รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์ความหนาของกะลาในปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

Shell thickness analysis in oil palm using SSR markers

คณะนักวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ

ศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์

อาจารย์ ดร.กรกช นาคคนอง

นายนิทัศน์ สองสี

นางสาวฮูดา แก้วสีสม

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก งบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2555 รหัสโครงการ

NRT550033S

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

ชื่อโครงการเดี่ยว การวิเคราะห์ความหนาของกะลาในปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (Shell thickness analysis in oil palm using SSR markers)

คณะนักวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ ศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ อ.ดร.กรกช นาคคนอง นายนิทัศน์ สองสี และนางสาวสุดา แก้วสีสม

หน่วยงานที่สังกัด ทบวงมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ภาควิชาพืชศาสตร์ หมายเลขโทรศัพท์ (074) 286139 หรือ (074) 212846 โทรสาร (074) 212823 e-mail watcharin.s@psu.ac.th

สารบัญ

	หน้า
ชื่อโครงการเดี่ยว	1
คณะนักวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด	1
สารบาญ	2
รายการตาราง	3
รายการภาพ	3
กิตติกรรมประกาศ	4
บทคัดย่อ	5
Abstract	6
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	7
การตรวจเอกสาร	7
วิธีการทดลอง	9
สถานที่ทำการทดลอง	11
ผลการทดลองและวิจารณ์	12
สรุปผลการทดลอง	17
เอกสารอ้างอิง	17
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	19

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เอสเอสอาร์	11
2	ความหนากะลา เปอร์เซ็นต์เนื้อปาล์ม และปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันแบบต่าง ๆ	14

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลปาล์มน้ำมันแบบต่าง ๆ ก) ดูรา-กะลาหนา ข) พิสิเฟอรา-ไม่มีกะลา ค) เทเนอรา-กะลาบาง	16
2	แถบดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันแบบดูรา 24 ต้น พิสิเฟอรา 9 ต้น และเทเนอรา 34 ต้น เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล MF233033 (ก) และ MF233056 (ข) (ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแบบปาล์มน้ำมัน)	17

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่สนับสนุนการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี ที่สนับสนุนให้ใช้ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2555

ท้ายนี้ ข้าพเจ้าหวังว่ารายงานฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์กับนักวิชาการ และผู้สนใจทั่วไป

วัชรินทร์ ชุ้นสุวรรณ

หัวหน้าโครงการ

กันยายน 2556

บทคัดย่อ

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมความหนากะลา จะช่วยนักปรับปรุงพันธุ์พืชคัดเลือกพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ในระยะกล้า ซึ่งจะช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงประชากรเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ดูราและพิสิเฟอราที่ดี ได้ทำการสุ่มคัดเลือกต้นปาล์มน้ำมันชั่วที่ 2 จำนวน 67 ต้น จากแปลงรวบรวมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมันชั่วที่ 2 ซึ่งรวบรวมจากต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ของปาล์มน้ำมันแบบเทเนอรา จากสวนต่าง ๆ ในภาคใต้ แล้วนำมาปลูกจำนวน 1,081 ต้น ปีพ.ศ. 2532 ที่สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา ปาล์มน้ำมันชั่วที่ 2 จำนวน 67 ต้น ถูกสุ่มคัดเลือกและจำแนกออกเป็นแบบดูรา 24 ต้น พิสิเฟอรา 9 ต้น และเทเนอรา 34 ต้น และพบว่าปาล์มน้ำมันแบบดูรา มีความหนาของกะลา 2.10-4.27 มิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล 46.76-70.76% ปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราไม่มีกะลาและมีเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล 41.68-100% ปาล์มน้ำมันแบบเทเนอรา มีความหนาของกะลา 0.76-2.79 มิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล 65.40-86.26% ปาล์มน้ำมันแบบเทเนอรามีการเรียงตัวของเส้นใยรอบกะลา แต่ปาล์มน้ำมันแบบดูราไม่มีการเรียงตัวของเส้นใยรอบกะลา เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์กับปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล mEgCIR008, mEgCIR0230, mEgCIR0353, mEgCIR0465, mEgCIR02347, mEgCIR3275, MF233033, MF233056 และ MF2331019 พบว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุล MF233033 ร่วมกับ MF233056 สามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ได้ถูกต้อง 80% 100% และ 76.47% ตามลำดับ

คำสำคัญ: ดูรา พิสิเฟอรา เทเนอรา ปาล์มน้ำมัน เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

