บทที่ 2

ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับปาล์มน้ำมัน

1.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic classification)

Class : Angiospermae

Subclass : Monocotyledon

Order : Palmales

Family : Palmae

Sub-family : Cocoideae

Genus : *Elaeis*

Species : *guineensis*

Scientific name : *Elaeis guineensis*

Common name : Oil palm

1.2 ถิ่นกำเนิดของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้น (perennial crop) ใบเลี้ยงเดี่ยวและเป็นพืชที่ผสมข้ามต้นกันเนื่องจากช่อดอกเกสรตัวผู้และช่อดอกเกสรตัวเมียออกดอกไม่พร้อมกัน (Uhl and Dransfield,1987) ซึ่งพืชในสกุล *Elaeis* ประกอบด้วยปาล์มน้ำมัน 3 ชนิด (species) คือ

1.2.1 *Elaeis guineensis* ปาล์มน้ำมันในกลุ่มนี้อาจเรียกว่า African oil palm ซึ่งมีความหมายจากรากศัพท์ว่า *Elaeis* มีความหมายตรงกับคำ elaion ซึ่งแปลว่า น้ำมัน ส่วนคำว่า guineensis มีความหมายว่า แหล่งรวบรวมอยู่ที่ประเทศ Guinea แอฟริกาตะวันตก ซึ่งลักษณะของปาล์มน้ำมัน *E. guineensis* จะให้ผลผลิตต่อทะลายสูง มีน้ำหนักผล เปลือกนอกต่อผลและผลผลิตน้ำมันสูง ดังนั้นปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดที่นิยมปลูกกันเป็นการค้าในปัจจุบัน สามารถแยกได้เป็น 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ดูรา (Dura) ฟิสิเฟอรา (Pisfera) และเทเนอรา (Tenera) โดยอาศัยความแตกต่างทางพันธุกรรมของลักษณะความหนาของกะลา (endocarp)

1.2.2 *Elaeis oleifera* (American oil palm) เดิมเรียก *Elaeis melanococca* หรือ โคโรโซ (Corozo) มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางภาคเหนือของลุ่มน้ำอะเมซอนในอเมริกาใต้ยาวติดต่อไปถึง

อเมริกากลางและคอสตาริกา ลักษณะต้นเตี้ยและต้านทานต่อโรคตาเน่า (lethal bud rot) (Anon,1974) มีเปอร์เซ็นต์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (unsaturated fatty acid) ค่าไอโอดีน (iodine value) สูงถึง 77-78% (Macfarlane *et al*.,1975) รวมทั้งมีวิตามินเอและวิตามินอีสูง แต่ให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันน้อยกว่าปาล์มน้ำมัน *E.guineensis* มีการเจริญเติบโตช้าและผลขนาดเล็ก ดังนั้นจึงไม่นิยมปลูกเป็นการค้า แต่ปัจจุบันมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับปรับปรุงพันธุ์ โดยการผสมข้ามระหว่างสปีชีส์

1.2.3 *Elaeis odora* เดิมทีเดียวจัดอยู่ใน *Barcella odora* (มีรายงานว่าพบปาล์มน้ำมันชนิดนี้ขึ้นอยู่บริเวณเดียวกับ *E. oleifera* แถบลุ่มน้ำอะเมซอน) ลักษณะของปาล์มชนิดนี้ต่างจาก 2 พวกแรกคือ ในช่อดอกเดียวกันมีทั้งส่วนของตัวผู้และตัวเมีย โดยตัวเมียจะอยู่ตรงส่วนฐานของ spikelet แต่อย่างไรก็ตามลักษณะช่อดอกดังกล่าวนี้ก็สามารถค้นพบใน *E. guineensis* และ *E. oleifera* ที่ผิดปกติโดยเฉพาะในปาล์มที่มีอายุน้อย ซึ่ง Wessel Boes ถือว่าลักษณะดังกล่าวนี้ไม่มีความแตกต่างพอที่จะแยกไปอยู่อีก genus ความสำคัญของปาล์มน้ำมันชนิดนี้ยังไม่มีรายงาน (เอกชัย, 2548, น. 57-59)

1.3 ลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน

1.3.1 ราก

ปาล์มน้ำมันไม่มีรากแก้ว เป็นเพียงรากฝอยทำหน้าที่ช่วยค้ำจุนลำต้น ดูดซับน้ำและธาตุอาหาร โดยรากชุดแรกที่อยู่ระดับแนวนอนยาว 3-4 เมตรจากลำต้น มีบางส่วนอยู่ในแนวดิ่งยาว 1-2 เมตรจากผิวดิน รากชุดที่สอง สามและสี่ จะเกิดเรียงตามลำดับ โดยทั่วไปจะเกิดมากและสามารถดูดซับน้ำและธาตุอาหารมาใช้ประโยชน์ที่ระดับความลึก 30-50 เซนติเมตรจากผิวดิน เป็นพืชที่มีระบบรากตื้นเมื่อเทียบกับพืชยืนต้นอื่นๆในขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนรากที่เป็นรากหาอาหารนั้นจะมีความหนาแน่นรอบโคนรัศมี 3-4 เมตร การแผ่กระจายของรากจะลึกหรือกว้างห่างจากโคนต้นเท่าไรขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เนื้อดิน และความลึกของระดับน้ำในดิน การเจริญและการแผ่กระจายของรากปาล์มน้ำมันจะตอบสนองต่อความชื้นและแหล่งธาตุอาหารในดิน ดังนั้นจึงพบรากปาล์มน้ำมันในบริเวณที่มีความชื้นดินสูงและมีธาตุอาหารอุดมสมบูรณ์ (ฉกรรจ์ สังข์ทอง, 2542, น. 31-32)

1.3.2 ลำต้น

ลำต้นของปาล์มน้ำมันมีลักษณะตั้งตรง ซึ่งในช่วงแรกที่มีการพัฒนา ฐานของลำต้นจะมีรูปร่างแบบกรวยหัวกลับ (inverted cone) รากชุดแรกจะสร้างจากฐานของลำต้นนี้ทั้งใต้พื้นดินและเหนือพื้นดินเล็กน้อย ต่อมาปล้องของลำต้นจะยืดยาวเป็นลำต้นทรงกลมมีฐานใบติดอยู่ ลำต้นของปาล์มน้ำมันเรียกว่า bole ซึ่งกว่าจะปรากฏให้เห็นก็ใช้เวลา 2-3 ปี รอยแผลที่ฐานใบติดกับลำต้นคือ ข้อของลำต้น ลำต้นของปาล์มน้ำมันก็เหมือนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไปที่มีเนื้อเยื่อเจริญเฉพาะปลายยอด (apical meristem) เท่านั้น จะไม่มีเนื้อเยื่อเจริญทางด้านข้าง (lateral meristem) แต่การเจริญเติบโตของปาล์มน้ำมันในช่วงแรกก่อนที่จะมีการยืดตัวของปล้องเป็นไปทางด้านกว้างมากกว่าด้านสูง ทั้งนี้เนื่องจากกิจกรรมของเยื่อเจริญที่ฐานของฐานใบ (primary thickening meristem) ซึ่งมีการแบ่งตัวอยู่ในแนวเฉียง (tangential phase) เมื่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นโตเต็มที่ (40-60 เซนติเมตร) ก็จะเจริญทางด้านความสูงแทนอย่างรวดเร็วในอัตรา 35-75 เซนติเมตรต่อปี การเจริญทางด้านนี้เนื่องมาจากกิจกรรมของเยื่อเจริญปลายยอดที่ตา ปลายยอด (terminal bud) ซึ่งหากถูกทำลายเมื่อใดก็จะตายทันที มีน้อยมากที่จะมีโอกาสแตกแขนงใหม่ ในปาล์มที่มีอายุมากเนื้อเยื่อเจริญดังกล่าวจะฝังอยู่ลึก 2.5-4 เซนติเมตร จากปลายยอด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-12 เซนติเมตร ยอดของปาล์มมีรูปร่างเป็นแบบกรวย ฝังอยู่ในลำต้นอันประกอบด้วยใบอ่อน และฐานใบที่มนเรียกว่า cabbage สามารถนำมารับประทานได้ ต่อมาจะพัฒนาไปเป็นใบหรือตาดอกได้ ลำต้นของปาล์มมีหน้าที่สำคัญคือ ชูใบให้รับแสงเพื่อสังเคราะห์อาหาร ลำเลียงน้ำและอาหารโดยผ่านระบบเนื้อเยื่อลำเลียงซึ่งเป็นกลุ่มมัดท่อน้ำและท่ออาหาร ถึง 20,000 หน่วย ประกอบด้วยระบบเนื้อเยื่อที่มีชีวิตคือ phloem ส่วนใหญ่ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายทางลง และระบบเนื้อเยื่อลำเลียงภายซึ่งเป็นเส้นใยที่ไม่มีชีวิตเป็นจำนวนมาก ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายทางขึ้น ระบบเนื้อเยื่อดังกล่าวติดต่อถึงกันตลอดทั้งลำต้นและใบ ฐานของใบจะติดกับลำต้นตรงข้อ อย่างน้อย 12 ปี หรืออาจนานกว่านั้นจึงจะหลุดออกไปแล้วทำให้ลำต้นเกลี้ยงไม่ขรุขระ

1.3.3 ใบ

ใบของปาล์มน้ำมันเกิดจากการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของลำต้น ซึ่งมีความสามารถในการที่จะผลิตใบได้ถึง 50 ใบ สิ่งแรกที่พัฒนาให้เห็นก่อนคือยอดที่เรียกว่า spear หลังจากนั้นจึงคลี่ใบอ่อนให้เห็น ในช่วงแรกของการเกิดใบมีการพัฒนาช้ามาก แต่ละใบอาจใช้เวลาถึง 2 ปี ใบที่แก่และมีการพัฒนาเต็มที่ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้คือ

1.3.3.1 ทางใบ (rachis) ประกอบด้วยเส้นใยที่แข็งแรงเป็นจำนวนมาก มีความยาวถึง 8 เมตร เมื่อตัดตามขวางพบว่า ปลายทางใบมีลักษณะค่อนข้างเป็นวงกลม มีลักษณะสมมาตร ประกอบด้วยทางใบด้านบนที่มีความโค้งน้อยกว่าเรียกว่า adaxial และทางใบด้านล่างเรียกว่า abaxial face ส่วนด้านข้างทั้ง 2 ด้าน (lateral face) เป็นที่ตั้งของใบย่อยในตำแหน่งที่ตรงกันบนทางใบ ส่วนตอนกลางถึงโคนของทางใบมีลักษณะแบนราบกว่า และไม่สมมาตรเหมือนปลายทาง แต่ส่วนประกอบอื่นๆ เหมือนกัน

1.3.3.2 ก้านใบ (petiole) จะสั้นกว่าทางใบ แต่มีขนาดใหญ่กว่าประกอบด้วยเส้นใยที่แข็งแรงและมากกว่า ในปาล์มบางพันธุ์ เช่น ปาล์มเดลี พบว่ามีความยาวของก้านใบถึง 4 ฟุต เมื่อตัดตามขวางดูไม่พบหน้าด้านข้างทั้ง 2 หน้า แต่จะพบหนามแหลมทั้ง 2 ข้างของก้านใบ หนามที่พบมี 2 ชนิดคือ หนามที่เกิดจากเส้นใยของกาบใบเรียกว่า fiber spines และหนามที่เกิดจากเส้นกลางใบของใบย่อยเรียกว่า mid-rib spines ซึ่งมีขนาดเท่าๆ กัน เกิดจากใบย่อยที่พัฒนาไม่สมบูรณ์ แผ่นใบถูกฉีกขาดออกไปเหลือไว้เพียงหนาม ตรงรอยเชื่อมระหว่างทางใบกับก้านใบเป็นที่ตั้งของใบย่อยที่มีแผ่นใบกุด (vestigial laminae)

1.3.3.3 ใบย่อย (leaflets) เกิดจากการแตกของใบที่ติดกันในระหว่างการยืดตัวของแกนใบของยอดตรงตำแหน่งหน้าด้านข้างของทางใบ ซึ่งตอนแรกเกิดจะทำมุมตั้ง เมื่อยอดเริ่มคลี่บานและเปิดออก แต่ละใบจะยืดยาวออกอย่างรวดเร็ว ทำมุมฉากกับทางใบ แต่ละใบจัดเรียงขนานสลับกันแบบขนนก (pinnately compound leaves) อาจมี 2-3 ใบที่มีตำแหน่งตรงกัน จำนวนใบย่อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุของต้นและความอุดมสมบูรณ์ของดิน แต่อยู่ในช่วง 150-250 คู่ ใบย่อยแต่ละใบประกอบด้วย เส้นใบ (vein) มีการเรียงตัวแบบขนาน เส้นกลางใบย่อย (mid-rib) อยู่บริเวณกลางตัวใบและแผ่นใบที่มีลักษณะแคบยาว ความยาวของใบย่อยคู่ที่ยาวที่สุดอาจยาวเกินกว่า 1-2 เมตร และใบย่อยคู่สุดท้ายจะมีรูปร่างคล้ายรูปไข่ เรียกว่า terminal pair of ovate leaf

จำนวนใบของปาล์มน้ำมันที่ผลิตในแต่ละปีอยู่ระหว่าง 30-40 ใบเมื่ออายุ 5 หรือ 6 ปี หลังจากนั้นจะลดลงเป็น 20-25 ใบต่อปี การผลิตทางใบของปาล์มน้ำมันมี 2 แบบ สังเกตได้จากส่วนของตอใบที่ยังคงติดอยู่บนต้นหลังการตัดแต่ง แบบแรกคือการผลิตทางใบแบบวนซ้าย (left-hand phyllotaxy) แบบที่สองคือการผลิตทางใบแบบวนขวา (right-hand phyllotaxy) ลักษณะที่พบมากกว่า คือ ทางใบแบบวนขวา ซึ่งมีค่าการจัดเรียงตัวของใบเป็น -3/8 ทางใบที่ผลิตใหม่จะทำมุมกับทางใบที่มีอายุถัดมาประมาณ 137.5 องศาในแนวระดับ

1.3.4 ช่อดอก (inflorescences)

1.3.4.1 ช่อดอกตัวเมีย (female inflorescences) มีความยาว 30 เซนติเมตรหรือมากกว่า ประกอบด้วยช่อดอกย่อยที่มีความหนาแน่นตรงโคนช่อดอกมากกว่าตรงปลาย จำนวน 12-30 ช่อดอกย่อย แต่ละช่อจะมีใบประดับที่ยาว มีปลายแหลม เรียกว่า spinous bract การเรียงตัวของดอกย่อยเป็นแบบเกลียว และตอนปลายของดอกย่อยแหลม มีลักษณะเป็นหนาม ในช่อดอกย่อยประกอบด้วยดอกตัวเมียถึง 1,000 ดอก การเรียงตัวของดอกมีความหนาแน่นตรงกลางของช่อดอกย่อยมากกว่าส่วนล่างและส่วนบนของช่อดอกย่อย

1.3.4.2 ช่อดอกตัวผู้ (male inflorescences) เกิดบนก้านช่อที่ยาวกว่าก้านช่อดอกตัวเมีย ประกอบด้วย ช่อดอกย่อยที่มีรูปร่างทรงกระบอกยาวคล้ายนิ้วมือ (finger-like cylindrical spikelets) จำนวน 150 ช่อดอกย่อย ไม่มีหนาม ความยาวของช่อดอกย่อยอยู่ในช่วง 10-20 เซนติเมตร แต่ละช่อดอกย่อยมีใบประดับขนาดเล็ก สั้น ในช่อดอกย่อยมีดอกตัวผู้จำนวน 700-1,200 ดอก ดอกตัวผู้มีขนาดเล็กและสั้นกว่าดอกตัวเมีย

1.3.4.3 ช่อดอกผสม หรือช่อดอกกะเทย (mixed or hermaphrodyte inflorescences) ประกอบด้วย ช่อดอกย่อยตัวผู้และช่อดอกย่อยตัวเมียอยู่ในช่อดอกเดียวกัน ตำแหน่งตรงฐานของช่อดอกและช่อดอกย่อยตัวผู้จะอยู่ส่วนบนถัดขึ้นไป พบในปาล์มที่อายุยังน้อย (3-4 ปี) เพิ่งผลิตช่อดอกครั้งแรก

ในช่อดอกแต่ละประเภทก็มีชนิดของดอกแตกต่างกัน 2 ประเภท ดังนี้

ก. ดอกตัวผู้ (staminated or male flowers) พบในช่อดอกตัวผู้และช่อดอกผสม มีตำแหน่งที่ตั้งบนช่อดอกย่อยตัวผู้ มีส่วนประกอบต่างๆ เป็นวงดังนี้ perianthe จำนวน 6 กลีบเรียงกัน 2 วง เกสรตัวผู้ที่ติดกันเป็นหลอดจำนวน 6-7 อัน เกสรตัวเมียขนาดเล็กลีบไม่ทำงาน (rudimentary pistil) ซึ่งประกอบด้วยรังไข่ที่มียอดเกสรตัวเมีย 3 แฉก การบานของดอกตัวผู้เริ่มจากโคนของช่อดอกย่อยไปยังปลาย การแพร่กระจายของละอองเกสรอยู่ในช่วงเวลา 2-3 วัน หลังจากที่มีการถ่ายละอองเกสร และหมดอายุใน 5 วัน จำนวน 1 ช่อดอก จะผลิตละอองเกสรได้ 25-20 กรัม

ข. ดอกตัวเมีย ประกอบด้วยชั้นต่างๆ จากนอกสุดเข้ามาคือ กลีบประดับ (bract) 1 กลีบ กลีบรอง (bracteoles) 2 กลีบ ดอกตัวผู้ที่มีขนาดลีบเล็กไม่สามารถให้ละอองเกสรได้ (accompanying androecium)2 ดอก กลีบดอก (perianthes) 6 กลีบ เรียงกันเป็น 2 วง ถัดเข้ามาอีกเป็นเกสรตัวผู้ที่ไม่สามารถทำงานได้ (rudimentary androecium) ล้อมรอบส่วนของรังไข่ที่มี

จำนวนพูรังไข่ 3 พู และมียอดเกสรตัวเมีย 3 แฉกบนก้านชูที่หนา สั้น มีสีขาว บนรังไข่ ยอดเกสรตัวเมียจะมีขนปกคลุมและมีเมือกเหนียว เมื่อพร้อมที่จะผสม

1.3.5 ผลและเมล็ด

หลังจากที่ช่อดอกตัวเมียได้รับการผสมเรียบร้อย ประมาณ 5 1/2 เดือนขึ้นไป ผลปาล์มจะสุกให้ทะลายของผลที่มีรูปร่างคล้ายรูปไข่ ขนาดความกว้าง x ความยาว เฉลี่ย 35x50 ตารางเซนติเมตร ประกอบด้วยผลชั้นนอกมีรูปร่างและสีสรรตามที่ต้องการ ผลชั้นในมีลักษณะแบนไม่ค่อยมีสีเนื่องมาจากถูกบีบโดยผลชั้นนอก ผลที่เกิดโดยไม่มีการผสม (parthenocarpic fruits) มีเพียงจำนวนน้อย ผลที่ไม่ให้น้ำมัน (unfertiles fruit) จำนวนผลทั้งหมดรวมแล้วประมาณ 500-4,000 ผล เฉลี่ย 1,500 ผล น้ำหนัก 10-30 กิโลกรัมหรืออาจถึง 100 กิโลกรัม การสุกของผลจะเริ่มจากฐานดอกขึ้นมา

1.3.5.1 ผล (fruit) ของปาล์มน้ำมันมีผลเป็นแบบ sessile drupe ไม่มีก้านผล มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันออกไปตั้งแต่ กลม รูปไข่ ถึงยาวรี ความยาวของผล 2-5 เซนติเมตร น้ำหนักของผล 3-20 กรัม ในผลแต่ละผลประกอบด้วยชั้นต่างๆ ดังนี้

1.3.5.1.1 เปลือกผลชั้นนอก (pericarp) มีสีแตกต่างกันเนื่องจากรงควัตถุที่สร้างแตกต่างกัน ทำให้แบ่งชนิดผลตามรงควัตถุที่สร้างได้ 3 ชนิด

1.3.5.1.2 เปลือกผลชั้นกลาง (mesocarp or pulp) ประกอบด้วยเส้นใยที่มีน้ำมันปาล์มอยู่มากมาย มีรงควัตถุพวก carotene จึงทำให้เห็นเป็นสีเหลืองเข้ม น้ำมันส่วนใหญ่สกัดได้จากส่วนนี้ ความหนาของผลชั้นกลางแตกต่างกันออกไปแล้วแต่พันธุ์ และความอุดมสมบูรณ์ของดินโดยเฉลี่ยอยู่ในระหว่าง 35-96% ของส่วนประกอบทั้งผล

1.3.5.1.3 เปลือกผลชั้นใน (endocarp) เป็นชั้นในสุดมีลักษณะเป็นกะลาแข็ง ประกอบด้วยเซลล์หินเป็นส่วนมาก ในปาล์มน้ำมันบางพันธุ์อาจไม่มีผลชั้นในเลย และบางพันธุ์หนามากถึง 8 มิลลิเมตร ก็มี ลักษณะดังกล่าวควบคุมโดยยีน 1 คู่ คือยีน allele sh^{+} และ sh^{-} ซึ่งใช้เป็นตัวจำแนกพันธุ์ได้ ผลชั้นในส่วนใหญ่มักมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ

1.3.5.2 เมล็ด (seeds) ประกอบด้วยเปลือกหุ้มเมล็ด (testa or seed coat) ที่แข็งมาก พัฒนามาจากส่วนของผลชั้นใน ปลายด้านหนึ่งของเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นที่ตั้งของ ตา 3 ตา ตาอันหนึ่งเป็นตานิ่มที่จะยอมให้น้ำผ่าน และต้นอ่อนงอกออกมาได้ บนตาอันนี้จะมีเส้นใย (fibre plug) ปกคลุมอยู่ ถัดเข้ามาก็เป็นชั้นที่สะสมอาหารที่เรียกว่า kernel องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไขมัน (fat) และน้ำมัน (oil) เอาไว้เลี้ยงต้นอ่อน (embyo) ระยะแรก และสามารถนำมาสกัดน้ำมันได้ด้วย ชั้นอาหารสะสมนี้จะล้อมรอบแกนของคัพภะ (embryo axis) ซึ่งมีขนาดเล็ก ประกอบด้วย

รากอ่อน (radicle) ยอดอ่อน (plumule) และใบเลี้ยง (haustorium) เมื่อเมล็ดมีสภาพแวดล้อมเหมาะแก่การงอกจะเริ่มขบวนการงอกโดยรากอ่อนจะโผล่ออกมาก่อนทางตานิ่ม หลังจากนั้นยอดอ่อนโผล่ออกมาเชื่อมกับรากอ่อนตรงเยื่อที่เรียกว่า ligule ซึ่งเป็นที่เกิดของรากแรก และต่อมา ligule จะพัฒนาไปเป็นลำต้น ต้นอ่อนจะได้รับอาหารใบเลี้ยงในช่วงแรกโดยผ่านทางก้านใบเลี้ยงที่เชื่อมติดกับ ligule จนกว่าจะมีใบจริงผลิตอาหารเองได้ ใบเลี้ยงก็จะเริ่มเหี่ยวหมดสภาพไป (เอกชัย , 2548, น. 10-16)

1.4 กลุ่มพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน การเลือกใช้พันธุ์ปาล์มน้ำมันมีความสำคัญมาก ถ้าเลือกใช้พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ไม่ดี ก็จะส่งให้มีลักษณะที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นมากในประชากรลูกผสม ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมากขึ้น ดังนั้นจึงต้องเข้าใจลักษณะของปาล์มน้ำมันในแต่ละสายพันธุ์ว่ามีลักษณะที่ต้องการและลักษณะที่ไม่ต้องการอย่างไร เพื่อนำไปปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้ได้ลักษณะที่ดีตามที่ต้องการได้ ซึ่งลักษณะพันธุ์มีดังนี้ (อรรัตน์ และ ศิริชัย, 2545)

1.4.1 ประชากรแหล่งพันธุ์แม่

1.4.1.1 Deli dura เป็นกลุ่มพันธุ์ที่แหล่งปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่คัดเลือกเป็นต้นแม่ในการผลิตเมล็ดพันธุ์แหล่งพันธุ์นี้ มีประวัติว่าได้นำพันธุ์ปาล์มน้ำมันมาจากอัฟริกาเมื่อปีพ.ศ. 2391ไปปลูกที่สวนพฤกษศาสตร์ที่เมืองเดลี (Deli) ประเทศอินโดนีเซีย จำนวน 4 ต้น หลังจากนั้นก็นำไปปลูกที่เกาะสุมาตรา ส่วนหนึ่งปลูกที่เมืองเดลี จากการคัดเลือกได้ต้นที่มีลักษณะดี จึงเรียกชื่อพันธุ์ที่ได้พัฒนาว่า Deli dura ลักษณะสำคัญ คือให้ผลผลิตทะลายสดสูงและสม่ำเสมอ ผลผลิตน้ำมันสูง

1.4.1.2 Dumpy dura เป็นปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะต้นเตี้ย ลำต้นและทะลายใหญ่ การติดผลสูง ใช้เป็นแม่พันธุ์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ในอินโดนีเซีย มีประวัติพันธุ์ว่าได้คัดเลือกต้นมาจากกลุ่มพันธุ์ Deli dura

1.4.1.3 Kazemba หรือ African dura เป็นพันธุ์แม่ดูราที่มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปอัฟริกาและศูนย์วิจัยในทวีปอัฟริกา นิยมใช้เป็นแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ แต่แม่พันธุ์ชนิดนี้มีข้อด้อย คือ ลำต้นสูงเร็ว และขนาดทะลายเล็ก

1.4.2 ประชากรแหล่งพันธุ์พ่อ

1.4.2.1 AVROS เป็นกลุ่มพันธุ์ที่ใช้เป็นแหล่งพันธุ์พ่อ โดยสถาบัน AVROS ประเทศอินโดนีเซียได้รับมาจากสวนพฤกษศาสตร์ EALA ประเทศแซร์ คัดเลือกได้สายพันธุ์ที่ดีเด่น

เรียกว่า SP 540 ที่มีลักษณะดี ซึ่งใช้เป็นพ่อพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ และผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม Deli x AVROS แพร่หลายที่สุด ในปี พ.ศ. 2478 สถาบัน AVROS ได้สร้างคู่ผสม Deli Dura x SP 540 ซึ่งพบว่าให้ผลดีกว่า Deli Dura ที่ปลูกเป็นการค้าในขณะนั้น และลูกผสมนี้ก็ยังคงลักษณะให้ผลผลิตได้ดี มีความสม่ำเสมอ ใช้ปลูกในทวีปเอเชียและอเมริกา ลูกผสม Deli x AVROS มีลักษณะสูงเร็ว กะลาบาง ผลเป็นรูปไข่ และให้ผลผลิตน้ำมันสูง และมีลักษณะต่างๆ ค่อนข้างสม่ำเสมอ

1.4.2.2 Yangambi เป็นกลุ่มพันธุ์พ่อที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับ AVROS มีถิ่นกำเนิดในประเทศแซร์ ทวีปอัฟริกา ดังนั้นลักษณะลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อกลุ่ม Yangambi จะมีลักษณะคล้ายลูกผสมที่มีพันธุ์พ่อจากกลุ่มพันธุ์ AVROS

1.4.2.3 La Mé เป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีการปรับปรุงพันธุ์ที่เมือง La Mé ประเทศไอวอรีโคสต์ ในทวีปอัฟริกา ลักษณะของลูกผสมที่มีพ่อพันธุ์เป็นกลุ่ม La Mé จะมีต้นเตี้ย ผลเล็ก มีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำ ทะลายมีขนาดเล็ก กะลาหนากว่าลูกผสมอื่นๆ ขนาดเมล็ดในเล็กแต่เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ลักษณะเด่น คือ ก้านทะลายยาว ทำให้การเก็บเกี่ยวง่าย สถาบัน CIRAD และสถาบัน Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) ประเทศไอวอรีโคสต์ผลิตลูกผสม Deli x La Mé จำหน่าย

1.4.2.4 กลุ่มพันธุ์ที่มีบางสายพันธุ์ต้านทานต่อโรค fusarium wilt ลักษณะต้นเตี้ยและให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงกว่าพันธุ์จากกลุ่มอื่นๆ ปัจจุบันแหล่งปรับปรุงพันธุ์ในประเทศคอสตาริก้าผลิตลูกผสม Deli x Ekona จำหน่ายผลผลิตน้ำมันด้อยกว่ากลุ่มพันธุ์ AVROS เล็กน้อย

1.4.2.5 Calabar กลุ่มพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดเดิมจาก Calabar ประเทศไนจีเรีย ทวีปแอฟริกา ลูกผสมที่ใช้ Calabar เป็นพันธุ์พ่อ พบว่าเจริญเติบโตได้ดีในสภาพฝนตกชุก ความชื้นสูง และในสภาพที่แสงแดดน้อย (ต่ำกว่า 360 แคลอรี/เซนติเมตร/วัน) สีผลเป็นแบบ virescens (ผลดิบมีสีเขียวและเปลี่ยนเป็นสีส้มเมื่อสุก) ปัจจุบันแหล่งปรับปรุงพันธุ์ในคอสตาริก้าผลิตพันธุ์นี้จำหน่าย ตัวอย่างลูกผสมชุดนี้คือ Deli x GHANA

1.4.2.6 Ghana เป็นสายพันธุ์พ่อที่เป็นที่รู้จักกันในสายพันธุ์ดั้งเดิม จากประเทศไนจีเรีย ซึ่งสถาบันวิจัย Nigerian Institute for Oil Palm Research (NIFOR) สายพันธุ์นี้ได้รับการแนะนำจนเป็นที่รู้จักกันในประเทศคอสตาริก้าจากสถาบัน การทดลองของประเทศกานาในปี 1977 ลักษณะที่สำคัญของสายพันธุ์นี้คือ ต้นเตี้ย ทางใบสั้น ผลผลิตสูง 5-6 ตัน/ไร่/ปี 1 ไร่ปลูกได้ 28 ต้น เปอร์เซ็นต์น้ำมันมากกว่า 28% อายุการเก็บเกี่ยวยาว นานถึง 30 ปี ผลสีดำ เหมาะกับสภาพพื้นที่ภาคใต้

1.4.2.7 Tanzania พันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดเดิมจากประเทศแทนซาเนีย และเชื้อพันธุ์นี้ที่ประเทศไทยได้รับมาจากเมือง Kigoma ลักษณะเด่นที่ปรากฏ คือ กะลาบาง ปัจจุบันบริษัท ASD ประเทศคอสตาริก้า ได้ผลิตพันธุ์ลูกผสม Deli x Tanzania จำหน่ายเช่นกัน

1.4.2.8 DAMI กลุ่มพันธุ์นี้ได้รับการพัฒนาในเรื่องความหนาของกะลาเมล็ดปาล์ม ซึ่งเป็นลักษณะของการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ในปีพ.ศ. 2484 โดย Beirnaert และ Vanderweyen การปลูกนี้ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ของดูรา (Dura) ปาล์ม (D) กับละอองเกสรชนิดที่ไม่มีกะลา ฟิสิเฟอร่า (Pisifera) เพศเมียที่เป็นหมัน (P) เมล็ด D x P มีลักษณะกะลาหนาแบบดูรา ปาล์มแต่เนื้อเยื่อที่อยู่ในเมล็ดได้พัฒนาไปสู่เทอเนร่า (Tenera) ปาล์ม (T) กับการผสมข้ามพันธุ์ และกะลาที่บางของทลายนี้ให้ผลผลิตที่มากที่สุด

1.4.2.9 Nigeria เป็นปาล์มน้ำมันที่ได้รับการปรับปรุงอันเกิดจากความหลากหลายจากการผสมพันธุ์แม่ปาล์มของ Compact (เกิดขึ้นจากการผสมกับพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่มันเอง *E. oleifera* x *E. guineensis* ที่เป็นพันธุ์ผสมและไม่ได้บ่งบอกลักษณะพิเศษ ในสายพันธุ์ *E.guineensis* ของมัน) กับที่ได้มาจากพันธุ์พ่อ ซึ่งเริ่มขึ้นจากสถาบันการทดลองในประเทศกานา ได้รับการพัฒนาโดย NIFOR ในประเทศไนจีเรีย ซึ่งปาล์มชนิดนี้จะไม่สูงและลำต้นสั้นกว่า *E. guineensis* ดังนั้นมันสามารถปลูกใน 170 ต้นปาล์มต่อเฮกเตอร์ (เฮกเตอร์ เป็นหน่วยวัดพื้นที่เท่ากับ 10,000 ตารางเมตร/2.4 เอเคอร์) นอกจากนี้ลักษณะพิเศษเฉพาะของปาล์มชนิดนี้คือทะลายจะเริ่มปรากฏเป็นสีเขียวและกลายเป็นสีดำ

1.5 พันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis Jacquin*) เป็นพืชผสมข้าม ประเภทที่มีช่อดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่ช่วงเวลาการออกดอกจะไม่พร้อมกัน มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 32 โครโมโซม โฮโมโลกัสโครโมโซมจำนวน 16 แท่ง (2n=32) ความยาวโครโมโซมอยู่ระหว่าง 1.00-3.89 μm (Madon *et al.,* 1982, pp. 727-728) และมีขนาดจีโนมประมาณ 1.7 x 10^9 คู่เบส ซึ่งความยาวของโครโมโซมของปาล์มน้ำมันสปีชีส์ *Elaeis guineensis* และ *Elaeis oleifera* มีความยาวที่ไม่แตกต่างกัน และปาล์มน้ำมันสปีชีส์ *Elaeis guineensis* สามารถแยกได้เป็น 3 พันธุ์ ตามลักษณะของกะลาที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลจากยีนที่ควบคุมเพียงยีนเดียว (single gene) คือ ยีน *sh* แสดงในตารางที่ 2.1

1.5.1 พันธุ์ดูรา มีจีโนไทป์โฮโมไซกัสของแอลลีล sh^+ (sh^+ sh^+)(Chua et al., 2006) เป็นพันธุ์ที่มีชั้นของ mesocarp ประมาณ 35-50% ของน้ำหนักผลปาล์มทั้งหมด ส่วนของกะลา

หนา (ประมาณ 2-8 มิลลิเมตร) ปาล์มน้ำมันชนิดนี้พบมากในแถบตะวันออกไกล เช่น พันธุ์ Deli dura ซึ่งเป็นพันธุ์ดูราที่ปลูกในเกาะสุมาตราเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มดูราด้วยกัน ปัจจุบันมักจะใช้พันธุ์ดูราเป็นต้นแม่สำหรับปรับปรุงพันธุ์ที่ใช้ปลูกเป็นการค้า

1.5.1 พันธุ์ฟิสิเฟอรา ถูกควบคุมโดยจีโนไทป์โฮโมไซกัสแอลลีล sh^- (sh^- sh^-)(Chua et al., 2006) เป็นพันธุ์ที่มีกะลาบางมาก ชั้น mesocarp หนากว่าพันธุ์ดูรา เมล็ดใน (kernel) เล็ก ขนาดผลเล็ก ช่อดอกตัวเมียมักจะเป็นหมัน (Beirnaert และ Vanderweyen,1941, pp. 27) และมีจำนวนทะลายต่อต้นน้อย ไม่เหมาะจะปลูกเป็นการค้า ปัจจุบันใช้พันธุ์ฟิสิเฟอราเป็นต้นพ่อพันธุ์สำหรับผลิตลูกผสมเนื่องจากการไม่มีกะลาที่ช่วยสำหรับป้องกันต้นอ่อนที่กำลังพัฒนาในผลปาล์ม

1.5.2 พันธุ์เทเนอรา ถูกควบคุมโดยจีโนไทป์เฮเทอโรไซกัส (sh^+ sh^-)(Chua et al., 2006) เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างดูราและฟิสิเฟอรา โดยใช้พันธุ์ดูราเป็นแม่และฟิสิเฟอราเป็นต้นพ่อพันธุ์เทเนอราจะมีกะลาบางประมาณ 0.5-4 มิลลิเมตรหรือประมาณ 10% ของน้ำหนักผล ชั้น mesocarp หนาประมาณ 60-96% ของน้ำหนักผล มีจำนวนทะลายมากกว่าพันธุ์ดูรา น้ำมันใน mesocarp มีประมาณ 22-24% เนื่องจากพันธุ์ เทเนอราเป็นพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดีหลายประการ จึงมักนิยมปลูกเป็นการค้า ดังนั้นการคัดเลือกพันธุ์ปาล์มลูกผสมที่มีลักษณะกะลาบางจึงเป็นเป้าหมายหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์ปาล์ม

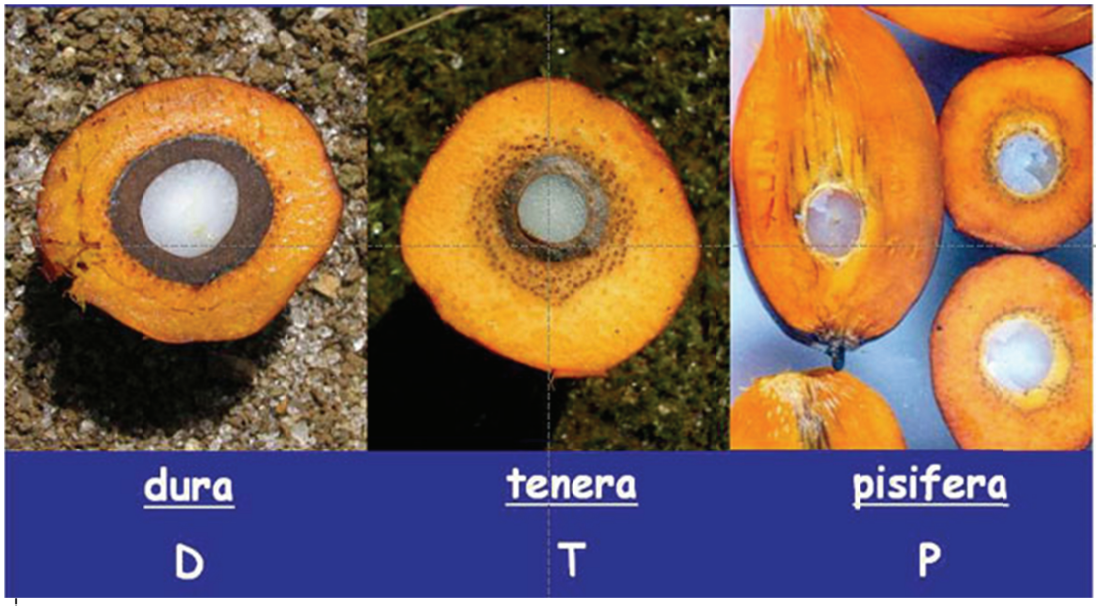
ตารางที่ 2.1

แสดงความแตกต่างของผลปาล์มน้ำมัน

แบบ	**ความหนาของกะลา (มิลลิเมตร)**	**เส้นใยสีน้ำตาลรอบกะลา**	**เปลือกนอก/ผล (%)**
ดูรา	2 - 8	ไม่มี	35 - 50
เทเนอรา	3 (0.5 - 4)	มี	60 - 96
พิสิเฟอรา	บางมากหรือไม่มี	เส้นใยหุ้มรอบกะลาหรือเนื้อในเมล็ด	>90

ภาพที่ 2.1

ลักษณะ ดูรา เทเนอรา และฟิสิเฟอรา



ที่มา: http://www.cirad.bf/img/2295361_3.jpg

การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้มีการเปลี่ยนแปลงแนวคิดไปจากเดิมเมื่อ Beirnaert และ Vanderweyen (1941, p. 24) พบว่าลักษณะความหนาของกะลามีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ และลักษณะของกะลาถูกควบคุมโดยยีน 1 คู่ การผสมระหว่างต้นดูรากับต้นพิสิเฟอราจะได้ลูกผสมเทเนอรา (F_1) 100% ที่มีลักษณะกะลาบางจึงทำให้เปลือกนอกต่อผลและเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงกว่าดูรา ซึ่งเป็นไปตามกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมนเดล ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันเมื่อคัดเลือกได้พันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่ดีแล้ว ขั้นตอนของการผลิตเมล็ดพันธุ์ต้องมีการคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์สำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา หมายถึง เมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) เกิดจากการผสมระหว่างต้นแม่พันธุ์ที่มีลักษณะแบบดูรากับต้นพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะแบบพิสิเฟอรา ซึ่งเป็นปาล์มน้ำมันที่ใช้ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน ผลจากการที่นำเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ไม่ตรงตามพันธุ์ หรือได้จากแหล่งผลิตพันธุ์ที่ไม่น่าเชื่อถือไปปลูกจะทำให้ผลผลิตทะลายสดลดลง 15-35% และเปอร์เซ็นต์น้ำมันปาล์มดิบลดลง 35-55% การค้นพบความรู้นี้นำไปสู่การพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันและการผลิตเมล็ดพันธุ์จนถึงปัจจุบัน การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันยังคงมีการนำเอาพันธุศาสตร์มาใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์อย่างต่อเนื่องและเป็นระบบ มีการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมจากแหล่ง

ต่างๆ เพื่อการปรับปรุงฐานพันธุกรรมให้ได้พันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมที่มีศักยภาพเพิ่มขึ้นและได้รับการยอมรับจากเกษตรกร

2. การปรับปรุงพันธุ์และวิธีการคัดเลือกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชยืนต้นที่ผสมพันธุ์แบบข้ามต้น เนื่องจากช่อดอกเกสรตัวผู้และช่อดอกเกสรตัวเมียออกดอกไม่พร้อมกัน ปกติปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์ เป็นพืชที่สามารถให้ผลผลิตทะลายได้ตลอดทั้งปี มีอายุในการเก็บเกี่ยวผลผลิตได้นานมากกว่า 25 ปี ดังนั้นปาล์มน้ำมันที่จะนำให้เกษตรกรไปปลูกนั้นจะต้องเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลผลิต ตลอดจนการลดอายุการเก็บเกี่ยวผลของปาล์มน้ำมัน เนื่องจากปกติปาล์มน้ำมันต้นหนึ่งๆจะให้ผลผลิตได้เมื่ออายุประมาณ 3-5 ปี ดังนั้นพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่นิยมปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา ซึ่งมีลักษณะที่ดีตามที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น แต่การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันนั้นมี 2 วิธีหลักๆ คือ (Sambanthamurthi *et al*., 2009)

2.1 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือกซ้ำสลับแบบประยุกต์ (Modified Recurrent Selection; MRS)

วิธีการนี้นิยมใช้ในประเทศมาเลเซีย เป็นการคัดเลือกต้นพันธุ์พ่อฟิสิเฟอรา จากการผสมตัวเองของเทเนอรา คู่ผสมแบบ เทเนอรา x เทเนอรา, เทเนอรา x ฟิสิเฟอรา, ฟิสิเฟอรา x ฟิสิเฟอรา หรือการผสมตัวเองของฟิสิเฟอรา และคัดเลือกพันธุ์แม่ดูรา จากการผสมตัวเองของดูรา หรือคู่ผสมแบบ ดูรา x ดูรา ทำการผสมพันธุ์เพื่อผลิตลูกผสม จากนั้นคัดเลือกพ่อพันธุ์แม่พันธุ์จากผลการทดสอบลูกผสม (progeny test) และคัดเลือกพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ตามเกณฑ์มาตรฐานสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์ (seed production) ในช่วงเวลาเดียวกันทำการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่เพื่อทำการปรับปรุงพันธุ์ในรอบถัดไป โดยพิจารณาผลจากการปรับปรุงพันธุ์รอบแรกที่มีความสามารถในการรวมตัวทั่วไปของยีน (general combining ability) และความสามารถในการรวมตัวเฉพาะของยีน (specific combining ability) ผสมพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีอยู่เดิมหรือนำเข้ามาใหม่ (new introduction) เพื่อขยายฐานพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันให้กว้างขึ้น (Hardon, 1970, p. 449) ดังภาพที่ 2.2

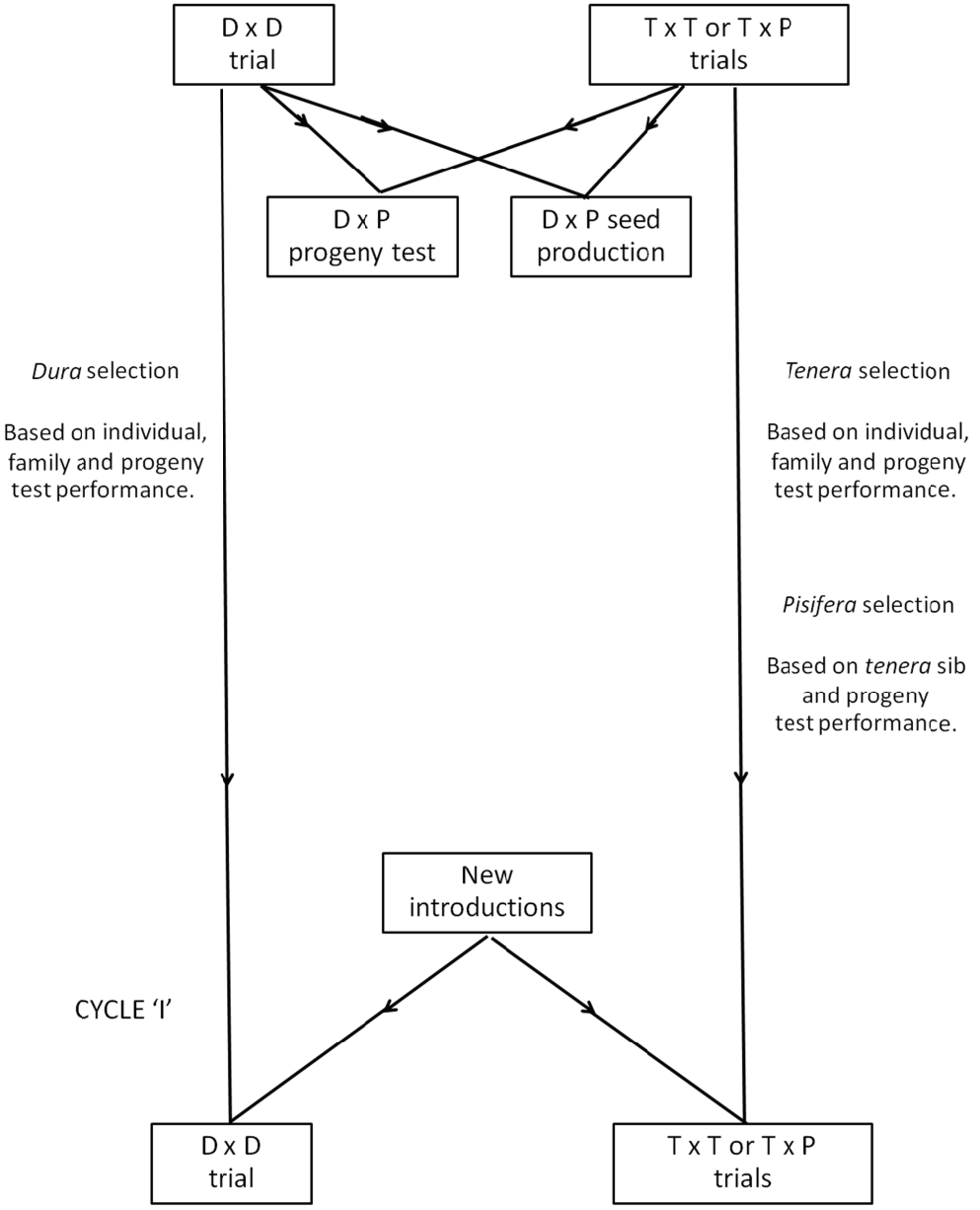
2.2 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือกแบบวงจรสลับในหมู่ประชากรพ่อและแม่พันธุ์ (Reciprocal Recurrent Selection; RRS)

การคัดเลือกสายพันธุ์พ่อจากประชากรฟิสิเฟอรา (Pisifera population) ที่มีลักษณะจำนวนทะลายมากแต่น้ำหนักต่อทะลายต่ำ และคัดเลือกสายพันธุ์แม่จากประชากรดูรา (Dura population) ที่มีลักษณะจำนวนทะลายน้อยแต่น้ำหนักต่อทะลายสูง ทำการผสมพันธุ์เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์คู่ผสม จากนั้นนำมาทดสอบลูกผสม (progeny test) เป็นคู่ผสมแบบ ดูรา x เทเนอรา คัดเลือกแม่พันธุ์ดูราที่ได้จากการผสมตัวเอง (Dura self) และคัดเลือกพ่อพันธุ์ฟิสิเฟอราที่ได้จากการผสมตัวเอง (Pisifera self) เพื่อเพิ่มประชากรสำหรับเตรียมให้เป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์รุ่นต่อไป โดยดำเนินการในช่วงเดียวกันกับการทดสอบลูกผสม และการผลิตเมล็ดพันธุ์จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างแม่พันธุ์ดูราและพ่อพันธุ์ฟิสิเฟอราที่คัดเลือกไว้ มีรายงานว่าสามารถเพิ่มปริมาณน้ำมันได้ 18% ในแต่ละรอบของวิธีการ RRS แต่อย่างไรก็ตามวิธีการของ RRS ต้องใช้พื้นที่ในการทดลองมาก เพื่อทำการทดสอบคู่ผสมแบบ ดูรา x เทเนอราและการผสมตัวเอง ดังภาพที่ 2.3

ภาพที่ 2.2

ผังภาพการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือกซ้ำสลับแบบประยุกต์

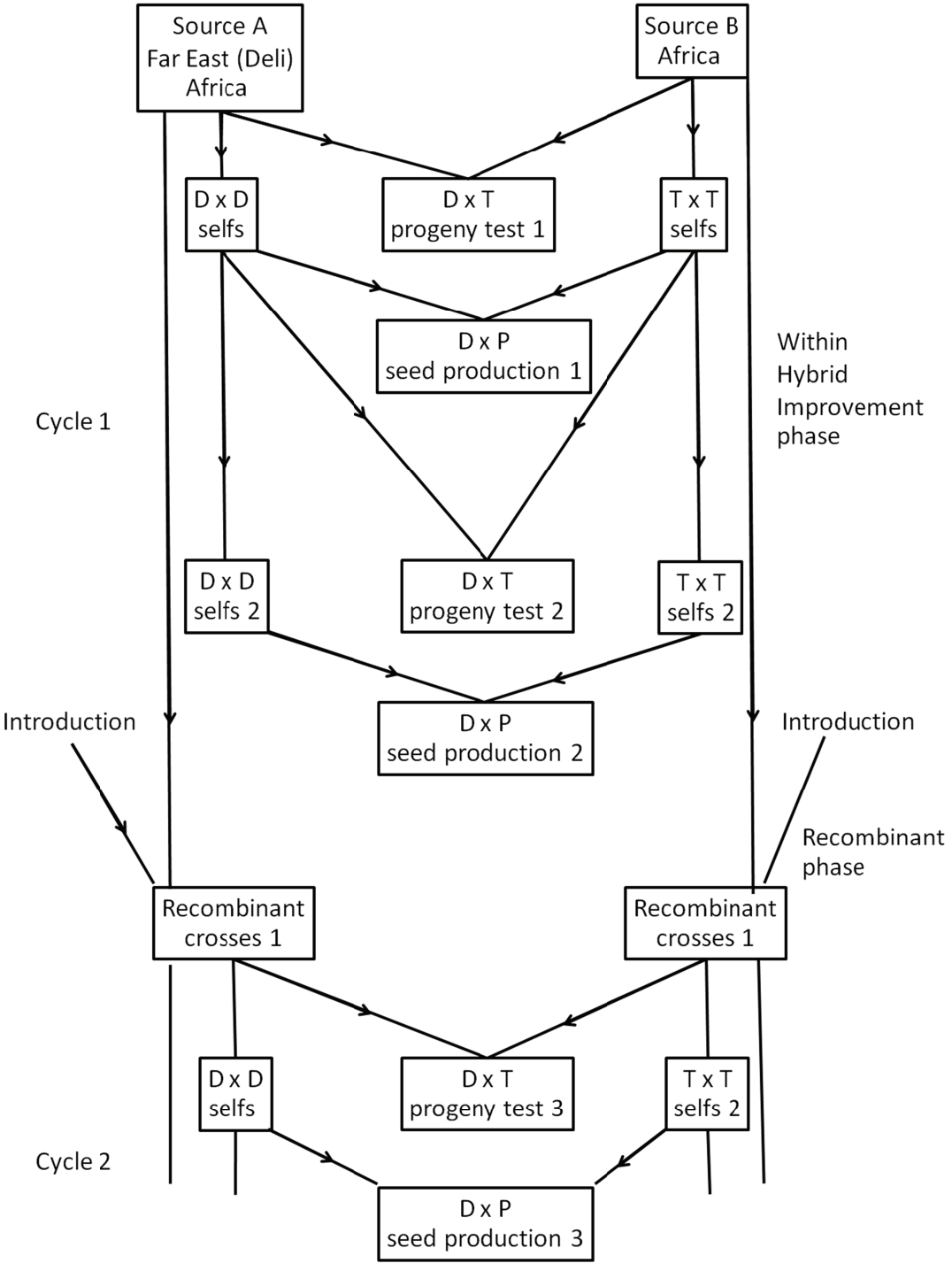
(Modified Recurrent Selection; MRS)



ภาพที่ 2.3

ผังภาพการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือกแบบวงจรสลับในหมู่ประชากรพ่อและแม่พันธุ์

(Reciprocal Recurrent Selection; RRS)



3. **เครื่องหมายทางพันธุกรรม** (Genetic markers)

เครื่องหมายทางพันธุกรรม หมายถึง ลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งลักษณะหรือตัวบ่งชี้นี้สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีการใช้กันมานานแล้วในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ การใช้ลักษณะรูปพรรณสัณฐานพืชที่แตกต่างกัน เช่น ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม สีของลำต้น ขนาด รูปร่าง และสีของเมล็ด อายุวันออกดอก และวันเก็บเกี่ยว เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรม โดยเรียกเครื่องหมายบ่งชี้นี้ว่าเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological markers) อย่างไรก็ตาม พบว่าลักษณะดังกล่าวมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ นอกจากนั้นแล้วการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดอื่นที่มีความแม่นยำสูงกว่า เพื่อช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้อง โดยใช้สารชีวโมเลกุลภายในสิ่งมีชีวิตเป็นเครื่องบ่งชี้ เรียกเครื่องหมายบ่งชี้นี้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เครื่องหมายโปรตีน (protein markers) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers)

3.1 **เครื่องหมายโปรตีน**

เครื่องหมายโปรตีน คือ การใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ในการตรวจสอบและบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์ (varietal identification) ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบรูปแบบขององค์ประกอบโปรตีนของเอนไซม์บางชนิดและโปรตีนที่สะสมในเมล็ดพืช เครื่องหมายโปรตีนถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์พืชในธุรกิจเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโปรตีนยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ จำนวนยีนที่ใช้ตรวจสอบยังมีไม่มากนัก และยีนที่นำมาศึกษาต้องมีการแสดงออก (gene expression) ด้วย การตรวจสอบจึงจำเป็นต้องเลือกเนื้อเยื่อพืชและระยะการเจริญเติบโตที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงการแสดงออกของยีนที่ต้องการตรวจสอบ นอกจากนั้น ผลการตรวจสอบยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมอีกด้วย ทำให้โอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนมีค่าต่ำกว่าที่เป็นจริง จากข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้เครื่องหมายโปรตีนไม่เหมาะในการใช้ปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นจึงมีการค้นหาพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า ซึ่งเครื่องหมายชนิดนั้นคือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ

3.2 **เครื่องหมายดีเอ็นเอ**

เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอในจีโนมซึ่งอาจเป็นตำแหน่งของยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ ดีเอ็นเอนี้สามารถนำไปใช้ในกระบวนการไฮบริไดเซชั่น (hybridization) กับโพลบ (probe) หรือใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่หรือปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR; polymerase chain reaction) เพื่อใช้บ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรม เครื่องหมายดีเอ็นเอมีแบบแผนของการถ่ายทอดพันธุกรรมตามกฎของเมนเดล ในปัจจุบันมีการคิดค้นสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นมามากมายหลายชนิด มีการใช้อักษรย่อชื่อของเทคนิคอย่างหลากหลาย ในบางกรณีมีอักษรย่อของเทคนิคต่างกันแต่เป็นเทคนิคเดียวกันอาจทำให้เกิดความสับสน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้การจัดกลุ่มชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยอาศัยพื้นฐานทางพันธุศาสตร์ของความแตกต่างระหว่างการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม (codominant) และแบบข่มสมบูรณ์ (complete dominant) ทำให้สามารถจัดกลุ่มชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ 2 กลุ่ม ที่แสดงจีโนไทป์ของการถ่ายทอดพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วม (codominant marker) เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของจีโนไทป์ในตำแหน่งที่จำเพาะของจีโนม จำนวนแถบดีเอ็นเอจะมีจำนวนไม่มาก ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มสมบูรณ์ เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของจีโนไทป์ในตำแหน่งไม่จำเพาะแต่จะกระจายทั่วจีโนม ดังนั้นจำนวนแถบเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีจำนวนไม่มาก (multiple dominant marker) ขึ้นกับเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิด (สุรินทร์, 2552) ถ้าพิจารณาระดับโมเลกุลความแตกต่างของจีโนไทป์หรือการเกิดโพลิมอร์ฟิซึม สามารถแบ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ 2 แบบ คือ แบบแรกเป็นความแตกต่างของลำดับเบส (sequence polymorphism) ในกรณีนี้เป็นความแตกต่างที่เกิดจากการแทรก (Insertion) การขาดหายของเบส (deletion) และการแทนที่ของเบส (substitution) แบบที่ 2 มีความแตกต่างของจำนวนลำดับเบสซ้ำ (repeated sequence) (กิตติพัฒน์, 2548) ดังนั้นเมื่ออาศัยเกณฑ์การจัดกลุ่มทั้ง 2 แบบรวมกันจะสามารถจัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ 4 กลุ่มดังตารางที่ 2.2

ในปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้กัน คือ ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ Simple Sequence Repeat (SSR) เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วมกันซึ่งนับว่าเป็นข้อดี เพราะการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบข่มร่วมนั้น เป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของจีโนไทป์แบบจำเพาะและสามารถเห็นความแตกต่างของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ได้ชัดเจนกว่าการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบสมบูรณ์

ตารางที่ 2.2

การจัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยอาศัยเกณฑ์การถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมร่วมกับเกณฑ์การตรวจสอบความแตกต่างระดับโมเลกุล (กิตติพัฒน์, 2548)

เกณฑ์การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม	เกณฑ์การวิเคราะห์ความแตกต่างระดับโมเลกุล				
	ความแตกต่างลำดับเบส			ความแตกต่างลำดับเบสซ้ำ	
	วิธีวิเคราะห์		ชื่อเทคนิค	วิธีวิเคราะห์	ชื่อเทคนิค
การข่มร่วม (ตรวจสอบตำแหน่งจำเพาะของจีโนม)	วิเคราะห์ความแตกต่างจุดตัดเอนไซม์จำเพาะ		RFLP	วิเคราะห์จำนวนเบสซ้ำโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา PCR	SSLP (microsatellite)
	วิเคราะห์ความแตกต่างลำดับเบสภายในชิ้นดีเอ็นเอจำเพาะ (STS)	วิเคราะห์ความแตกต่างจุดตัดเอนไซม์จำเพาะ	CAPS (PCR-RFLP)		
		วิเคราะห์คอนเฟอร์เมชั่นของดีเอ็นเอสายเดี่ยว	SSCP ddF		
		วิเคราะห์เสถียรภาพของดีเอ็นเอสายคู่	D/TGGE		
		วิเคราะห์ความแตกต่างของเบสหนึ่งเบส (SNP)	ASA,OLA<DHPLC, Pyrosequencing DASH		

STS : sequence tag site, CAPS : cleaved amplified polymorphic sequence, PCR-RFLP : polymorphism chain reaction-restriction fragment length polymorphism,

SSCP : single strand conformational polymorphism, ddF : dideoxy fingerprinting, D/TGGE : denaturing gradient gel electrophoresis, TGGE : temperature gradient gel electrophoresis,

SNP : single nucleotide polymorphism, ASA : allele specific amplification, OLA : oligonucleotide ligation assay ,DHPLC : denaturing high-performance liquid chromatography,

DASH : dynamic allale specific hybridization, SSLP : simple sequence conformational polymorphism

ตารางที่2.2(ต่อ)

เกณฑ์การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม	เกณฑ์การวิเคราะห์ความแตกต่างระดับโมเลกุล			
	ความแตกต่างลำดับเบส		ความแตกต่างลำดับเบสซ้ำ	
	วิธีวิเคราะห์	ชื่อเทคนิค	วิธีวิเคราะห์	ชื่อเทคนิค
การข่มสมบูรณ์ (ตรวจสอบหลายตำแหน่งไม่จำเพาะของจีโนม)	วิเคราะห์ความแตกต่างของตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม	MAAP: RAPD, AP-PCR, DAF	วิเคราะห์ความแตกต่างของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างลำดับเบสซ้ำโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำและลำดับเบสแบบสุ่ม	ISSR
	วิเคราะห์ความแตกต่างของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะร่วมกับความแตกต่างของตำแหน่งเกาะไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม	AFLP	การวิเคราะห์ขนาดและตำแหน่งของมินิแซทเทลไลท์ (minisatellite)	minisatellite

MAAP : multiple arbitrary amplicon profiling, RAPD : random amplified polymorphic DNA, AP-PCR : arbitrarily primed-polymerase chain reaction, DAF : DNA amplification fingerprinting, ISSR : inter simple sequence repeat, AFLP : amplified fragment length polymorphism

การพัฒนาการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (molecular genetics) ซึ่งเป็นการศึกษาลึกลงไปถึงความแตกต่างระดับโมเลกุลของยีนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆในสิ่งมีชีวิต มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เครื่องหมายระดับโมเลกุล เป็นการใช้ดีเอ็นเอ เพื่อเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับของยีนหรือดีเอ็นเอถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในหลายๆด้าน เช่น นำมาใช้ในการแยกสายพันธุ์พืช เป็นการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เป็นตัวกำหนดสายพันธุ์หรือแยกสายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วมีประสิทธิภาพและมีความถูกต้องแม่นยำ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการรวบรวมสายพันธุ์ และใช้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ และยังนำไปใช้ในการทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) และการหาตำแหน่งของยีน (gene tagging) ซึ่งเป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม เพื่อเป็นการวางแผนผังในจีโนมและนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต่างที่ต้องการว่าอยู่บนตำแหน่งใดบนโครโมโซม อีกทั้งยังสามารถนำมาใช้ในการแยกยีนและเพิ่มจำนวน (clone) ให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการ เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าสู่พืชเป้าหมาย ซึ่งเป็นวิธีการในการปรับปรุงพันธุ์พืชอีกวิธีหนึ่ง ทั้งยังมีประโยชน์ทางด้านการศึกษาลักษณะปริมาณ (QTL : quantitative trait loci) ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชไร่หลายๆประการ เช่น ผลผลิต องค์ประกอบของผลผลิต (จำนวนเมล็ด น้ำหนักเม็ด) ความสูงของต้น และวันออกดอก ซึ่งลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายตัวซึ่งทำงานร่วมกัน การแสดงออกหลายลักษณะเช่นนี้สามารถจำแนกยีนแต่ละตัวที่ควบคุมอยู่ออกมาได้โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการทำแผนที่ โดยจะใช้หลักการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่บนส่วนต่างๆของโครโมโซมในประชากรพืชกับลักษณะฟีโนไทป์ของพืชในส่วนที่เราสนใจ ทำให้สามารถหาลิงเกจ (linkage) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะทาง QTL ได้ ซึ่งการหา linkage group จะใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์การจัดกลุ่มของเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆของยีนในตำแหน่งที่อยู่ใกล้ๆกัน จะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ผลจากการทำ QTL นี้ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนที่เราสนใจ (co-segregate) เครื่องหมายโมเลกุลที่เกาะติดอย่างใกล้ชิดกับลักษณะที่สนใจ ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการทำ map-based cloning ในยีนที่สนใจกระทั่งสามารถนำส่วนของยีนนั้นที่ต้องการออกมาได้ (สุรินทร์, 2552)

3.3 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ หรือ SSR

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ หรือ SSR คือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีจำนวนเบสหนึ่งหน่วยซ้ำไม่มากพันตำแหน่งในจีโนม (Toth *et al.,* 2000) ในพืชชั้นสูงทั่วไปมีการประมาณการว่าไมโครแซทเทลไลท์มักประกอบด้วย 1-6 เบส เช่น $(A)_n$, $(AC)_n$, $(ACT)_n$, $(ATGC)_n$ อย่างนี้เป็นต้น เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำตั้งแต่ไม่กี่ซ้ำจนไปถึงหลายซ้ำ (ไม่เกินร้อยซ้ำ) และกระจายทั่วจีโนม สิ่งมีชีวิตยูคาริโอต อาจพบได้หลายหน่วยซ้ำที่มีสองเบส (di-repeat) มีการปรากฏทุกๆ 30 ถึง 100 กิโลเบสของจีโนม ความหนาแน่นของ ไมโครแซทเทลไลท์นี้มีเท่าๆ กับไมโครแซทเทลไลท์ของหน่วยซ้ำที่มีสามหรือสี่เบส (tri หรือ tetra-repeat), (Morgante และ Olivieri, 1993) การเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำนี้อาจเกิดจากการแทรก หรือการแทนที่ของลำดับเบสที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำ แล้วทำให้เกิดลำดับเบสซ้ำเรียงตัวติดกัน (Zhu *et al.,* 2000) ในเบื้องต้นจำนวนซ้ำจะมีไม่มากนักต่อมาจำนวนซ้ำเพิ่มจะเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งเกิดจากการทำงานผิดพลาดของเอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสโดยเกิดการลื่นไถล (polymerase slippage) ในบริเวณลำดับเบสซ้ำระหว่างกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ปรากฏการณ์นี้ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของจำนวนซ้ำที่ตำแหน่งเดียวกันของจีโนมและเกิดโพลีมอร์ฟิซึมระหว่างจีโนไทป์ โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดจากความแตกต่างของจำนวนซ้ำนี้อาจเรียกว่า VNTR (variable number of tandem repeat) ดังนั้น นอกจากคุณสมบัติข้อดีของไมโครแซทเทลไลท์ที่มีการกระจายตัวทั่วจีโนมแล้ว อัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างจีโนไทป์ก็ค่อนข้างสูง เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ปรากฏเป็นจำนวนมากมีหลายตำแหน่งบนจีโนม การวิเคราะห์จีโนมด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชันโดยใช้โพลบไมโครแซทเทลไลท์จะทำให้การอ่านจีโนไทป์ทำได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่จำเพาะตำแหน่ง (locus-specific marker) เป็นวิธีการวิเคราะห์จีโนไทป์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่า เนื่องจากสามารถแสดงจีโนไทป์แบบข่มร่วมและให้โพลิมอร์ฟิซึมสูงระหว่างจีโนไทป์ แม้ว่าลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์เป็นลำดับเบสซ้ำที่ไม่ใช่ลำดับเบสจำเพาะ แต่ลำดับเบสส่วนที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำทั้งสองข้างของไมโครแซทเทลไลท์เป็นลำดับเบสจำเพาะตำแหน่งของจีโนม ดังนั้นไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสที่เกาะกับลำดับจำเพาะทั้งสองข้างของไมโครแซทเทลไลท์จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ได้ โพลิมอร์ฟิซึมของความแตกต่างของขนาดผลผลิตดีเอ็นเอเป็นผลจากจำนวนซ้ำที่แตกต่างกัน ถ้าความยาวของผลผลิตดีเอ็นเอมีความแตกต่างมากพอ สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยอิเล็กโตรโฟริซิสที่ใช้เจลอะกาโรสเป็นตัวกลางการแยกขนาด แต่ส่วนใหญ่จะใช้เจลโพลีอะครีลาไมด์เพราะมีความละเอียดในการแยกขนาดดีเอ็นเอที่มี

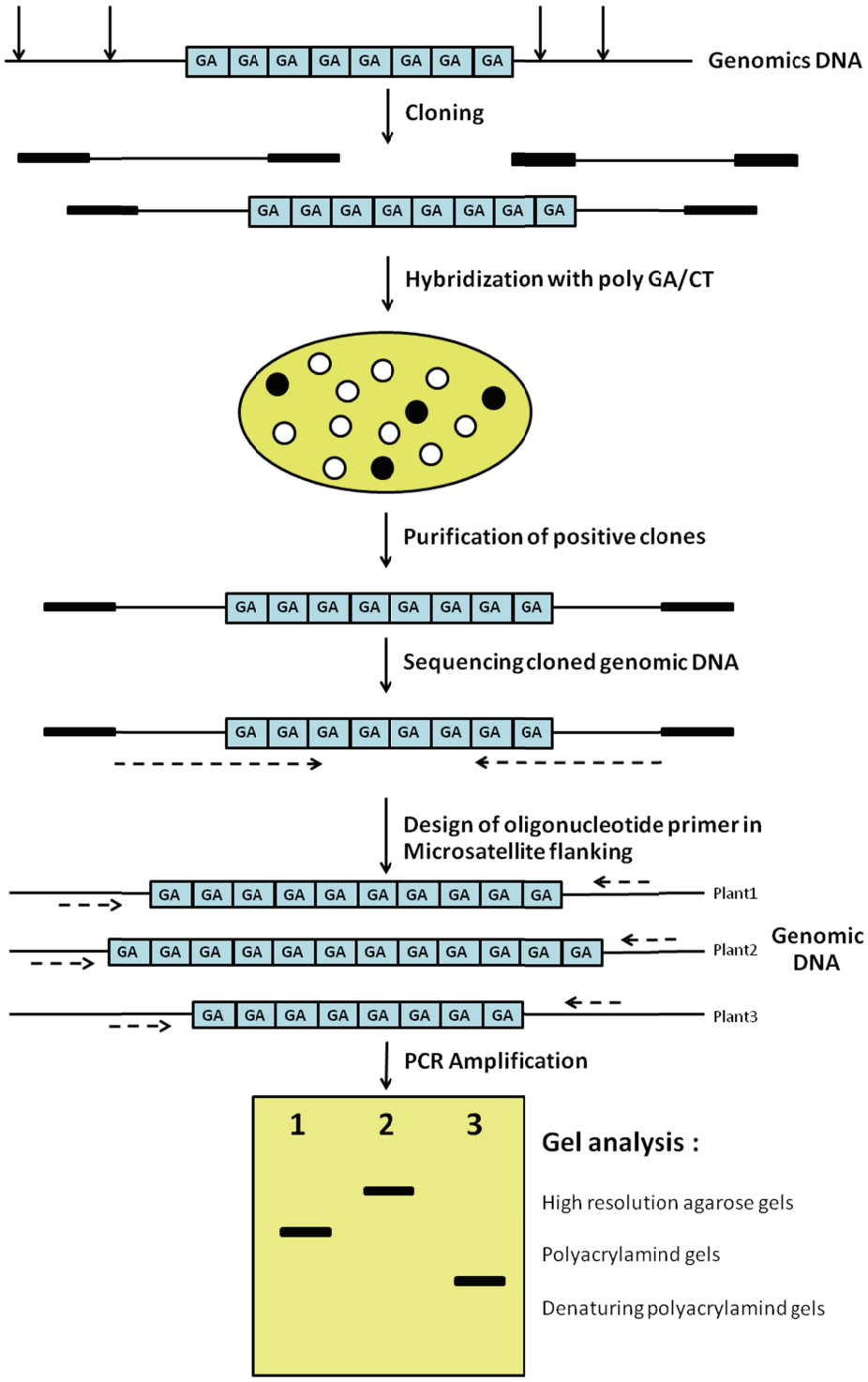
ขนาดแตกต่างกันเล็กน้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรือใช้ตัวกลางที่นำจากส่วนผสมของ เมตาฟอร์ 2% กับ อะกาโรส 1% ก็ให้ประสิทธิภาพการแยกขนาดได้ดี (Becker และ Heun, 1995)

3.3.1 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซลเทลไลท์

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซลเทลไลท์นั้นประกอบไปด้วยการค้นหาและออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ unique sequence ในแต่ละตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์ ดังนั้นไพรเมอร์แบบไมโครแซทเทลไลท์หนึ่งคู่ จะหมายถึงไมโครแซทเทลไลท์เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น ฉะนั้นจะพบว่าขั้นตอนการพัฒนาค่อนข้างยุ่งยากใช้ทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายสูง (Powell *et al.,* 1996) ในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซลเทลไลท์โดยวิธีทั่วไป (Brown *et al*., 1996; Paterson, 1996) เริ่มด้วยการสร้างคลังดีเอ็นเอของจีโนม (insert genomic libraries) โดยการโคลนชิ้นดีเอ็นเอชิ้นเล็กๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซลเทลไลท์มาก (microsatellite enriched library) โดยการใช้โพลบที่มีลำดับเบสไมโครแซลเทลไลท์ในกระบวนการไฮบริไดเซชัน วิธีการนี้เรียกว่า colonyhybridization จากนั้นนำโคลนดีเอ็นเอที่ได้รับการคัดเลือกไปหาลำดับเบส เรียกขั้นตอนนี้ว่า DNA sequencing of positive clones จากนั้นทำการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีไมโครแซลเทลไลท์ ไพรเมอร์จะถูกนำไปทดสอบเพื่อปรับสภาวะของการทำพีซีอาร์ จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาโพลิมอร์ฟิซึม ในการวิเคราะห์โพลิมอร์ฟิซึมโดยทั่วไปไพรเมอร์จะออกแบบให้มีความยาว 17-22 นิวคลีโอไทด์ มีอัตราส่วนของ GC ประมาณ 50% โดยมีค่า Tm (melting temperature; อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพธรรมชาติ 50%) ประมาณ 60 $^{\circ}$C (McCouch *et al.,* 1997) ขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกออกแบบให้มีขนาดประมาณ 100-250 คู่เบส ดังภาพที่ 2.4

ภาพที่ 2.4

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซลเทิลไลท์ด้วยวิธีมาตรฐาน



ที่มา : ดัดแปลงจาก Paterson (1996)

3.4 **เครื่องหมาย** EST (Expressed sequence tag)

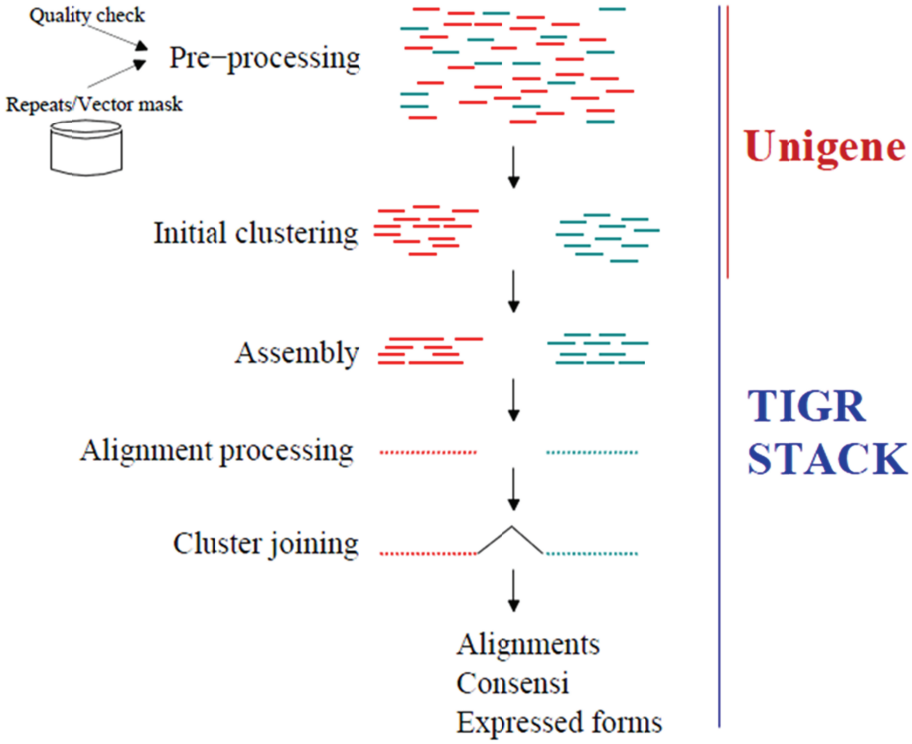
Express Sequence Tag (EST) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่มีการแสดงออก ในปัจจุบันฐานข้อมูลสาธารณะที่เป็นส่วนของลำดับเบสที่มีการแสดงออกนี้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยได้มีการนำข้อมูลลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกนี้ มาออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งเฉพาะของยีนนั้นๆ จากนั้นใช้หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ผลผลิตของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ นั้นจะนำไปตรวจสอบและแยกขนาดโดยใช้ อะกาโรสเจลอิเล็กโตสโฟสิซิสและโพลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตสโฟสิซิส เปรียบเทียบกับขนาดของเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมายชนิดนี้ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อยีนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ แต่ก็มีข้อจำกัดที่สำคัญคือจะต้องมีข้อมูลลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

3.4.1 การพัฒนาเครื่องหมาย SSR จากเหมืองข้อมูล EST

สำหรับสิ่งมีชีวิตบางสปีชีส์ที่มีข้อมูลลำดับเบสเป็นจำนวนมากในฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ โดยเฉพาะลำดับเบสของยีนที่เกิดการแสดงออกหรือ EST หรือลำดับเบสดีเอ็นเอจากจีโนม การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซลเทลไลท์สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเหล่านั้นจากฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซลเทลไลท์จากฐานข้อมูลนี้สามารถสร้างเครื่องหมายไมโครแซลเทลไลท์ชนิด $(AT)_n$ และ $(GC)_n$ได้ ซึ่งเครื่องหมาย ไมโครแซลเทลไลท์สองชนิดนี้ไม่สามารถพัฒนาได้ด้วยกระบวนการไฮบริไดเซชั่นของโพลบไมโครแซลเทลไลท์ เนื่องจากลำดับเบสซ้ำ AT หรือ GC มีลำดับเบสแบบพาลินโดรม สายดีเอ็นเอจะจับกันเองทั้งภายในสายเดียวกันและคนละสาย ดังนั้นก่อนที่จะนำข้อมูล EST มาใช้จำเป็นต้องมีการพัฒนาคุณภาพข้อมูล โดยการผ่านกระบวนการ pre-processing เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออก เช่น ribosomal RNA, poly A tails, กำจัดลำดับเบสที่มีคุณภาพต่ำ (low-quality sequences), กำจัดลำดับเบสของเวกเตอร์ (vector) และอะแดปเตอร์ (adaptor) ซึ่งไม่ใช่ส่วนของลำดับเบสของ EST ออก หลังจากนั้นเข้าสู่กระบวนการ clustering เพื่อจัดกลุ่มของ EST ที่มีลำดับเบสเหลื่อมซ้อนกันแล้วจึงเชื่อมต่อ EST เข้าด้วยกันในขั้นตอน assembly ดังภาพที่ 2.5 ซึ่งข้อได้เปรียบการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซลเทลไลท์จาก EST อีกประการหนึ่ง คือ ตำแหน่งยีนที่ทราบหน้าที่แล้วสามารถวางตำแหน่งลงในแผนที่พันธุกรรมได้ (กิตติพัฒน์, 2548)

ภาพที่ 2.5

แนวทางการจัดการข้อมูล EST ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย



ที่มา : http://www.ch.embnet.org/CoursEMBnet/Pages02/slides/est_clustering.pdf

เครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-SSR สามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ง่าย สะดวก ลดต้นทุนในการพัฒนาเมื่อเทียบกับการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นๆแล้วก็สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ได้ ด้วยเหตุนี้เอง ทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบเลี้ยงคู่ และในสัตว์ชนิดต่างๆ งานวิจัยในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็น EST-SSR ในสัตว์ เช่น งานวิจัยกุ้งของ Maneeruttanarungroj *et al.* (2006) ใช้เครื่องหมาย EST-SSR เพื่อพัฒนาแผนที่จีโนมของกุ้ง และใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์กุ้ง ให้มีลักษณะที่ดีตามต้องการ ฐานข้อมูล EST ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นฐานข้อมูลสาธารณะจำนวน 10,100 ESTs พบว่ามี 997 ESTs ที่เป็นลำดับเบสไม่ซ้ำซ้อน จากการวิเคราะห์หน้าที่และความคล้ายคลึงโปรตีนต่างๆ ด้วยใช้โปรแกรม BLASTX และ BLASTN ตามลำดับแล้ว พบว่า 8.6% ทราบหน้าที่การทำงานของยีน 27.8% เป็นส่วนของโปรตีนสมมุติฐาน (hypothetical protein) และที่เหลืออีก 63.6% เป็นส่วนที่ไม่ทราบหน้าที่การทำงานของยีน งานวิจัยนี้ได้มีการ

ออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 208 คู่ไพรเมอร์ พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำเร็จและมีโพลิมอร์ฟิซึม 185 คู่ไพรเมอร์ จากเครื่องหมาย EST-SSR จำนวน 50 เครื่องหมาย พบว่ามีจำนวนแอลลีลเฉลี่ย 12.6 และมีค่า Polymorphism Information Content (PIC) เฉลี่ยเท่ากับ 0.723 ซึ่งสามารถนำเครื่องหมาย EST-SSR 36 เครื่องหมายไปเพิ่มเติมในแผนที่เครื่องหมาย AFLP ของกุ้งได้

งานวิจัยเกี่ยวกับหอยนางรมก็มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-SSR เช่น งานวิจัยของ Wang and Guo, (2007) ได้ใช้ฐานของมูล ESTs ของหอยนางรมจากฐานข้อมูลสาธารณะ GenBank ทั้งหมด 9,101 ESTs ในการหา SSR มีการกำหนดจำนวนซ้ำตั้งแต่ 8 ซ้ำของชนิดเบสซ้ำ(motif) แบบสองเบสซ้ำ (di repeat) ส่วนชนิดเบสซ้ำแบบสามเบสซ้ำ (tri repeat) จนถึงหกเบสซ้ำ (hexa repeat) กำหนดจำนวนซ้ำไว้ที่ 5 ซ้ำ พบว่ามี 127 ESTs ที่พบ SSR หลังจากนั้นจึงนำไปทำการออกแบบไพรเมอร์ได้ 88 คู่ไพรเมอร์ พบว่า 71 คู่ไพร์เมอร์ ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำเร็จ แต่ในจำนวนนี้มี 19 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ใหญ่เกินค่าคาดหวังไว้เนื่องมาจากการแทรกของส่วนอินตรอนภายในลำดับเบส สำหรับการวิเคราะห์โพลิมอร์ฟิซึมในหอยนางรม 5 พันธุ์ จากประชากรหอยนางรม 3 ประชากร โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ให้ขนาดของผลผลิต PCR ไม่เกิน 800 คู่เบส พบว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึม 53 คู่ จาก 66 คู่ไพรเมอร์ที่ทดสอบ เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ทั้ง 53 คู่นี้ไปวิเคราะห์จีโนไทป์ในหอยนางรม 30 ตัวอย่างจาก 3 ประชากรด้วยเครื่องวิเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติ (automated DNAsequencer) พบค่าเฉลี่ยแอลลีลเท่ากับ 9.3 ต่อคู่ไพรเมอร์ ช่วงของแอลลีลที่พบ 2-24 แอลลีล เมื่อศึกษาการกระจายตัวของเครื่องหมาย EST-SSRs ในตัวอย่างลูก F_1 100 ตัวอย่าง พบว่า 43 เครื่องหมายกระจายตัวตามอัตราส่วนของเมนเดลโดยที่ 9 เครื่องหมายเกิดการกระจายตัวเบี่ยงเบนจากอัตราส่วนของเมนเดล งานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-SSRs สามารถใช้วิเคราะห์หอยนางรมข้ามสปีชีส์ได้ดีกว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ gSSR (genomic simple sequence repeat)

งานวิจัยแรกๆ ที่เกี่ยวกับ EST-SSR ในพืชใบเลี้ยงคู่ เป็นงานวิจัยองุ่นของ Scott *et al. (*2000) ศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ SSR บนฐานข้อมูลสาธารณะ EST จำนวน 5,000 ESTs กำหนดชนิดของลำดับเบสซ้ำ di-repeat ตั้งแต่ 7 ซ้ำขึ้นไป และ tri-repeat ตั้งแต่ 5 ซ้ำขึ้นไป ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 16 คู่ไพรเมอร์ พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้สำเร็จ 10 คู่ไพรเมอร์ และพบโพลิมอร์ฟิซึมในพันธุ์องุ่นทั้งหมด 7 พันธุ์ ที่มาจากต่างสปีชีส์และต่างจีนัสกัน

นอกจากงานวิจัย EST-SSR ในพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดอื่นๆ เช่น Qureshi *et al.,* (2004) ได้ทำการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR จากการทำเหมืองข้อมูลบนฐานข้อมูล EST สาธารณะของฝ้าย ซึ่งลำดับเบส ESTs สามารถใช้ในการประเมินความหลากหลายของจีโนมซึ่ง

เป็นประโยชน์ในการเปรียบเทียบแผนที่ทางพันธุกรรม หายีนเป้าหมายที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเพิ่มเติมยีนที่สำคัญลงในแผนที่ทางพันธุกรรมของฝ้ายให้สมบูรณ์มากขึ้น จากเหมืองข้อมูล EST บนฐานข้อมูลสาธารณะของฝ้ายจำนวน 9,948 ESTs พบว่ามี 136 EST-SSRs และนำไปออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 84 คู่ไพรเมอร์ จากนั้นนำไพร์เมอร์ไปวิเคราะห์ความหลากหลายของสายพันธุ์ฝ้าย *G. hirsutum* 3 กลุ่มและ *G. barbadense* 1 กลุ่ม จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอต่อ 1 คู่ไพรเมอร์เท่ากับ 3 อัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมภายในสายพันธุ์ *G. hirsutum* เท่ากับ 26% และอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างสายพันธุ์ *G. hirsutum* และ *G. barbadense* เท่ากับ 52% ลำดับเบส EST-SSR จะถูกนำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงด้วยวิธีการ BLAST กำหนดค่า E-value ที่ 1e-10 พบว่า 74% จากเนื้อเยื่อเส้นใยของ *G. hirsutum* และ 26% มาจากเนื้อเยื่อในส่วนต่างๆเช่น ผลและเมล็ดของฝ้าย ในการเปรียบเทียบลำดับเบส EST-SSRs พบว่า 55% ของลำดับเบส EST-SSRs ที่นำมาเปรียบเทียบมีความคล้ายคลึงกับ *G. arboretum* และ 19% มีความคล้ายคลึงกับ *Arabidopsis thaliana*

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-SSR ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น งานวิจัยเรื่องการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR จากเหมืองข้อมูล EST ของข้าวบาเล่ย์ ข้าวโพด ข้าว ข้าวฟ่าง และข้าวสาลีของ Kantety *et al.* (2002) ได้มีการค้นหา SSR บนฐานข้อมูลสาธารณะของ EST ทั้งหมดพบว่ามี 260,000 ESTs ของธัญพืชที่แตกต่างกัน 5 ชนิด พบว่าค่าความถี่ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-SSR ที่พบมีช่วง1.5% ในข้าวโพด และ 4.7% ในข้าว แล้วทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ EST-SSR ด้วยวิธีการ BLAST ในพืชแต่ละสปีชีส์ซึ่ง EST-SSR ที่ซ้ำซ้อนจะถูกกำจัดและทำให้เป็นลำดับเบสที่ยาวขึ้นและไม่ซ้ำซ้อน แล้วนำไปวิเคราะห์รวมกันเพื่อทำการจัดกลุ่มและระบุลำดับเบสที่คล้ายกันในพืชต่างชนิดกัน ส่งผลให้ลดส่วนที่ลำดับเบสซ้ำซ้อนได้มากถึง 85% จากการเปรียบเทียบ EST-SSR ที่มีความสัมพันธ์กันทั้งหมด 24,606 EST-SSRs พบว่ามีลำดับเบสในส่วนที่ไม่เกิดความซ้ำซ้อนมีทั้งหมด 3,569 EST-SSRs

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-SSR ในอ้อย เช่นในงานวิจัยของ Pinto *et al.* (2004) ได้ทำการค้นหา SSR โดยการทำเหมืองข้อมูลจากฐานข้อมูล EST สาธารณะของอ้อยจากจำนวน 43,141 กลุ่ม พบ 2,005 EST-SSRs ประกอบด้วย di-repeat 8.2% , tri-repeat 30.5% และ tetra-repeat 61.3% ใน di-repeat จะพบลำดับเบสซ้ำชนิด CG repeat เป็นจำนวนมาก ซึ่งเนื้อเยื่อในส่วนของใบอ่อนของอ้อยมีจำนวน ESTs มากที่สุด การวิเคราะห์ค่า PIC ด้วย 23 คู่ไพรเมอร์ที่เกิดโพลิมอร์ฟิซึมพบว่ามีเพียงเครื่องหมายเดียวสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์

อ้อยทั้ง 18 สายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ช่วงของแอลลีลที่วิเคราะห์คือ 2-15 แอลลีล โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6 แอลลีลต่อโลคัส สำหรับค่า PIC ที่ได้อยู่ในช่วง 0.3-1.0 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.7 โดยการวิเคราะห์ EST-SSR ในพ่อและแม่พันธุ์ (SP 80-180; SP 80-4966) กับลูกรุ่น F_1 6 ตัวอย่าง พบว่า 52 เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถนำไปสร้างแผนที่จีโนมอ้อยได้ และงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งของ Pinto *et al.*, (2006) ได้ทำการค้นหา SSR จากฐานข้อมูล EST สาธารณะเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ gSSR ในงานวิจัยนี้จะทำการเปรียบเทียบลักษณะของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองชนิดโดยการวิเคราะห์ค่า PIC ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความหลากหลายของแอลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างสายพันธุ์อ้อยด้วยค่า Discrimination power (D) โดยการใช้อ้อยพันธุ์ลูกผสม 15 สายพันธุ์ และอ้อยสายพันธุ์ดั้งเดิมอีก 3 สายพันธุ์ ผลที่ได้ คือ เครื่องหมาย gSSR มีค่า PIC 0.9 ประมาณ 35% ส่วนค่า PIC ของเครื่องหมาย EST-SSR ที่ได้จากฐานข้อมูลสาธารณะมี 15% แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมายทั้งสองค่าให้ค่า Discrimination power และค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ความสัมพันธ์ระหว่าง SSRs ทั้งสองชนิดนี้มีค่าสูงและมีนัยสำคัญ (r=0.71/P=0.99) เมื่อไปวิเคราะห์ dendrogram

ในปี 2005 ได้มีการสร้างเหมืองข้อมูลของปาล์มน้ำมันขึ้นโดย Jouannic *et al,.* (2005) โดยการสกัดอาร์เอ็นเอของเนื้อเยื่อต่างๆ 5 ส่วนของปาล์มน้ำมันคือ ช่อดอกเกสรตัวเมีย ช่อดอกเกสรตัวผู้ ยอดปกติ ยอดที่ผิดปกติและต้นอ่อน จากนั้นทำการเปลี่ยนเป็นซีดีเอ็นเอ แล้วโคลนลงเวกเตอร์ คัดเลือกโคลนที่เหมาะสม เพื่อนำไปหาลำดับเบสโดยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ จากนั้นทำการพัฒนาคุณภาพของข้อมูล EST ที่ได้โดยการกำจัดลำดับเบสที่มีคุณภาพต่ำและตัดลำดับเบสของเวกเตอร์โดยโปรแกรม Vecscreen และ Matcher จากนั้นทำการจัดกลุ่ม (cluster) ของข้อมูลและทำการเชื่อม (assembly) ข้อมูลโดยโปรแกรม Stackpack ซึ่งได้ ESTs ที่มีคุณภาพสูงจำนวน 2,411 กลุ่ม จากนั้นทำการทดลองหาความคล้ายคลึงกันและวิเคราะห์หาหน้าที่ โดยการใช้โปรแกรม BLASTX พบว่าข้อมูลเหมือนในฐานข้อมูล GenBank 40% และมี CG content อยู่ที่ประมาณ 50% จากนั้นทำการหาหน้าที่ของ EST พบว่ามีลำดับเบสที่ไม่ซ้ำซ้อนกัน 61% และคาดว่าน่าจะเป็นยีนถึง 48% มี 22% ที่คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนชนิดนั้นและที่เนื้อเยื่อที่แตกต่างกันจะมีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป ซึ่งจากงานวิจัยนี้สามารถสร้างแผนที่ยีนโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออาร์เอฟเอลพี (RFLP) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR แล้วนำไปอ้างอิงกับการปรับปรุงพันธุ์ผสมของปาล์มน้ำมันโดยการใช้เทคนิค QTL และในปี 2008 ได้มีงานวิจัยต่อมาจากการสร้างเหมืองข้อมูลสาธารณะของ EST โดย Singh *et al.* (2008) โดยการนำเหมืองข้อมูล EST

จำนวน 5,521 ESTs ทำการหา SSR โดยพบว่า di repeat มีจำนวนซ้ำมากที่สุด ตามมาด้วย tri-repeat ซึ่งมี SSR จำนวน 136 EST-SSRs จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 94 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามี 10 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถนำไปใช้ในการดูความหลากหลายของพันธุกรรมปาล์มน้ำมันใน 76 ตัวอย่างจาก 7 ประเทศในอัฟริกาและประชากรพันธุ์ดูร่า ค่าเฉลี่ยแอลลีลจะอยู่ที่ 2.56 แอลลีลต่อโลคัส ค่า PIC ประมาณ 0.53 และมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic differentiation ; F_{ST}) เท่ากับ 0.2492 จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับวิวัฒนาการของปาล์มน้ำมันซึ่งเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR ยังสามารถนำไปใช้ได้ในปาล์มน้ำมันต่างสปีชีส์และต่างจีนัสกันได้

จากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆที่ใช้ประโยชน์จากข้อมูล EST เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ในงานวิจัยของ Low *et al.*,(2008) ได้มีการสร้างคลังซีดีเอ็นเอจาก 12 คลังเพื่อดูการพัฒนาเนื้อเยื่อในระยะต่างๆของปาล์มน้ำมัน ซึ่งได้ข้อมูล EST จำนวน 17,599 ESTs จากนั้นนำข้อมูลไปจัดกลุ่มและรวมกันได้ 9,584 กลุ่ม จากนั้นทำการหาหน้าที่ของ ESTs เหล่านั้น โดยเฉพาะดูหน้าที่ของการให้น้ำมันในระยะที่ไม่ใช่ต้นอ่อน พบว่ามีเอนไซม์ glutathione S-transferase แสดงออกในปริมาณที่สูงในระยะที่ไม่ใช่ต้นอ่อน

3.5 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ในอดีต การคัดเลือกหรือการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ดีสำหรับใช้ในทางการเกษตร ใช้วิธีการสังเกตดูลักษณะต่างๆ ที่แสดงออกภายนอกของพืช และนำลักษณะที่ได้มาใช้เป็นลักษณะประจำพันธุ์ในการจำแนกพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด ใช้คัดเลือกพืชที่มีลักษณะที่ต้องการเพื่อนำไปเพาะปลูก และในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ แต่ลักษณะภายนอกที่ปรากฏเป็นผลร่วมกันของการแสดงออกของยีนภายใน และผลกระทบของสภาพแวดล้อมที่พืชเจริญเติบโตในช่วงเวลานั้น สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันอาจส่งผลให้ลักษณะที่แสดงออกของพืชที่เป็นพันธุ์เดียวกันแตกต่างกันได้ (ธีรยุทธ, online) การใช้ลักษณะภายนอกที่ปรากฏจึงไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้จำแนกหรือระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องแม่นยำ ทำให้มีข้อจำกัดในการใช้ลักษณะภายนอกในการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคโนโลยีของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ)มาบ่งชี้ความแตกต่างหรือความหลากหลาย (genetic diversity) ของพืช ไม่ว่าจะเป็นลักษณะทางด้านปริมาณ (quantitative traits) หรือลักษณะทางด้านคุณภาพ (qualitative traits) เครื่องหมายดีเอ็นเอนับได้ว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของพืชไม่ว่าระหว่างหรือภายในชนิด (species) ประชากร (populations) พันธุ์ (varieties) และสายพันธุ์ (breeding lines) ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและไม่ผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม เครื่องหมายดีเอ็น

เอมีข้อดีดังนี้ (Tankslay *et al*., 1989; McCouch and Tankslay, 1991; Paterson *et al*., 1991; Kochert, G., 1994; USDA, 1994; Paterson, 1996; Stuab *et al*., 1996) 1) มีความเที่ยงตรงสูง (accurate) เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือช่วย คัดเลือกจีโนไทป์ที่ต้องการจากพืชโดยตรง วิธีการนี้จึงมีความถูกต้องและแม่นยำสูงกว่าการคัดเลือกจากลักษณะที่ปรากฏให้เห็นหรือลักษณะฟีโนไทป์ ซึ่งมักจะผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม ดังนั้น เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ จึงมีความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะ (heritability) ได้ 100% 2) มีจำนวนเครื่องหมายในปริมาณมาก (abundance) เนื่องจากเครื่องหมายนั้น พัฒนามาจากดีเอ็นเอทั้งจีโนม ซึ่งต่างจากเครื่องหมายโปรตีนที่มีการพัฒนามาจากผลผลิตของยีนซึ่งเป็นส่วนน้อยของจีโนมที่มีการแสดงออกเท่านั้น 3) ผลการวิเคราะห์คงที่ (constant nature) การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยในการคัดเลือกนั้น สามารถกระทำได้ในทุกช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของพืชและสามารถใช้เนื้อเยื่อพืชจากส่วนใดส่วนหนึ่งหรือจากเมล็ดมาทำการตรวจสอบ เนื่องจากดีเอ็นเอจะไม่เปลี่ยนแปลงไม่ว่าจะทำการวิเคราะห์ในระยะใดของการเจริญเติบโตหรือใช้เนื้อเยื่อพืชจากส่วนใดก็ตาม ดังนั้น นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงสามารถทำการคัดเลือกพืชได้ตั้งแต่ต้นพืชมีขนาดเล็กอยู่ ซึ่งจะช่วยย่นระยะเวลาการคัดเลือก หากเป็นการคัดเลือกจากลักษณะที่ปรากฏให้เห็น นักปรับปรุงพันธุ์พืชต้องรอจนพืชนั้นเจริญเติบโตเต็มที่ จนสามารถแสดงลักษณะดังกล่าวออกมาได้ 4) ไม่ทำลายต้นพืช (no effect on organisms) การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยคัดเลือกนั้นไม่ทำลายต้นพืช ทั้งนี้ เนื่องจากสามารถนำเพียงชิ้นส่วนของพืชเพียงเล็กน้อย เช่น ใบมาสกัดดีเอ็นเอแล้วนำไปใช้ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยต้นพืชนั้นสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ในกรณีที่มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection) เพราะหากทำการทดสอบแล้วพบว่าพืชนั้นมียีนที่สนใจก็สามารถดำเนินการคัดเลือกต่อได้เลยโดยไม่เสียเวลาปลูกใหม่ 5) การถ่ายทอดลักษณะแบบข่มร่วม (co-dominant manner) เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ จะแสดงลักษณะการข่มร่วมกันของแอลลีล หรือเรียกลักษณะของเครื่องหมายแบบนี้ว่า co-dominant marker ซึ่งจะแยกความ แตกต่างของสายพันธุ์พืชที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous genotype) และเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous genotype) ได้ ซึ่งต่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอบางชนิด เช่น อาร์เอพีดี (RAPD marker) จะแสดงลักษณะการข่มของแอลลีลแบบสมบูรณ์ (dominant marker) จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่เป็นโฮโมไซกัส และ เฮทเทอโรไซกัสได้ แต่จะแยกความแตกต่างของจีโนไทป์ได้เพียงลักษณะเด่นและลักษณะด้อยเท่านั้น และ 6) สามารถทำการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการหลายลักษณะได้พร้อมๆ กันตั้งแต่ในระยะต้นกล้า (early developmental stage screening for several traits) ทำ

ให้ประหยัดเวลา พื้นที่ปลูก แรงงาน และค่าใช้จ่ายอื่นๆ ในการดูแลพืช ตัวอย่างเช่น ในกรณีของการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคนั้น พบว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยลดขั้นตอนของการประเมินความสามารถของสายพันธุ์พืชในการต้านทานโรค (pathogen screening) เพื่อค้นหาต้นที่มีความสามารถในการต้านทานโรคดังกล่าว ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ค่อนข้างยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง