษณะแบบใด ?

1) อับเรณูอยู่เหนือยอดเกสรตัวเมีย

2) อับเรณูอยู่ต่ำกว่ายอดเกสรตัวเมีย

3) อับเรณูอยู่ระดับเดียวกันกับยอดเกสรตัวเมีย

4) 1) และ 2) ถูกต้อง

48. วิธีการแก้ไขการผสมตัวเองไม่ติดควรแก้ไขอย่างไร ?

1) การลอกผิวหน้ายอดเกสรตัวเมีย

2) การทำ bud pollination

3) การผสมเกสรในที่อุณหภูมิต่ำ

4) ทุกข้อ

49. ป่าประเภทใดที่มีความหลากหลายทางด้านชีวภาพมากที่สุด ?

1) ป่าร้อนชื้น

2) ป่าผลัดใบ

3) ป่าสนเขา

4) 1) และ 2) ถูกต้อง

50. ขั้นตอนแรกของการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมพืชคือข้อใด ?

1) การสำรวจค้นหา

2) การนำพันธุ์เข้ามาจากแหล่งอื่น

3) การเก็บรักษา

4) การแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรม

51. การนำพันธุ์พืชจากแหล่งอื่นเข้ามาในประเทศจะต้องผ่านด่านใด ?

1) prohibited

2) restricted

3) plant quarantine

4) 1) และ 2) ถูกต้อง

52. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพธรรมชาติสัมพันธ์กับข้อใด ?

1) ex situ

2) in situ

3) testube

4) green house

53. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชนอกสภาพธรรมชาติคือ ?

1) ex situ

2) in situ

3) testube

4) green house

54. การประกาศพื้นที่ให้เป็นป่าสงวนหรือ วนอุทยานแห่งชาติ สัมพันธ์กับข้อใด ?

1) ex situ

2) in situ

3) testube

4) green house

55. การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอพืชในหลอดแก้วคือการเก็บรักษาแบบใด ?

1) ex situ

2) in situ

3) testube

4) green house

56. การศึกษาความสำคัญทางเศรษฐกิจของพืชจัดเป็นขั้นตอนใดของการอนุรักษ์ ?

1) การรวบรวมเชื้อพันธุกรรม

2) การประเมินผล

3) การพัฒนาเชื้อพันธุกรรม

4) การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์

57. การศึกษาด้านพันธุศาสตร์ เซลล์วิทยา สัมพันธ์กับข้อใดมากที่สุด ?

1) การรวบรวมเชื้อพันธุกรรม

2) การประเมินผล

3) การพัฒนาเชื้อพันธุกรรม

4) การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์

58. การทดสอบพันธุ์พืชในสภาพไร่นาของเกษตรกร ความหมายตรงกับข้อใด ?

1) การรวบรวมเชื้อพันธุกรรม

2) การประเมินผล

3) การพัฒนาเชื้อพันธุกรรม

4) การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์

59. พืชพันธุ์ป่ามีลักษณะพิเศษกว่าพืชพันธุ์ปลูกตามข้อใดมากที่สุด ?

1) การเจริญเติบโต

2) การต้านทานโรคและแมลง

3) ผลผลิตสูง

4) คุณภาพสูง

60. การผสมข้ามชนิดระหว่างพืชป่ากับพืชปลูก ผลลัพธ์ที่ได้คือ ?

1) การเจริญเติบโต

2) การต้านทานโรคและแมลง

3) ผลผลิตสูง

4) ทุกข้อ

61. ข้อใดคือการใช้พืชพันธุ์ป่าเป็นแหล่งไซโตพลาซึม ?

1) การเจริญเติบโต

2) การต้านทานโรคและแมลง

3) ลักษณะความเป็นหมัน

4) คุณภาพสูง

62. การนำพืชพันธุ์ป่าที่มีปริมาณโปรตีนสูงมาช่วยปรับปรุงพันธุ์พืช สัมพันธ์ข้อใด ?

1) การเจริญเติบโต

2) การต้านทานโรคและแมลง

3) ผลผลิตสูง

4) คุณภาพ

63. การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลำต้นเตี้ยแคระ ความหมายตรงกับข้อใด ?

1) short stature

2) improve quality

3) cross ability

4) ทุกข้อ

64. คุณสมบัติของโคลนมีอะไรบ้าง ?

1) โคลนจากต้นพืชเดียวกันจะมีจีโนไทป์เหมือนกันทั้งหมด

2) โคลนมีสภาพเป็นพันธุ์ทาง

3) โคลนมีความสม่ำเสมอของพันธุ์

4) ทุกข้อ

65. ปรากฏการณ์ที่ต้นพืชต้นเดียวแต่มีเนื้อเยื่อมีจำนวนโครโมโซมต่างกันคือ ?

1) การเกิด chimerism

2) การเกิด mutation ของโครโมโซม

3) เกิดจากสภาพแวดล้อม

4) เกิดความผิดปกติของฮอร์โมน

66. ข้อใดไม่ใช่หลักการปรับปรุงโคลนในพืช ?

1) สำรวจข้อมูลพื้นฐานของพืช

2) การรวบรวมพันธุ์จากแหล่งที่ปลูกที่สำคัญ

3) การคัดเลือกพันธุ์ที่ดีที่สุดเพื่อขยายพันธุ์ต่อไป

4) ทำการปลูกทดสอบผลผลิต 1 ฤดู

67. ข้อใดต่อไปนี้กล่าวผิด

1) โคลนจากต้นพืชเดียวกันจะมีจีโนไทป์เหมือนกันทั้งหมด

2) โคลนมีสภาพเป็นพันธุ์ทาง

3) โคลนมีความสม่ำเสมอของพันธุ์

4) โคลนอาจได้มาจากต้นเดิมหรือเมล็ดพันธุ์ก็ได้

68. เพื่อให้เกิดความก้าวหน้าของการคัดเลือกพันธุ์ต้องทำอย่างไรบ้าง ?

1) ต้องให้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่รวบรวมมาด้วย

2) โคลนมีสภาพเป็นพันธุ์ทาง

3) โคลนมีความสม่ำเสมอของพันธุ์

4) ทุกข้อ

69. ลักษณะภายนอกที่ปรากฏให้เห็นด้วยสายตาเรียกว่าอย่างไร ?

1) phenotype

2) genotype

3) environmental

4) ทุกข้อ

70. การเกิดฟีโนไทป์ผลลัพธ์จากอะไร ?

1) genotype และสิ่งแวดล้อม

2) improve quality

3) cross ability

4) ทุกข้อ

71. การแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับข้อใด ?

1) penetance

2) expressivity

3) cross ability

4) ทุกข้อ

72. ข้อใดคือลักษณะทางคุณภาพ ?

1) color of seeds

2) tall

3) resistance of disease

4) ทุกข้อ

73. ยีนที่ควบคุมลักษณะทางคุณภาพเรียกว่าอย่างไร ?

1) minor gene

2) major gene

3) polygene

4) multiple gene

74. ลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนหลายคู่เรียกว่า ?

1) ลักษณะทางคุณภาพ

2) ลักษณะทางปริมาณ

3) ลักษณะทางสิ่งแวดล้อม

4) ทุกข้อ

75. การปรับตัวให้เข้ากับสภาพดินเค็มจัดเป็นลักษณะใด ?

1) ลักษณะทางคุณภาพ

2) ลักษณะทางปริมาณ

3) ลักษณะทางสิ่งแวดล้อม

4) ทุกข้อ

76. พฤติกรรมของยีนแบบ additive gene action เป็นแบบใด ?

1) การแสดงออกของยีนไม่เกี่ยวข้องกัน

2) การแสดงออกของยีนโดยตรง ไม่เกี่ยวข้องกัน

3) การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อม

4) ทุกข้อ

77. epistasis เกิดจากการแสดงออกของยีนเป็นแบบใด ?

1) non additive gene action

2) additive gene action

3) dominance gene action

4) ทุกข้อ

78. การข่มของลักษณะเด่นต่อลักษณะด้อยสัมพันธ์กับข้อใด ?

1) non additive gene action

2) additive gene action

3) dominance gene action

4) ทุกข้อ

79. ยีนที่ไม่ได้ลักษณะของสิ่งมีชีวิตโดยตรง เรียกว่า ?

1) non additive gene action

2) additive gene action

3) dominance gene action

4) modifying gene

80. ปรากฏการณ์ที่เกสรตัวผู้มีอิทธิพลต่อเอ็มบริโอและเอ็นโดสเปิร์มเรียกว่า ?

1) non additive gene action

2) additive gene action

3) modifying gene

4) xenia

81. การวัดความสามารถในการปรับตัวของพืชวัดได้จากอะไร ?

1) การปลูกทดสอบในที่ต่าง ๆ

2) การหาค่า regression

3) วัดจากค่า combining ability

4) ทุกข้อ

82. พืชที่มี genotype เดียวตรงกับข้อใดมากที่สุด ?

1) specific adaptation

2) general adaptation

3) modifying gene

4) xenia

83. พืชที่ประกอบด้วยหลาย genotype สัมพันธ์กับข้อใด ?

1) specific adaptation

2) general adaptation

3) modifying gene

4) xenia

84. พืชผสมตัวเองในธรรมชาติมีลักษณะพันธุกรรมเป็นแบบใด ?

1) heterozygous

2) homozygous

3) mutation

4) ทุกข้อ

85. ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในสภาพธรรมชาติเกิดจากสาเหตุใด ?

1) natural outcrossing

2) spontaneous mutation

3) environment

4) ถูกทั้งข้อ 1) และ 2)

86. การคัดเลือกพันธุ์พืชจะได้ผลก้าวหน้านั้นต้องมีปัจจัยใด ?

4) ประชากรต้องไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม

2) ประชากรต้องมีความแตกต่างทางพันธุกรรม

3) ต้องมีความแตกต่างทางสิ่งแวดล้อม

4) ประชากรต้องมีความแตกต่างด้านคุณภาพ

87. สาเหตุการกลายพันธุ์ของพืชเกิดจากสาเหตุใด ?

1) chromosome mutation 2) spontaneous mutation

3) gene mutation 4) ถูกต้องทุกข้อ

88. รังสีชนิดใดที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชได้ ?

1) รังสีเอกซ์ 2) รังสีเบต้า

3) รังสีแกมม่า 4) ถูกต้องทุกข้อ

89. สารเคมีชนิดใดที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ?

1) EMS 2) nitrous acid

3) morphine 4) ถูกต้องทุกข้อ

90. อวัยวะส่วนใดของพืชที่นิยมฉายรังสี ?

1) เมล็ด 2) ราก

3) หัว 4) ถูกต้องทุกข้อ

91. ปริมาณของรังสีมีหน่วยเรียกว่าอะไร ?

1) กรัม 2) ลูกบาศก์

3) กิโลกรัม 4) กิโลแรด

92. พืชที่มีจำนวนชุดโครโมโซมขาดหรือเกินไปทั้งชุดเรียกว่า ?

1) Euploid 2) Autoploid

3) Alloploid 4) Autopolyploid

93. ถ้าพืชมีชุดโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นเหมือนชุดเดิมเราเรียกพืชนั้นว่าอะไร ?

1) Euploid 2) Autoploid

3) Autopolyploid 4) ข้อ 2 และ 3 ถูกต้อง

94. สารชนิดใดที่นิยมใช้ชักนำให้เกิด Polyploid แก่พืช ?

1) Colchicine 2) Amine

3) Nitrous 4) ABA

95. สารที่ก่อให้พืชเกิดโพลีพลอยดี้นั้นจะไปทำปฏิกิริยากับส่วนใดในเซลล์พืช ?

1) Vacuole 2) Spindle fiber

3) Mitochondria 4) Lysosome

96. พืชชนิดใดเมื่อมีชุดโครโมโซมเป็นแบบดิพลอยด์แล้วจะไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ?

1) กล้วย

2) อ้อย

3) กาแฟ

4) ผักกาดหอม

97. การใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่เก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชไว้ในหลอดแก้วเรียกว่าอะไร ?

1) in vitro germplasm 2) Field gene bank

3) in vivo germplasm 4) ถูกทุกข้อ

98. การเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสภาพที่อุณหภูมิเย็นจัดนิยมใช้ร่วมกับสารใด ?

1) Alcohol 2) Nitrous

3) Liquid nitrogen 4) Liquid hydrogen

99. อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับรักษาเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่เย็นจัดคือเท่าใด ?

1) - 100 $^{\circ}$ C 2) – 196 $^{\circ}$ C

3) - 200 $^{\circ}$ C 4) – 216 $^{\circ}$ C

100.การแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพต้นอ่อนนิยมนำมาใช้กับพืชชนิดใด ?

1) มะพร้าว 2) อ้อย

3) มันชนิดต่าง ๆ 4) ถูกทุกข้อ

เฉลยแบบประเมินผลหลังเรียน

1. 1) 2. 4) 3. 1) 4. 4) 5. 4) 6. 1) 7. 4) 8. 2) 9. 4) 10. 4)

11. 1) 12. 4) 13. 3) 14. 2) 15. 4) 16. 1) 17. 1) 18. 4) 19. 2) 20. 1)

21. 1) 22. 2) 23. 1) 24. 4) 25. 2) 26. 1) 27. 4) 28. 1) 29. 1) 30. 3)

31. 1) 32. 1) 33. 4) 34. 1) 35. 3) 36. 4) 37. 1) 38. 4) 39. 2) 40. 1)

41. 2) 42. 4) 43.3) 44. 1) 45. 2) 46. 3) 47. 4) 48. 2) 49. 1) 50. 4)

51. 1) 52. 1) 53. 3) 54. 2) 55. 1) 56. 1) 57. 1) 58. 1) 59. 3) 60. 4)

61. 4) 62. 1) 63. 4) 64. 4) 65. 1) 66. 4) 67. 1) 68. 4) 69. 4) 70. 1)

71. 1) 72. 1) 73. 1) 74. 4) 75. 2) 76. 2) 77. 1) 78. 2) 79. 1) 80. 3)

81.4) 82. 1) 83. 4) 84. 2) 85. 4) 86. 2) 87. 4) 88. 4) 89. 4) 90.1)

91. 4) 92. 1) 93. 4) 94. 1) 95. 2) 96. 2) 97. 1) 98. 3) 99. 2) 100. 4)

****