Abstract

Oil palm trees can be identified according to fruit traits into dura, pisifera, and tenera types. DNA markers associated with shell thickness can be used to identify fruit traits at the seedling stage of oil palm. The purpose of this study was to use SSR markers for identification of dura, pisifera, and tenera oil palms based on shell thickness. Sixty seven F_2 plants of oil palm were selected from 1,081 F_2 plants which were collected from different F_1 tenera hybrid oil palm plantations in southern Thailand. They were grown at Khong Research Station, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla in 1989. Sixty seven F_2 oil palm trees were classified based on fruit morphology into twenty four dura, nine pisifera, and thirty four tenera trees. A shell thickness of dura types ranged from 2.10 to 4.27 mm and a mesocarp per fruit weight ranged from 46.76 to 70.76%. The pisifera types have no shell and a mesocarp per fruit weight ranged from 41.68 to 100%. A shell thickness of tenera types ranged from 0.79 to 2.79 mm and a mesocarp per fruit weight ranged from 65.4 to 86.26%. The tenera had a ring of fibers enclosing the kernel but the dura had no ring of fibers enclosing the kernel. Nine SSR markers, mEgCIR0008, mEgCIR0230, mEgCIR0353, mEgCIR0465, mEgCIR2347, mEgCIR3275, MF233019, MF233033, and MF233056 were used for identification of dura, pisifera, and tenera oil palms. The only two markers, MF233033 and MF233056 were found specific for identifying the dura, pisifera, and tenera types. They were able to predict the dura, pisifera, and tenera types with an accuracy of 80, 100, and 76.47%, respectively. These results suggest that the SSR markers can be used as marker-assisted selection (MAS) of oil palm breeders for classification of fruit traits of oil palm.

Key words: dura, pisifera, tenera, oil palm, SSR marker

บทนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกให้ผลผลิตน้ำมัน 3.74 ตันต่อไร่ต่อปี เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองให้ผลผลิตน้ำมัน 0.37 ตันต่อไร่ต่อปี ประสิทธิภาพการให้พลังงานสูงกว่าถั่วเหลืองประมาณ 30 เท่า นอกจากนี้ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้นให้ผลผลิตไม่ต่ำกว่า 25 ปี การปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทยในปี 2548 - 2551 ให้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 2.4 - 3.2 ตันต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ปัญหาส่วนหนึ่งเนื่องมาจากการปลอมปนของพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ที่เกษตรกรปลูกในแต่ละสวน (อุไรวรรณ และธีระ, 2552) ซึ่งเกษตรกรต้องการพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบเทเนอรา ที่มีกะลาบาง และให้ผลผลิตสูง ปาล์มน้ำมันแบ่งได้ 3 แบบตามลักษณะสัณฐานวิทยาของผล ได้แก่ ปาล์มน้ำมันแบบดูรามีกะลาหนา 2-8 มิลลิเมตร ควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ (*ShSh*) พิสิเฟอราไม่มีกะลา ยีนด้อย 1 คู่ (*shsh*) และเทเนอรา (*Shsh*) มีกะลาบาง 0.5-4 มิลลิเมตร เป็นลูกผสมระหว่างดูรา และพิสิเฟอรา (Beirnaert and Vanderweyen, 1941; Hardon, 1976)

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะช่วยในการคัดเลือกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ในระยะกล้า การผสมพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบเทเนอราและเทเนอรา ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อคัดเลือกชั่วลูกของปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา นักปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกพันธุ์ปาล์มน้ำมันแบบต่าง ๆ ในระยะกล้าได้ ซึ่งจะช่วยย่นระยะเวลาอย่างน้อย 3 ปี ในการปรับปรุงประชากรหรือคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ดูราและพิสิเฟอรา ได้ตรงตามจำนวนความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

วัตถุประสงค์

การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่มีความสัมพันธ์กับความหนาของกะลาเพื่อจำแนกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา

การตรวจเอกสาร

Mayes และคณะ (1997) ศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมในปาล์มน้ำมันลูกผสมตัวเองชั่วที่ 2 จากการผสมตัวเองของปาล์ม A 137/30 ซึ่งเป็นแผนที่ทางพันธุกรรมแผนแรกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP 97 เครื่องหมาย และเครื่องหมายสัณฐานวิทยาความหนาของกะลา แบ่งได้ 24 กลุ่มยีน ระยะทางทั้งหมด 860 cM ต่อมา Moretzsohn (2000) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD 174 เครื่องหมาย วิเคราะห์แผนที่ทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมันเทเนอราและพิสิเฟอราและค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับยีน shell-thickness (*Sh*) โดยสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างคู่ผสมเทเนอราและพิสิเฟอรา จำนวน 95 ต้น และใช้เทคนิคการทำแผนที่จากการผสมเพื่อทดสอบเทียม (pseudo-testcross mapping) เนื่องจากยีนของต้นพ่อและแม่มีความเป็นเฮเทอโรไซกัสสูง แผนที่ทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมันเทเนอรา แบ่งได้ 12 กลุ่มยีน ระยะทางทั้งหมด 449.3 cM และแผนที่ทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา แบ่งได้ 15 กลุ่มยีน ระยะทางทั้งหมด 399.7 cM

ยีน *Sh* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมาย R11-1282 และ T19-1046 ซึ่งมีระยะทางห่างจากยีน *Sh* 17.5 cM และ 23.9 cM ตามลำดับ

Rance และคณะ (2001) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP 153 เครื่องหมาย เพื่อวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณขององค์ประกอบผลผลิตของปาล์มน้ำมัน ในลูกผสมตัวเองชั่วที่ 2 จำนวน 84 ต้น จากการผสมตัวเองของต้นปาล์ม A 137/30 เพื่อค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ เมื่อวิเคราะห์แผนที่ทางพันธุกรรม แบ่งการยึดเรียงของยีนได้ 22 กลุ่มยีน ระยะทางทั้งหมด 852 cM การวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณ พบอิทธิพลของยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณของจำนวนทะลายต่อต้นต่อปี น้ำหนักทะลาย น้ำหนักผล ผลผลิตน้ำหนักสดทั้งทะลาย เนื้อในต่อผล กะลาต่อผล เนื้อปาล์มต่อผล น้ำมันต่อทะลาย พื้นที่ใบ ความยาวแกนกลางใบ และพื้นที่ภาคตัดขวางโคนก้านใบ ยกเว้นลักษณะผลต่อทะลาย และความสูง เครื่องหมายโมเลกุล Z316 และ SP963 (ไม่ได้ใช้ในการวิเคราะห์แผนที่ทางพันธุกรรม) และ SP953 บนกลุ่มยีน 7 ใกล้ชิดกับลักษณะน้ำมันต่อทะลาย กณพ (2545) พัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ MJT1/2 MJT3/4 MJT5/6 T:CT-1 และ T:CT-1/2 EPICไพรเมอร์ CAMFIX /R และใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบปาล์มน้ำมันแบบดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา Billotte และคณะ (2005) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR 255 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุล AFLP 688 เครื่องหมาย และเครื่องหมายสัณฐานวิทยาความหนาของกะลา เพื่อวิเคราะห์แผนที่ทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน ในปาล์มน้ำมันลูกผสมระหว่างพี่น้องพ่อแม่เดียวกัน จำนวน 116 คู่ เกิดจากการผสมระหว่างปาล์มน้ำมันแบบเทเนอราและดูรา และใช้เทคนิคการทำแผนที่จากการผสมเพื่อทดสอบเทียม แผนที่ทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมัน แบ่งได้ 16 กลุ่มยีน ระยะทางทั้งหมด 1,743 cM แผนที่ทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมันนี้เป็นแผนที่แรกที่แบ่งกลุ่มยีนได้เท่ากับจำนวนโครโมโซมของปาล์มน้ำมัน เครื่องหมายโมเลกุลAFLP *E-Agg/M-CAA132* และเครื่องหมายโมเลกุล SSR mEgCIR3275 ระยะทางห่างจากยีน *Sh* 4.7 และ 23 cM ตามลำดับ บนกลุ่มยีน 4 Chua Kia Ling (2006) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP 106 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุล AFLP 171 เครื่องหมาย วิเคราะห์แผนที่ทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมันแบบดูรา และพิสิเฟอรา โดยสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างคู่ผสมดูราและพิสิเฟอรา และใช้เทคนิคการทำแผนที่จากการผสมเพื่อทดสอบเทียม แผนที่ทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมันดูรา แบ่งได้ 18 กลุ่มยีน ระยะทางทั้งหมด 584.1 cM และแผนที่ทางพันธุกรรมปาล์มน้ำมันพิสิเฟอรา แบ่งได้ 19 กลุ่มยีน ระยะทางทั้งหมด 1099.3 cM การใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เครื่องหมาย mEgCIR0008, mEgCIR0230, mEgCIR0304, mEgCIR0353, mEgCIR0377, mEgCIR0465, mEgCIR1772, mEgCIR0008 mEgCIR0465, MF233033, MF233056 และ MF2331019 พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลูกผสมปาล์มน้ำมันเทเนอราระหว่างคู่ผสมดูราและพิสิเฟอรา แต่จำเพาะเฉพาะพ่อแม่และลูกผสมบางคู่เท่านั้น (อังคณา และธีระ, 2551; Abdullah และคณะ, 2011; Thawaro และ Te-chato, 2010)

SSR หรือ simple sequence repeat เป็นลำดับเบสซ้ำสั้น 1-4 คู่เบส ที่มีการกระจายตัวทั่วจีโนม แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ สามารถนำไปใช้ได้ง่าย ต้องการดีเอ็นเอต้นแบบ

ปริมาณน้อย ผลการตรวจสอบมีความแม่นยำ และมีลักษณะการข่มร่วม (Liu, 1998) ปัจจุบันจึงนิยมใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกลักษณะต่าง ๆ ดังเช่นในปาล์มน้ำมัน เป็นต้น

วิธีการทดลอง

การจำแนกแบบของปาล์มน้ำมันของประชากรชั่วที่ 2

ต้นปาล์มน้ำมันชั่วที่ 2 จากแปลงรวบรวมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน จำนวน 1,081 ต้น (ต้นที่ได้จากการเก็บเมล็ด ของปาล์มน้ำมันแบบเทเนอรา จากสวนปาล์มน้ำมันในภาคใต้ เมื่อปี พ.ศ. 2532 แล้วนำมาปลูกที่สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา) ที่ถูกจำแนกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราโดยยงยุทธ (2545) ในการทดลองได้สุ่มคัดเลือกจำนวน 67 ต้น แต่ละต้นสุ่มผลสุก 10 ผล จากแต่ละทะลายของแต่ละต้น วัดความหนาของกะลา หน่วยเป็นมิลลิเมตร เปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล และการเรียงตัวของเส้นใยรอบกะลา แล้วจำแนกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา โดยใช้เกณฑ์ของ Hardon (1976) และธีระ (2528)

การเก็บตัวอย่างใบ

เก็บตัวอย่างใบอ่อน 2-3 ใบต่อต้น เป็นชิ้นส่วนใบขนาด 5-8 ซม. เก็บใส่ถุงพลาสติควางแช่ไว้ในถังน้ำแข็ง ก่อนนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนใบตัวอย่างละ 200 มิลลิกรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งที่แช่เย็น บดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำผงตัวอย่างใบใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติมสารละลาย CTAB 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสในเครื่อง water bath เป็นเวลา 60 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Chloroform 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Potassium acetate 100 ไมโครลิตรและเอทานอลแช่เย็น 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30-60 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เพื่อตกตะกอน เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70 % ethyl alcohol 500 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง เติม TE buffer 20 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล (LE Agarose, Promega, USA) เข้มข้น 0.75% แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE buffer (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0) เป็นเวลา

20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอแม่แบบความเข้มข้น 20 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมล ไพรเมอร์เอสเอสอาร์ชนิด forward และ reward ที่รายงานว่ามีความสัมพันธ์กับความหนาของกะลา หรือสามารถแยกความแตกต่างของลูกผสมเทอเนอราระหว่างแม่ดูราและพ่อพิสิเฟอรา (อังคณา และธีระ, 2551; Abdullah และคณะ, 2011; Billotte และคณะ, 2005; Thawaro and Te-chato, 2010) ดังตารางที่ 1 จำนวน 0.2 ไมโครโมล แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล และเอนไซม์ *Taq* polymerase 1 ยูนิต รวมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิของระบบเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เริ่มกระบวนการที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 52 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และสุดท้ายกระบวนการที่ 72 องศาเซลเซียส 8 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส

ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา โดยแยกขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสด้วยตัวกลางโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative (acetic acid เข้มข้น 10%) นาน 20 นาที เขย่าเบาๆ เมื่อครบเวลานำไปล้างในน้ำกลั่น 15 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่แล้วล้างต่ออีก 5 นาที นำแผ่นเจลใส่ลงในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate เข้มข้น 0.2%) เพื่อย้อมเจลเป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ หลังจากนั้นนำแผ่นเจลจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วเพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรตที่มากเกินพอ แล้วนำแผ่นเจลใส่ในสารละลาย developer (sodium carbonate เข้มข้น 25%, formaldehyde เข้มข้น 40%, sodium thiosulfate เข้มข้น 50 mg/ml) ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เขย่าสม่ำเสมอ จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยแช่สารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 10% นาน 2-5 นาที นำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่น แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ ตามวิธีการของ Bassam และคณะ (1991)

การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เบื้องต้น

การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเบื้องต้น ทำการสุ่มคัดเลือกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ของประชากรชั่วที่ 2 แบบละ 7 ต้น แล้วใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกไว้ดังตารางที่ 1 เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับความหนากะลาหรือปาล์มน้ำมันแต่ละแบบ

การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่ถูกคัดเลือก

นำเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้ไปทดสอบกับปาล์มน้ำมันต้นอื่น ๆ จากประชากรชั่วที่ 2 แบบดูรา จำนวน 17 ต้น พิสิเฟอรา จำนวน 2 ต้น และเทเนอรา จำนวน 27 ต้น เพื่อตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้ง

การบันทึกผลแถบดีเอ็นเอต้นปาล์มน้ำมันแต่ละต้นและวิเคราะห์ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง

บันทึกผลแถบดีเอ็นเอต้นปาล์มแต่ละต้น แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอกับความหนาของกะลาของต้นปาล์มแต่ละแบบได้แก่ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับความหนากะลาหรือปาล์มน้ำมันแต่ละแบบ และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เอสเอสอาร์

No.	Primer	Repeat motif	5′ sequence	3′ sequence	TA (°C)	Allele size
1	mEgCIR0008	$(GA)_{17}$	CGGAAAGAGGGAAGATG	ACCTTGATGATTGATGTGA	52	105-150
2	mEgCIR0230	$(TA)_6GAG(GA)_{18}$	CCCTGGCCCCGTTTTTC	AGCGCTATATGTGATTCTAA	52	336
3	mEgCIR0353	$(GT)_{11}(GA)_{15}$	AGAGAGAGAGAGTGCGTATG	GTCCCTGTGGCTGCTGTTTC	52	102
4	mEgCIR0465	$(CCG)_4$	TCCCCCACGACCCATTC	GGCAGGAGAGGCAGC ATTC	58	131
5	mEgCIR2347	$(GA)_{15}$	ATTTTGCATGTGTTGAGAGC	CAACCAATTGCACCCTAAAG	52	153
6	mEgCIR3275	$(GA)_{17}$	GAAGCCTGAGACCGCATAGA	TTCGGTGATGAAGATTGAAG	52	146
7	MF233033	$(TC)_{11}$	GAGGAGGAGGGGAGAAGAGT	AAATACCATTCAGAGAAAGCAC	52	200
8	MF233056	$(CT)_{15}$	CCGAATAGAAGAGGAAAGAATA	AGGTTTGGTGGAGAAGTGTT	52	232
9	MF2331019	$(TC)_8$	TGGGTAAATTGGTAATTCTCCT	CCTTTTTCTTCCTCTTTTCCA	54	195

TA = Temperature of amplification

ที่มา: Abdullah (2011); Billotte และคณะ (2001 และ 2005)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา และสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา

ผลการทดลองและวิจารณ์

การจำแนกแบบของปาล์มน้ำมันของประชากรชั่วที่ 2

ต้นปาล์มน้ำมันชั่วที่ 2 จำนวน 67 ต้น จากแปลงรวบรวมเชื้อพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ที่สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา ถูกจำแนกเป็นแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราโดยใช้เกณฑ์ของ Hardon (1976) และธีระ (2528) ตามความหนาของกะลา เปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล และการเรียงตัวของเส้นใยรอบกะลา ผลการจำแนกแสดงดังตารางที่ 2 พบว่าปาล์มน้ำมันแบบดูรา มีความหนาของกะลา 2.10-4.27 มิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล 46.76-70.76% ปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา ไม่มีกะลาและมีเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล 41.68-100% ปาล์มน้ำมันแบบเทเนอรา มีความหนาของกะลา 0.76-2.79 มิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล 65.40-86.26% ปาล์มน้ำมันแบบเทเนอรามีการเรียงตัวของเส้นใยรอบกะลาแต่ปาล์มน้ำมันแบบดูราไม่มีการเรียงตัวของเส้นใยรอบกะลา (ภาพที่ 1) ส่วนมากปาล์มน้ำมันแบบเทเนอราบางต้นมีความหนาของกะลามากกว่าปาล์มน้ำมันแบบดูรา ปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอราบางต้นมีเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผลน้อยกว่า 100% เพราะว่าส่วนกลางของผลบางผลจะมีเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน

การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์เบื้องต้น

ทำการสกัดดีเอ็นเอและได้ปริมาณดีเอ็นเอจากแต่ละต้น 20-120 นาโนกรัม (ตารางที่ 2) แล้วทำการวิเคราะห์เอสเอสอาร์ กับปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ของประชากรชั่วที่ 2 จำนวนแบบละ 7 ต้น โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล mEgCIR008, mEgCIR0230, mEgCIR0353, mEgCIR0465, mEgCIR02347, mEgCIR3275, MF233033, MF233056 และ MF2331019 (ตารางที่ 1) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล MF233033 และMF233056 สามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ดังนั้นจึงใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองนี้ ไปทดสอบกับปาล์มน้ำมันต้นอื่น ๆ จากประชากรชั่วที่ 2 แบบดูรา 17 ต้น พิสิเฟอรา 2 ต้น และเทเนอรา 27 ต้น เพื่อตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้ง

จากภาพที่ 2 พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล MF233033 สามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ที่ แถบดีเอ็นเอ 900, 700 และ 300 bp ตามลำดับ และสามารถแยกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ได้ถูกต้อง 80% 66.66% และ76.47% ตามลำดับ เครื่องหมายโมเลกุล MF233056 สามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ที่ แถบดีเอ็นเอ 700, 200-300 และ 100-200 bp ตามลำดับ และสามารถแยกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ได้ถูกต้อง 66.66% 100% และ 70.58% ตามลำดับ เนื่องจากผลปาล์มน้ำมันแบบดูราและเทเนอรา มีความแตกต่างของความหนากะลาของผลปาล์มในแต่ละต้นที่แตกต่างกัน การจำแนกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ได้ถูกต้อง 100% จะจำแนกได้เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะพ่อแม่และลูกของแต่ละคู่ผสมเท่านั้น ดังรายงานของอังคณา และธีระ (2551) Thawaro และ Te-chato (2010) และ Abdullah และคณะ (2011)

จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล MF233033 และMF233056 ร่วมกันจะสามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ได้ถูกต้อง 76-100% การคัดแยกแบบปาล์มน้ำมันที่ถูกต้องอย่างน้อย 76% ก็จะช่วยนักปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันคัดเลือกต้นกล้าปาล์มตรงตามแบบปาล์มน้ำมันดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ที่ต้องการนำไปปลูกในแปลงผสม คัดเลือก และทดสอบพันธุ์ ได้ตรงตามความต้องการของนักปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

ตารางที่ 2 ความหนากะลา เปอร์เซ็นต์เนื้อปาล์ม และปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันแบบต่าง ๆ

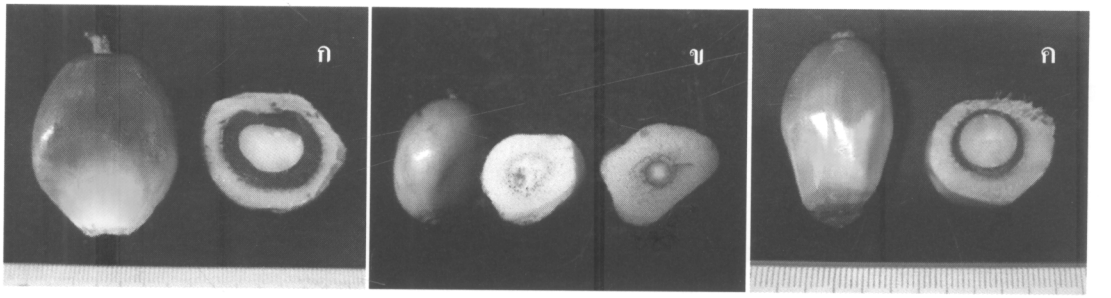
ลำดับที่	หมายเลขต้น	ความหนาของกะลา (มม.)	เปอร์เซ็นต์เนื้อปาล์ม	ปริมาณ DNA (นาโนกรัม)	แบบปาล์มน้ำมัน
1	10	3.73±0.6	53.72±5.5	40	ดูรา
2	12	3.29±0.7	54.87±3.7	80	ดูรา
3	17	4.27±0.6	62.39±5.3	100	ดูรา
4	25	3.16±0.8	51.52±2.5	80	ดูรา
5	26	2.87±0.8	53.86±2.6	100	ดูรา
6	32	2.73±0.8	48.81±3.3	60	ดูรา
7	34	3.48±0.8	70.76±3.9	80	ดูรา
8	42	2.73±0.7	67.85±5.6	80	ดูรา
9	43	3.13±0.8	49.24±27	80	ดูรา
10	44	4.07±0.6	48.14±3.8	60	ดูรา
11	45	2.92±0.8	46.76±3.4	40	ดูรา
12	47	3.02±0.7	56.26±4.6	40	ดูรา
13	51	3.11±0.8	49.71±2.6	40	ดูรา
14	52	2.71±0.8	52.53±2.7	20	ดูรา
15	53	3.5±0.6	64.94±5.3	20	ดูรา
16	54	3.66±0.6	60.61±4.9	20	ดูรา
17	56	2.90±0.7	59.18±4.8	40	ดูรา
18	57	3.51±0.7	59.75±4.4	40	ดูรา
19	58	2.73±0.7	49.18±8.9	80	ดูรา
20	61	3±0.7	52.16±4.3	80	ดูรา
21	80	2.1±0.8	56.21±5	40	ดูรา
22	81	2.7±0.8	58.46±3.1	40	ดูร่า
23	83	3.60±0.7	51.66±2.5	80	ดูรา
24	85	3.06±0.8	60.59±3.1	120	ดูรา
25	5	0	41.68±4.6	40	พิสิเฟอรา
26	6	0	66.23±5.6	80	พิสิเฟอรา
27	21	0	71.87±7.9	80	พิสิเฟอรา

ตารางที่ 2 (ต่อ)

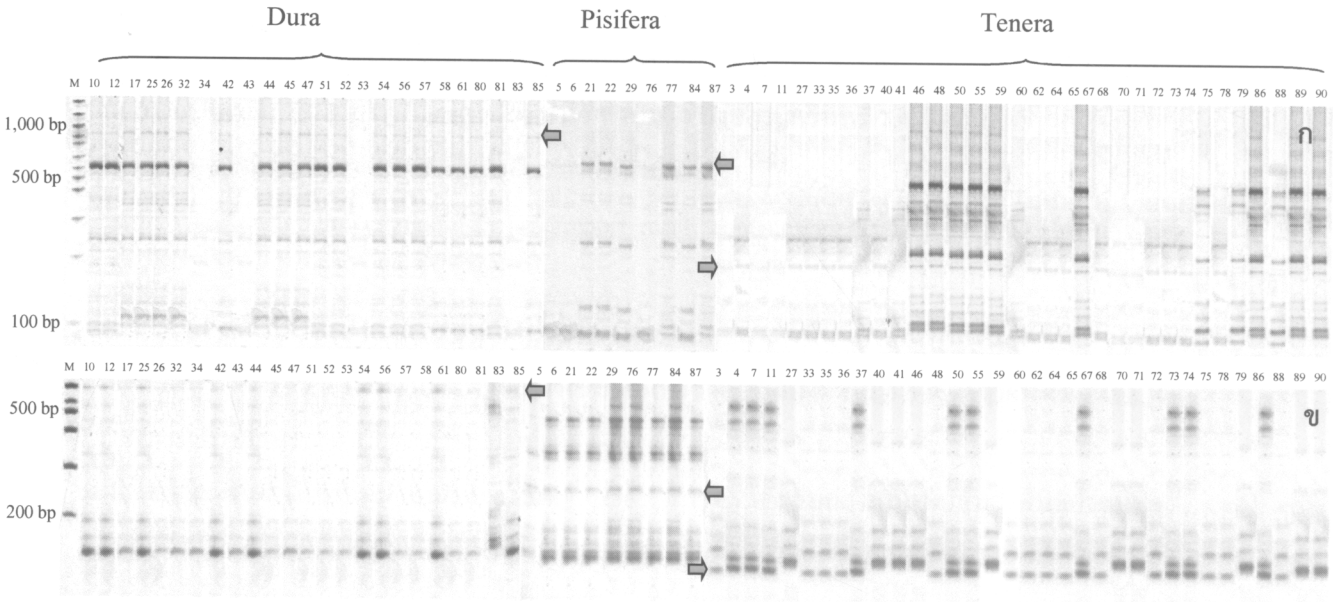
ลำดับที่	หมายเลขต้น	ความหนาของกะลา (มม.)	เปอร์เซ็นต์เนื้อปาล์ม	ปริมาณ DNA (นาโนกรัม)	แบบปาล์มน้ำมัน
28	22	0	55.48±5.5	80	พิสิเฟอรา
29	29	0	100	60	พิสิเฟอรา
30	76	0	90.38	80	พิสิเฟอรา
31	77	0	100	40	พิสิเฟอรา
32	84	0	100	80	พิสิเฟอรา
33	87	0	72.7±8.1	80	พิสิเฟอรา
34	3	0.9±0.2	86.26±4.7	40	เทเนอรา
35	4	1.24±0.8	85.44±6.6	40	เทเนอรา
36	7	1.87±0.8	85.71±7.3	20	เทเนอรา
37	11	1.61±0.8	73.01±3.8	40	เทเนอรา
38	27	1.71±0.7	83.08±7.2	100	เทเนอรา
39	33	1.14±0.8	75.33±4.7	40	เทเนอรา
40	35	0.84±0.8	78.86±6.6	100	เทเนอรา
41	36	0.83±0.8	80.72±6.8	20	เทเนอรา
42	37	1.19±0.8	71.58±6.1	20	เทเนอรา
43	40	1.15±0.8	76.75±6.5	40	เทเนอรา
44	41	1.14±0.9	74.08±3.9	40	เทเนอรา
45	46	0.93±0.9	75.36±4.3	60	เทเนอรา
46	48	1.48±0.8	76.39±6.4	40	เทเนอรา
47	50	1.07±0.8	77.52±8.6	40	เทเนอรา
48	55	2.79±0.7	73.65±6.2	60	เทเนอร่า
49	59	1.5±0.8	65.4±5.6	80	เทเนอร่า
50	60	0.95±0.9	84.37±4.6	80	เทเนอรา
51	62	1.18±0.9	73.34±11.3	90	เทเนอรา
52	64	2.16±0.8	75.44±6.3	100	เทเนอรา
53	65	1.35±0.8	74.38±3.9	100	เทเนอรา
54	67	1.96±0.8	82.64±4.4	20	เทเนอรา
55	68	0.89±0.8	79.6±5.9	40	เทเนอรา
56	70	1.05±0.8	83.21±7.06	80	เทเนอรา
57	71	1.09±0.9	84.00±4.6	40	เทเนอรา
58	72	0.98±0.1	73.24±4.3	40	เทเนอรา

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	หมายเลขต้น	ความหนาของกะลา (มม.)	เปอร์เซ็นต์เนื้อปาล์ม	ปริมาณ DNA (นาโนกรัม)	แบบปาล์มน้ำมัน
59	73	0.99±0.2	83.63±6.2	60	เทเนอรา
60	74	1.19±0.8	77.11±4.8	40	เทเนอรา
61	75	1.75±0.8	77.23±6.8	80	เทเนอรา
62	78	2.1±0.8	77.01±6.5	50	เทเนอรา
63	79	1.87±0.8	79.12±6.7	40	เทเนอรา
64	86	0.99±0.2	78.05±6.6	40	เทเนอรา
65	88	1.0±0.08	67.03±7.0	60	เทเนอรา
66	89	0.79±0.02	70.85±8.1	40	เทเนอรา
67	90	0.90±0.07	86.21±4.9	40	เทเนอรา



ภาพที่ 1 ผลปาล์มน้ำมันแบบต่าง ๆ ก) ดูรา-กะลาหนา ข) พิสิเฟอรา-ไม่มีกะลา ค) เทเนอรา-กะลาบาง



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันแบบดูรา 24 ต้น พิสิเฟอรา 9 ต้น และเทเนอรา 34 ต้น เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล MF233033 (ก) และMF233056 (ข) (ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแบบปาล์มน้ำมัน)

สรุปผลการทดลอง

ปาล์มน้ำมันชั่วที่ 2 จำนวน 67 ต้น ถูกสุ่มคัดเลือกและจำแนกต้นปาล์มน้ำมันออกเป็นแบบดูรา 24 ต้น พิสิเฟอรา 9 ต้น และเทเนอรา 34 ต้น และพบว่าปาล์มน้ำมันแบบดูรา มีความหนาของกะลา 2.10-4.27 มิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล 46.76-70.76% ปาล์มน้ำมันแบบพิสิเฟอรา ไม่มีกะลาและมีเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล 41.68-100% ปาล์มน้ำมันแบบเทเนอรา มีความหนาของกะลา 0.76-2.79 มิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผล 65.40-86.26% ปาล์มน้ำมันแบบเทเนอรามีการเรียงตัวของเส้นใยรอบกะลา แต่ปาล์มน้ำมันแบบดูราไม่มีการเรียงตัวของเส้นใยรอบกะลา

เครื่องหมายโมเลกุล MF233033 ร่วมกับ MF233056 สามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ได้ถูกต้อง 80% 100% และ 76.47% ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กณพ ลิขิตขจรนุวัฒน์. 2545. การศึกษาพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์, RAPD และ EPIC. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

ยงยุทธ เชื้อมงคล. 2545. ความแปรปรวนของลักษณะต่าง ๆ ในประชากรชั่วที่ 2 ของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2528. การปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. ว.สงขลานครินทร์ 7:471-479.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. พืชน้ำมัน: ปาล์มน้ำมัน. http://www.oae.go.th/oae_report/stat_agri/report_result_content.php. (เข้าถึงเมื่อ 16 กุมภาพันธ์ 2553)

อุไรวรรณ ละอองศรี และธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2552. การปลอมปนของพันธุ์ปาล์มน้ำมันในแปลงเกษตรกร จังหวัดสุราษฎร์ธานี. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8 วันที่ 6-9 พฤษภาคม 2552 ณ โรงแรม ดิ เอ็มเพรส อ. เมือง จ. เชียงใหม่.

อังคณา โชติวัฒนศักดิ์ และธีระ เอกสมทราเมษฐ์. 2551. การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลูกผสมปาล์มน้ำมันโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. ว. วิทย์. กษ. 39 (พิเศษ):65-68.

Abdullah, N., M. Rafii Yusop , M. Ithnin , G. Saleh , M.A. Latif . 2011. Genetic variability of oil palm parental genotypes and performance of its' progenies as revealed by molecular markers and quantitative traits. C. R. Biol. 334:290-299.

Bassam, B.J., G. Caetano-Anollés and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 196:80-83.

Billotte N., A.M. Risterucci, E. Barcelos, J.L. Noyer, P. Amblard, and F.C. Baurens. 2001. Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers Genome 44: 413–425.

Billotte, N., N. Marseillac, A.M. Risterucci, B. Adon, P. Brottier, F.-C. Baurens, R. Singh, A. Herra, H. Asmady, C. Billot, P. Amblard, T. Durand-Gasselin, B. Courtois, D. Asmono, S. C. Cheah, W. Rohde, E. Ritter and A. Charrier. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Theor. Appl. Genet. 110:754–765.

Beirnaert, A. and R. Vanderweyen. 1941. Contribution a l'etude genetique et biometrique des varietes d' *Elaeis guineensis* Jacq. Publication INEAC. Serie Scientifique 27.

Chua Kia Ling. 2006. Construction of RFLP and AFLP genetic linkage maps for oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) using a deli dura × yangambi pisifera cross. M.S. thesis Univ. Putra Malasia.

Corley, R.H.V. and P.B. 2003. The oil palm. Miami: Blackwell. Fairhurst, T.H. and E. Mutert. 1999. Introduction to oil palm production. Better Crops International 13: 1-6.

Hardon, J.J. 1976. Oil palm. *In* Evolution of Crop Plants. (ed. N.W. Simmonds) pp. 225-229. London: Longman.

Henson I. E., M. R. M. Noor, M. H. Harun, Z. Y. and S. N. A. Mustakim. 2005. Stress development and its detection in young oil palms in north Kedah, Malaysia. J. of Oil Palm Res. 17:11-26.

Ling, C. K. 2006. Construction of RFLP and AFLP genetic linkage maps for oil palm (*Elaeis Guineensis* JACQ.) using a Deli *Dura* x Yangambi *Pisifera* cross. M.S. thesis, Univ. Putra, Malaysia.

Liu, Ben-Hui. 1998. Statistic Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis. CRC Press LLC, New York.

Mayes S., P. L. Jack, R. H. V. Corley, and D. F. Marshall. 1997. Construction of a RFLP genetic linkage map for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Genome 40:116–122.

Moretzsohn, M.C., C.D.M. Nunes, M.E. Ferreira and D. Grattapaglia. 2000. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theor. Appl. Genet. 100:63–70.

Rance, K.A., S. Mayes, Z. Price, P.L. Jack and R.H.V. Corley. 2001. Quantitative trait loci for yield components in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theor. Appl. Genet.103:1302–1310.

Singh R., S. G. Tan, J. M. Panandam, R. A. Rahman1, L. Clooi1, Eng-Ti L. Low, M. Sharma, J. Jansen and Suan-Choo Cheah. 2009. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for fatty acid composition in an interspecific cross of oil palm. BMC Plant Biology 9:114 – 123.

Thawaro S, Te-chato S. 2010. Verification of legitimate tenera oil palm hybrids using SSR and propagation of hybrids by somatic embryogenesis. Songklanakarin J. Sci. Technol. 32:1–8.

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์สามารถนำไปใช้จำแนกปาล์มน้ำมันแบบต่าง ๆ ได้ถูกต้อง 76-100% และหากให้มีความแม่นยำยิ่งขึ้น ควรมีการทำการวิจัยโดยใช้ยีนที่ควบคุมความหนาของกะลามาจำแนกปาล์มน้ำมันแบบดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา