รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. **แผนงานวิจัย** การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์พืช

   กิจกรรมที่ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกพันธุ์พืช
3. **ชื่อการทดลองที่ (ภาษาไทย)** การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Sex Detection of Date Palm Using Molecular Markers
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

นางสาวอรุโณทัย ซาววา[1] นางนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ[1]

นางสาวจารุฉัตร เขนยทิพย์[2] นายประสาน สืบสุข[1]

5. **บทคัดย่อ**

อินทผลัมเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ต้นที่เพาะจากเมล็ดต้องรอให้ออกดอก 3-7 ปี ถึงจะทราบเพศทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา การทดลองนี้จึงได้ศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จากการทดสอบไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยแสดงแถบดีเอ็นเอเฉพาะในต้นตัวผู้มีขนาด 450 เบส การทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลกับต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้ว จำนวน 169 ต้น พบผลการตรวจเพศไม่ตรงตามเพศจำนวน 8 ต้น คิดเป็นร้อยละ 4.7 มีความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลคิดเป็น 95.3 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากการตีลูกเหล็ก พบมีความบริสุทธิ์เทียบเท่ากับการสกัดด้วยวิธี CTAB แต่รวดเร็วกว่า สำหรับการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเทคนิค High Resolution Melting (HRM) โดยใช้ไพรเมอร์ DpHRM พบว่าสามารถแยกเพศเมียออกจากเพศผู้ได้ และตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการตรวจเพศอินทผลัมในระดับต้นกล้า

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is an economic importance fruit. The sex of plants became known only at the time of first flowering that takes around 3-7 years after seeding, which it wastes cost and time for crop management. This research aims to study and development of the techniques for sex detection in the seedling stage. The results showed DpDOAF and DpDOAR primers could identify the sex by PCR technique. The PCR fragments were generated with the length approximately 450 bp specific to male tree. For validation of DNA marker, the primers were used to amplify the DNA of 169 trees that are known the sex. The results of amplifications were shown 8 trees that inconsistent to the marker. It is 4.7 percentages of all samples. Therefore, the accuracy of these primers is 95.3 percentages. In part of DNA extraction by homogenizing with the steel ball method was indicated the purity equivalent to CTAB method and faster. Moreover, the sex of date palm could identify by HRM

technique using DpHRM primers, which can be used for high throughput scanning. It is an alternative method to sex detection in a phase of seedlings.

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

[2/] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

6. คำนำ

อินทผลัม (Date palm) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Phoenix dactylifera* L. มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=36 อยู่ในตระกูล Arecaceae ตระกูลเดียวกับปาล์ม มีถิ่นกำเนิดในแถบตะวันออกกลาง เป็นพืชที่มีความสำคัญทางสังคมและเศรษฐกิจในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันตกและอัฟริกา ใช้เป็นผลไม้หรือพืชอาหาร มีความสำคัญต่อการพัฒนาด้านการเกษตรในพื้นที่แห้งแล้งทั่วโลก เพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในภูมิภาคที่มีอากาศร้อนและแห้งแล้งแบบทะเลทราย (Wellmann *et al*., 2007) มีการเพาะปลูกมาแล้วกว่า 7000 ปี ลำต้นมีความสูงประมาณ 30 เมตร มีขนาดลำต้นประมาณ 30-50 เซนติเมตร มีใบติดอยู่บนต้นประมาณ 40-60 ก้าน ทางใบยาว 3-4 เมตร (Wrigley, 1995) เริ่มให้ผลผลิตได้เมื่อต้นมีอายุ 4-7 ปีขึ้นไป ต้นลักษณะเป็นต้นเดี่ยวและแตกหน่อทางด้านข้าง มีกาบก้านใบห่อหุ้มต้น ลักษณะใบเป็นแบบขนนก ทางใบชี้ตรงขึ้นไป ไม่โค้งลง ปลายใบแหลมคม ใบสีเขียวอ่อน ใต้ใบสีเทา ใบย่อยพุ่งออกหลายทิศทาง ก้านทางใบมีหนามแหลมยาวและแข็งมาก ช่อดอกออกเป็นจั่นทางโคนใบ ไม่สมบรูณ์เพศ ดอกตัวผู้และตัวเมียแยกกันอยู่คนละต้น ตัวผู้กลีบดอกเป็นแฉกๆ สีขาวคล้ายหางกระรอก ดอกตัวเมียเป็นช่อเม็ดกลมๆ สีเขียวอ่อน ผลมีลักษณะเป็นช่อผล มีหลายลักษณะทั้งรูปทรงกลม กลมรี และเรียวยาว ผลยาวประมาณ 2-4 เซนติเมตร สีผลมีหลายสีทั้งเหลือง น้ำตาล ส้ม แดง ไปจนถึงดำขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ผลสุกมีสีเหลืองจนถึงสีส้มและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้มเมื่อแก่จัด ผลสดมีรสหวาน ติดฝาดเล็กน้อย ผลสุกมักจะนำไปตากแห้ง สามารถเก็บไว้เป็นเวลาหลายปี มีรสชาติหวานฉ่ำ (จารุฉัตร, 2558) ผลผลิตอินทผลัมทั่วโลกในปี 2560 มีจำนวน 8,619,588 ตัน ปลูกมากที่สุดในประเทศอียิปต์ให้ผลผลิตถึง 1,694,813 ตัน รองลงมาได้แก่ อิหร่าน แอลจีเรีย ซาอุดิอาระเบีย ให้ผลผลิตอยู่ที่ 1,065,704 1,029,596 และ 964,536 ตัน ตามลำดับ (FAO, 2017)

การขยายพันธุ์อินทผลัมทำได้ 3 วิธี คือ เพาะจากเมล็ด แยกหน่อจากต้นแม่ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์จากการเพาะเมล็ดมีข้อดี คือ ขยายพันธุ์ปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว มีต้นทุนต่ำกว่าวิธีอื่น แต่มีโอกาสที่จะเป็นต้นตัวผู้และต้นตัวเมียมีอย่างละครึ่ง ไม่สามารถทราบเพศในระยะต้นกล้าได้ ต้องรอจนกว่าจะออกดอกจึงจะทราบเพศ สำหรับต้นตัวเมียที่ได้เกิดจากการผสมข้ามทำให้คุณภาพไม่เหมือนกับต้นแม่ ดังนั้นเมล็ดที่ได้จึงเป็นพันธุ์ลูกผสมไม่ใช่พันธุ์แท้ มีข้อดีคือทำให้ได้พันธุ์ใหม่ขึ้นมา เหมาะสำหรับผู้ที่สนใจปลูกแต่มีเงินลงทุนไม่มาก สามารถเก็บเมล็ดที่ซื้อมาจากตลาดทั่วไปทั้งแบบกินผลสดและผลแห้งนำไปเพาะเป็นต้นกล้าได้ วิธีที่สองคือการขยายพันธุ์โดยแยกหน่อ วิธีนี้เป็นการขยายพันธุ์ที่ได้พันธุ์แท้ มีคุณสมบัติเหมือนต้นพ่อต้นแม่ทุกประการ แต่ต้นพันธุ์สามารถให้หน่อตลอดอายุได้เพียงเฉลี่ยประมาณ 20 หน่อ จึงไม่สามารถขยายพันธุ์ในปริมาณมากๆ อย่างรวดเร็วได้ และราคาหน่อพันธุ์มีราคาสูงกว่าต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิธีการนี้จะมีการลงทุนสูงที่สุด วิธีการสุดท้ายคือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะได้ต้นที่มีคุณสมบัติเหมือนต้นแม่พันธุ์ทุกประการ ผลผลิตที่ได้มี

คุณภาพสูงและสม่ำเสมอ สามารถขยายพันธุ์ได้ปริมาณมากและรวดเร็วเหมาะสำหรับการปลูกในเชิงพาณิชย์ แต่ต้องใช้เงินลงทุนมากกว่าการปลูกด้วยเมล็ด ปัจจุบันการปลูกในเชิงพาณิชย์ของต่างประเทศนิยมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถบริหารจัดการแปลงปลูกได้ดีกว่า ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพดีและสม่ำเสมอและให้ผลผลิตได้เร็ว สามารถปลูกได้ปริมาณมากตามต้องการและทุกฤดูกาลให้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูงในระยะเวลาสั้น แต่สำหรับในประเทศไทยยังอยู่ในขั้นตอนวิจัยและพัฒนายังไม่สามารถทำเป็นการค้าได้ ต้องสั่งจากต่างประเทศเท่านั้น สำหรับอินทผลัมสายพันธุ์ไทยมีชื่อว่า "พันธุ์KL1" ที่ได้เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์แลคเรตนัวของอิสราเอล กับพันธุ์บาไฮของจอร์แดน เป็นผลงานของนายศักดิ์ ลาจวน หรือที่รู้จักกันในนาม "โกหลัก" มีสถานปลูกแห่งแรกอยู่ที่อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นสวนแรกของประเทศไทยที่พัฒนาจนได้อินทผลัมคุณภาพดีส่งออกต่างประเทศ โดยสายพันธุ์นี้ให้ผลผลิตได้ในระยะเวลาเพียง 3 ปี แต่พันธุ์จากต่างประเทศจะใช้เวลานานถึง 4-7 ปี (วีรพันธุ์, 2556) อย่างไรก็ตามปัจจุบันประเทศไทยยังคงใช้ต้นกล้าจากการเพาะจากเมล็ดเนื่องจากมีราคาถูก แต่ยังประสบปัญหาการทราบเพศอยู่ บางสวนอาจใช้วิธีการดูเพศจากเมล็ดด้วยตาเปล่า ซึ่งอาจไม่ถูกต้องและแม่นยำ ดังนั้นเทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ใช้ในการคัดเลือกเพศของอินทผลัมให้แม่นยำได้ที่สุด

การแยกเพศอินทผลัมในการคัดเลือกหรือแยกตัวผู้ออกจากตัวเมีย ได้มีการศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเริ่มจากการวิเคราะห์และศึกษาความหลากหลายของพันธุ์อินทผลัมด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น amplified fragment length polymorphisms (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP), inter simple sequence repeat (ISSR), simple sequence repeat (SSR) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคแต่ละเทคนิคมีข้อจำกัดเกี่ยวกับค่าใช้จ่ายที่แตกต่างกัน ระดับของแถบดีเอ็นเอต่าง (polymorphism) ที่ได้ หรือแม้แต่ลักษณะของเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นแบบ dominance หรือ co-dominance สำหรับอินทผลัมแล้วเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นแบบ co-dominance เช่น เทคนิค SSR เป็นเทคนิคที่สามารถเติมเต็มความต้องการในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการทำ phylogeny มากที่สุด (Khanam *et al*., 2012) ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลแบบ dominance เช่น ISSR และ RAPD พบว่าเทคนิค ISSR จะให้ลักษณะแถบดีเอ็นต่างมากกว่าเทคนิค RAPD ให้แถบดีเอ็นเอต่าง 95.67 และ 92.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Marsafari and Mehrabi, 2013) สำหรับการแยกเพศอินทผาลัมนั้นต้องการเครื่องหมายโมเลกุลแบบ co-dominance เพราะเพศอินทผลัมเป็นแบบเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ดังนั้นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้จึงได้แก่ เทคนิค RFLP และ SSR มีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลแบบไมโครแซทเทลไลท์ในการจำแนกเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับเพศอินทผลัม จากต้นตัวผู้ 52 ต้น และต้นตัวเมีย 55 ต้น พบว่ามี 3 ยีนที่แสดงลักษณะแบบเฮเทอโรไซกัสที่สัมพันธ์กับโครโมโซม Y หรือต้นตัวผู้แยกออกมาอย่างชัดเจน สามารถแยกเพศได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Cherif *et al*., 2012) และมีการทดสอบไพรเมอร์แบบไมโครแซทเทลไลท์ 14 คู่สาย กับอินทผลัม 129 ตัวอย่าง จาก 34 สายพันธุ์ พบว่า สามารถแยกต้นตัวผู้ออกจากต้นตัวเมียได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบเฮเทอโรไซกัสขนาด 160/190 เบส เมื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ mPdCIR048 (Elmeer and Mattat, 2012) นอกจากนี้การใช้เทคนิค RFLP ในการหาความแตกต่างของเพศอินทผลัม พบว่า ให้ความรวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการแยกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Al-Mahmoud *et al*., 2012) ดังนั้นเพื่อพัฒนาการตรวจเพศให้เหมาะสมกับพันธุ์

อินทผลัมในประเทศไทย การทดลองนี้จึงได้ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกเพศอินทผลัมและพัฒนาวิธีการตรวจให้เหมาะสมและรวดเร็วยิ่งขึ้น

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล
2. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (QuantStudio5)
6. ชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)
7. เครื่องตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนพีซีอาร์ (QIAxcel Advanced System)
8. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

<u>วิธีดำเนินการ</u>

1. การทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจเพศอินทผลัม

1.1 การสกัดดีเอ็นเอของใบอินทผลัม

นำใบอินทผลัมที่ทราบเพศแล้วมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีของอรุโณทัย และคณะ (2552) ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2% (W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β-mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งใบอินทผลัม 5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAC 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่

ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer($(NH_4)_2SO_4$) 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง themal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 52-57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

1.3 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส (electropholesis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร บนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ (UV Transilluminators, BIORAD) และทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR ด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัม

2.1 การตรวจสอบเพศอินทผลัมโดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีลูกเหล็กแล้วเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการตัดใบอินทผลัมด้วยใบมีดผ่าตัดให้ได้ตัวอย่างละ 1x1 เซนติเมตร ลงในหลอด 2 มิลลิลิตร ที่มีลูกเหล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 2 ลูก เติมน้ำยา Sol^{n} 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วตีด้วยเครื่อง Precellys Evolution ยี่ห้อ Bertin technologies ที่ความเร็ว 4,500 5,000 6,000 และ 7,000 รอบต่อนาที แล้วนำมาเติมด้วยน้ำยา Sol^{n} 2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติม Sol^{n} 3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ 500 ไมโครลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพพานอลที่แช่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร นำไปแช่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จำนวน 2 รอบ ปล่อยให้ดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี Electrophoresis บนเจลอะกา

โรส (Agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1xTBE buffer แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง Ultraviolet ด้วยด้วยชุดถ่ายภาพ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder)

2.2 การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีไดเรกท์พีซีอาร์

- การตรวจสอบเพศอินทผลัมโดยการบดใบในสารละลายแล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

บดใบอินทผลัมขนาด 5x5 มิลลิเมตร ในสารละลาย Dilution buffer ของ Phire Plant Direct PCR Kit จากบริษัท Thermo scientific ปริมาตรตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ด้วย Phire Plant Direct PCR Kit (2x Phire Plant PCR buffer, 10 uM primer, Phire Hot Start II DNA polymerase) โดยใช้ไพรเมอร์ในตารางที่ 1 แล้วทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำขั้นที่ 2 จำนวน 35 รอบ)

ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจด้วยวิธี Electrophoresis บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1xTBE buffer แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง Ultraviolet ด้วยด้วยชุดถ่ายภาพ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

- การตรวจสอบเพศอินทผลัมจากใบด้วยวิธีไดเรกท์พีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบอินทผลัมขนาด 1x1 มิลลิเมตร ในน้ำยาที่เตรียมทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ด้วย Phire Plant Direct PCR Kit จาก Thermo scientific (2x Phire Plant PCR buffer, 10 uM primer, Phire Hot Start II DNA polymerase) โดยใช้ไพรเมอร์ในตารางที่ 1 แล้วทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำขั้นที่ 2 จำนวน 35 รอบ)

ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

แล้วนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจด้วยวิธี Electrophoresis บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1xTBE buffer แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide ส่องดูภายใต้แสง Ultraviolet ด้วยด้วยชุดถ่ายภาพ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.3 การตรวจสอบเพศด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM)

นำดีเอ็นเอของอินทผลัมเพศผู้และเพศเมียมาทดสอบปฏิกิริยา HRM ด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR โดยเตรียมน้ำยาการทำปฏิกิริยา ดังนี้ เติม MeltdoctorTM HRM master mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ความเข้มข้น 5 ไมโครโมล ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร น้ำ Deionized ปริมาตร 6.6 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (QuantStudio5) โดยตั้งโปรแกรม HRM ดังนี้

สถานะ	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	Ramp rate
Holding	Enzyme activation	95 ^{0}C	10 นาที	100%
Cycling (40 cycles)	Denature	95 ^{0}C	15 วินาที	100%
	Anneal/extend	60 ^{0}C	1 นาที	100%
Melt Curve	Denature	95 ^{0}C	15 วินาที	100%
	Anneal	60 ^{0}C	1 นาที	100%
	High resolution melting	95 ^{0}C	15 วินาที	1%
	Anneal	60 ^{0}C	15 วินาที	100%

เมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงแล้วนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1 ของ Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน MAD และชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511

นำดีเอ็นเออินทผลัมที่ทราบเพศแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับยีน MAD ด้วยไพรเมอร์ DPshellF และ DPshellR สำหรับชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ด้วยไพรเมอร์ PDK30sF และ PDK30sR โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer($(NH_4)_2SO_4$) 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง themal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส (electropholesis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Primer name	Primer Sequence (5'-3')	Tm (^{0}C)	Description	References
DpDOAF	TGCATACTAGTTGTATTGCGGCAATA	54.8	ใช้แยกเพศอินทผลัม	-
DpDOAR	CATACTTGGTGCACGGATCTCTAA	55.7	ใช้แยกเพศอินทผลัม	-
PDK30sF	ACTTCTGCTACCTCTACTTGCATGT	56.0	ใช้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ อ้างอิง และใช้วิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์	-
PDK30sR	CAAACCACCTCACAACAAGAAGGAA	56.0	ใช้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ อ้างอิง และใช้วิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์	-
PH01F	GCATTAGCACCATAGTAAATTGT	49.9	ใช้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ อ้างอิง	นพรัตน์ และคณะ (2558)
PH01R	GTCCCAATCAGAGTGCACTCAA	54.8	ใช้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ อ้างอิง	นพรัตน์ และคณะ (2558)
PH02F	GCAATAGCACCATAGTAAATTGCCT	54.4	ใช้แยกเพศอินทผลัม	นพรัตน์ และคณะ (2558)
PH03R	CTAACTTGGTGCACGGATCTCA	54.8	ใช้แยกเพศอินทผลัม	นพรัตน์ และคณะ (2558)
mPdCIR048F	CGAGACCTACCTTCAACAAA	49.7	ใช้แยกเพศอินทผลัมแบบ เทคนิค SSR	Billotte และคณะ (2004)
mPdCIR048R	CCACCAACCAAATCAAACAC	49.7	ใช้แยกเพศอินทผลัมแบบ เทคนิค SSR	Billotte และคณะ (2004)
Ubi_F	AAGGAGTGCCCCAACGCCGAGTG	62.2	ใช้เป็นยีนอ้างอิง	Yu และคณะ (2008)
Ubi_R	GCCTTCTGGTTGTAGACGTAGGTGAG	61.1	ใช้เป็นยีนอ้างอิง	Yu และคณะ (2008)
DPshellF	GTGAAGGTTTAGGTCATGTTGGTC	55.7	ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	หทัยรัตน์ และคณะ (2560)
DPshellR	TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC	56.0	ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	หทัยรัตน์ และคณะ (2560)
DpHRMF	ACTTCTGCTACCTCTACTTGCATGT	56.0	ใช้วิเคราะห์ HRM	-
DpHRMR	GCTTGGGGTTGAGGTGATAA	51.8	ใช้วิเคราะห์ HRM	-

<u>ระยะเวลาการทดลอง</u> (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558 รวม 2 ปี

<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>

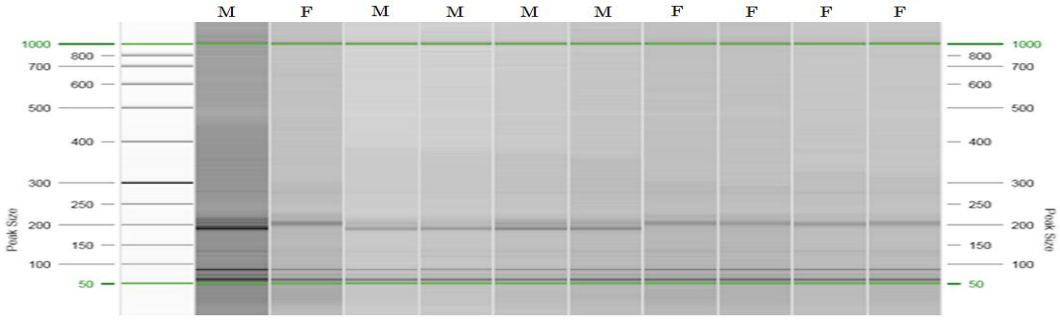
ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

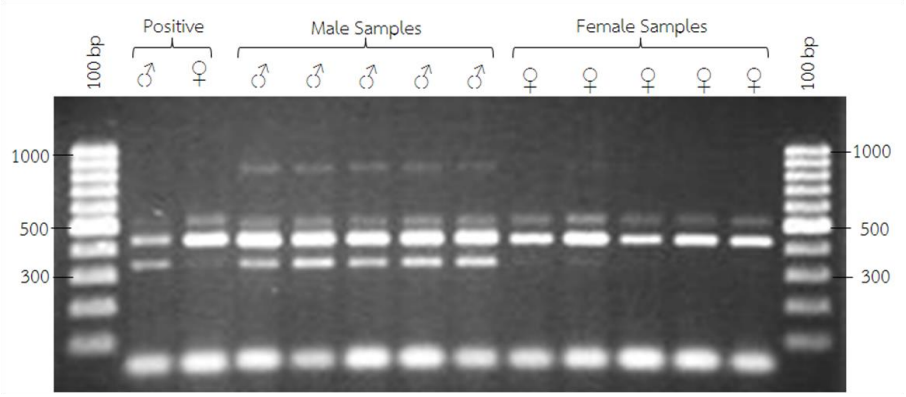
1. การทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจเพศอินทผลัม

การทดสอบไพรเมอร์ตามที่รายงานไว้ จำนวนทั้งสิ้น 39 คู่ กับต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้วและปลูกจากเมล็ดในประเทศไทย ซึ่งเป็นพันธุ์ KL1 หรือพันธุ์แม่โจ้ 36 หรือเป็นลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ดังกล่าว จากการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์ SSR จากรายงานของ Billotte และคณะ (2004) จำนวน 16 คู่ Elmeer และ Mattat (2012) จำนวน 14 คู่ ไพรเมอร์ และ Cherif และคณะ (2013) จำนวน 1 คู่ รวมถึงไพรเมอร์ RAPD และ SCAR ของ Dhawan และคณะ (2013) จำนวน 2 คู่ ไม่สามารถแยกเพศตัวอย่างอินทผลัมได้เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ซึ่งสอดคล้องกับนพรัตน์ และคณะ (2558) ที่รายงานว่าไพรเมอร์ RAPD และ SCAR ของ Dhawan และคณะ (2013) ไม่สามารถแยกเพศอินทผลัมสายพันธุ์ไทย (แม่โจ้ 36) ได้ แต่ไพรเมอร์ mPdCIR04 ตามรายงานของ Elmeer และ Mattat (2012) สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System (ภาพที่ 1) ส่วนรายงานของนพรัตน์ และคณะ (2558) ใช้ไพร์เมอร์แบบเฉพาะเจาะจงกับต้นอินทผลัมเพศผู้ ร่วมกับไพรเมอร์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเออ้างอิงที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่าง เมื่อทำการเพิ่มปริมาณโดยการทำพีซีอาร์แบบรวม (multiplex PCR) จะได้ดีเอ็นเอสองแถบในต้นตัวผู้และได้เพียงหนึ่งแถบในต้นตัวเมีย (ภาพที่ 2) และรายงานของ Al-Mahmoud และคณะ (2012) ใช้เทคนิค PCR-RFLP จำนวน 5 คู่ไพรเมอร์ เนื่องจากการตรวจสอบเพศโดยวิธีนี้มีความยุ่งยากหลายขั้นตอน ต้องทำการตัดด้วยเอ็นไซม์ภายหลังจากการได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ การทดลองนี้จึงได้ออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะกับตำแหน่ง SNPs ที่สัมพันธ์กับเพศขึ้นมาใหม่ พบว่า สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ คือ ไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR จะได้แถบดีเอ็นเอประมาณ 450 เบส เมื่อทำพีซีอาร์แบบรวมร่วมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือยีนอ้างอิง ผลที่ได้จะมองเห็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสองแถบในเพศผู้และหนึ่งแถบในเพศเมีย สามารถใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเออ้างอิงที่ใช้ไพรเมอร์ PDK30sF และ PDK30sR ให้ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 700 เบส (ภาพที่ 3) หรือยีนอ้างอิงได้แก่ไพรเมอร์ Ubi_F และ Ubi_R ขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 200 เบส (ภาพที่ 4) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับไพรเมอร์ของนพรัตน์ และคณะ (2558) เช่นกัน

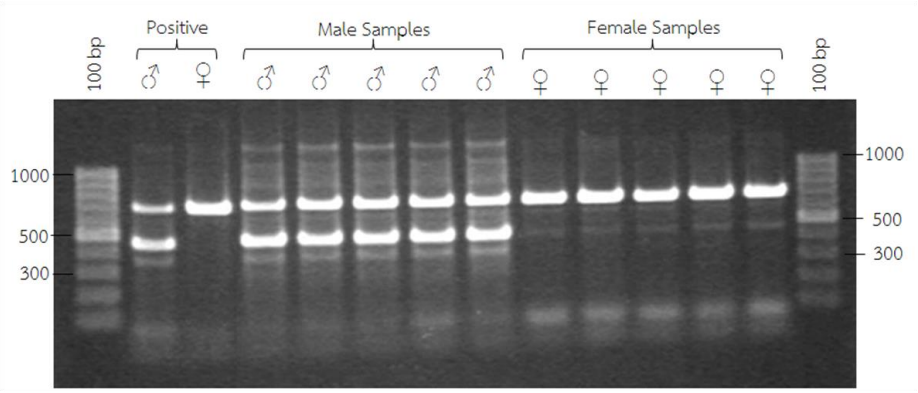
จากการทดสอบไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ จึงถูกนำมาตรวจสอบความแม่นยำกับต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้วจำนวน 169 ต้น โดยทำการตรวจสอบพร้อมกันกับไพรเมอร์ของนพรัตน์ และคณะ (2558) พบว่า ผลการตรวจด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไม่ตรงกับเพศจำนวน 8 ต้น คิดเป็นร้อยละ 4.7 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR มีความแม่นยำตรงตามเพศคิดเป็น 95.3 เปอร์เซ็นต์ ของการตรวจเพศอินทผลัมทั้งหมด (ตารางภาคผนวกที่ 1)



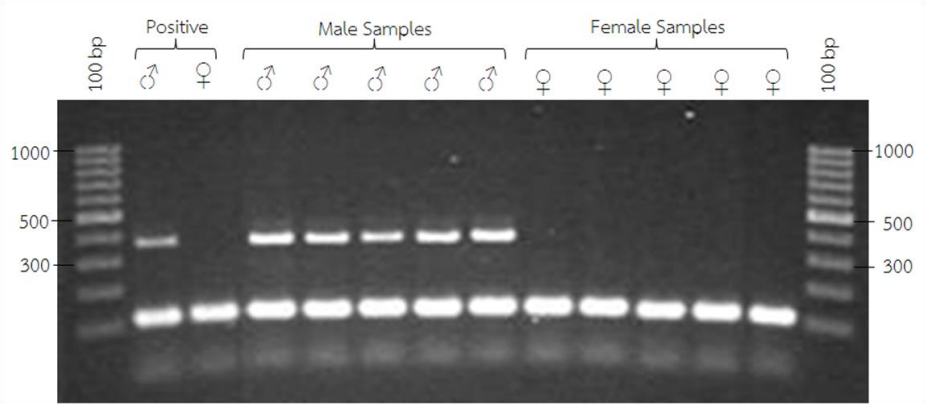
ภาพที่ 1 การทดสอบไพรเมอร์ mPdCIR04 ตามรายงานของ Elmeer และ Mattat (2012)



ภาพที่ 2 การทดสอบไพรเมอร์ PH01F PH01R PH02F และ PH03R โดยการทำพีซีอาร์แบบรวม ตามรายงานของนพรัตน์ และคณะ (2558)



ภาพที่ 3 การทดสอบไพรเมอร์ DpDOAF DpDOAR PDK30sF และ PDK30sR โดยการทำพีซีอาร์แบบรวม

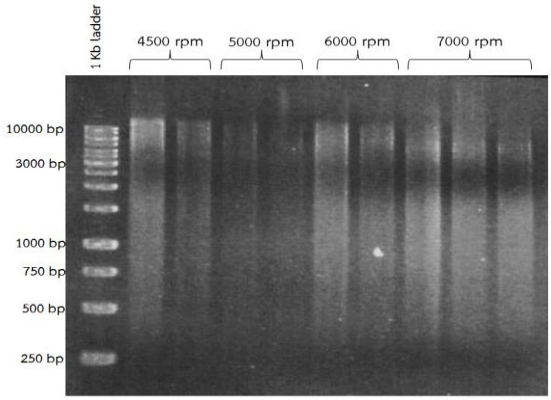


ภาพที่ 4 การทดสอบไพรเมอร์ DpDOAF DpDOAR Ubi_F และ Ubi_R โดยการทำพีซีอาร์แบบรวม

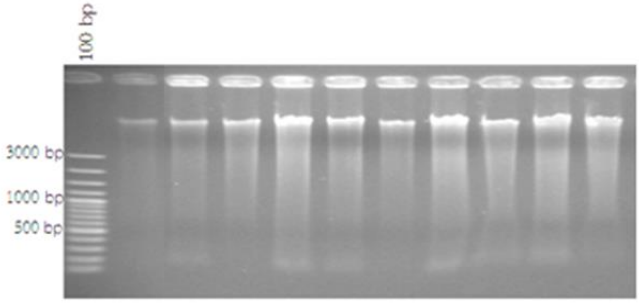
2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัม

2.1 การตรวจสอบเพศอินทผลัมโดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยลูกเหล็กแล้วเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์

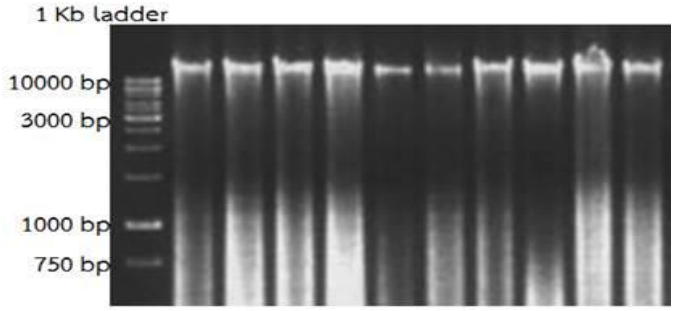
การสกัดดีเอ็นเอจากใบอินทผลัมด้วยการตีลูกเหล็กที่ความเร็ว 4,500 5,000 6,000 และ 7,000 รอบต่อนาที พบว่า การตีที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เหมาะสมกับใบอินทผลัมที่สุด ส่วนความเร็วที่ 5,000 6,000 และ 7,000 รอบต่อนาที พบดีเอ็นเอมีการฉีกขาดมากขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 5) การเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นด้วยวิธีตีลูกเหล็กกับวิธี CTAB พบว่า ปริมาณดีเอ็นที่ได้จากการสกัดด้วยการตีลูกเหล็กมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอ 317.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ (A260/A280) ที่ 1.868 และการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB มีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอ 2408 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ (A260/A280) ที่ 1.886 (ตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่าปริมาณดีเอ็นเอจากวิธี CTAB มีมากกว่าวิธีการตีด้วยลูกเหล็ก แต่มีความบริสุทธิ์ไม่แตกต่างกัน เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์จะเห็นว่า การสกัดด้วยวิธี CTAB (ภาพที่ 6) มีการฉีกขาดของดีเอ็นเอน้อยกว่าวิธีการตีลูกเหล็ก (ภาพที่ 7) แต่ยังคงได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ปริมาณมาก ทั้งนี้การตรวจสอบเพศอินทผลัมใช้ดีเอ็นเอในการเพิ่มปริมาณเพียงแค่ 50 นาโนกรัม 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ซึ่งเพียงพอต่อการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการสกัดที่สั้นและได้จำนวนตัวอย่างต่อวันมากกว่า ดังนั้นวิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีลูกเหล็กจึงเหมาะสมต่อการตรวจเพศอินทผลัมมากกว่าการสกัดด้วยวิธี CTAB



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอด้วยลูกเหล็กที่ความเร็วรอบ 4,500 5,000 6,000 และ 7,000 รอบต่อนาที บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 6 ดีเอ็นเออินทผลัมที่สกัดด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก อรุโณทัย และคณะ (2552) บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 ดีเอ็นเออินทผลัมที่สกัดด้วยสกัดด้วยการตีลูกเหล็ก บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

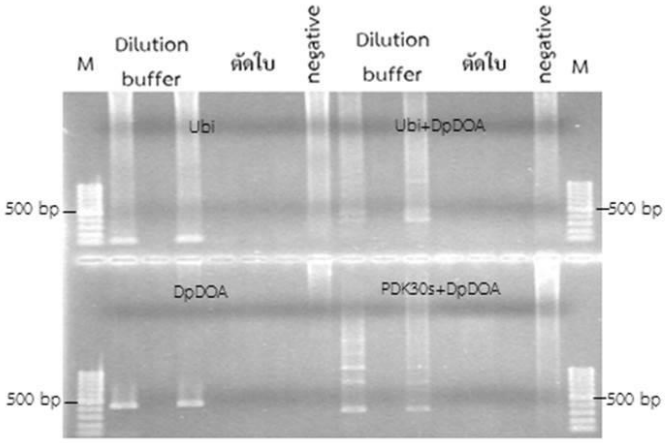
ตารางที่ 2 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากใบอินทผลัมที่สกัดด้วยวิธีตีลูกเหล็กและวิธี CTAB

No.	การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีตีลูกเหล็ก		การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB	
	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul)	ความบริสุทธิ์ (A260/A280)	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul)	ความบริสุทธิ์ (A260/A280)
1	200	1.814	1187	1.921
2	451	2.014	1578	1.866
3	218	1.775	1783	1.822
4	478	1.817	2241	1.978
5	336	1.914	3132	1.926
6	103	1.794	1933	1.811
7	386	1.934	2806	1.886
8	285	1.883	2779	1.964

9	367	1.947	3420	1.881
10	353	1.786	3221	1.803
ค่าเฉลี่ย	**317.7**	**1.868**	**2408**	**1.886**

2.2 การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีไดเรกท์พีซีอาร์

การตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีไดเรกท์พีซีอาร์ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงจากใบอินทผลัม โดยไม่ต้องสกัดดีเอ็นเอ เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการตรวจเพศ จากการบดตัวอย่างใบอินทผลัมกับ dilution buffer ของ Phire Plant Direct PCR Kit และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบขนาด 1x1 มิลลิเมตร พบว่า การตัดตัวอย่างใบอินทผลัมมาทำไดเรกท์พีซีอาร์ ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ สำหรับการบดตัวอย่างด้วย dilution buffer สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แบบไพรเมอร์คู่เดียว คือ ไพรเมอร์ Ubi หรือ DpDOA แต่ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบรวมไพรเมอร์ได้ (ภาพที่ 8) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุด Phire Plant Direct PCR Kit นั้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีไดเรกท์พีซีอาร์ แต่ยังไม่เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์แบบรวมได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีการพัฒนาเอ็นไซม์อีกหลายยี่ห้อสำหรับการเพิ่มปริมาณไดเรกท์พีซีอาร์แบบรวม (multiplex direct PCR) ซึ่งอาจต้องทำการทดลองในส่วนของชนิดเอ็นไซม์ต่อไป

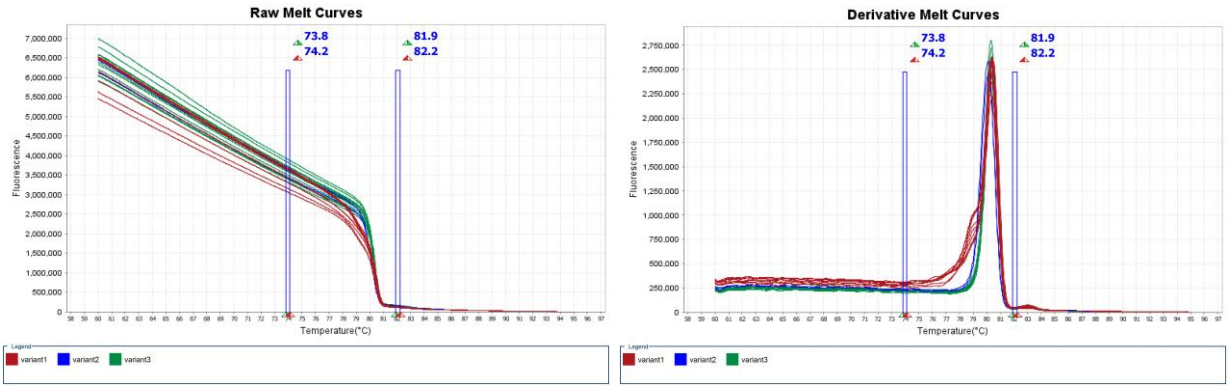


ภาพที่ 8 การเพิ่มการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการไดเรกพีซีอาร์ (Direct PCR)

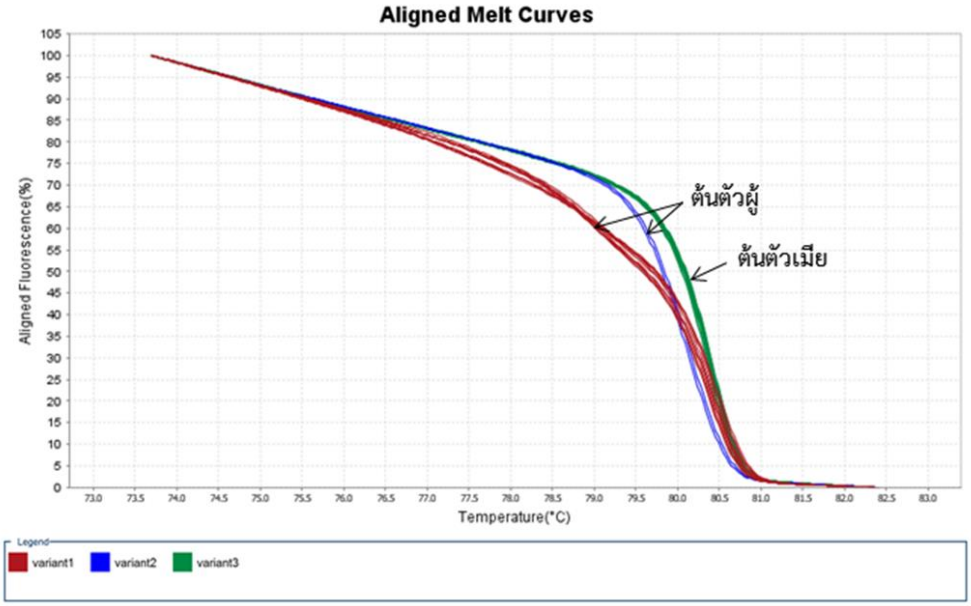
2.3 การตรวจสอบเพศด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM)

เทคนิค High Resolution Melting (HRM) เป็นวิธีการตรวจสอบอุณหภูมิในขณะที่มีการแยกสายกันของดีเอ็นเอสายคู่ (double stand DNA) เมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันก็จะได้ค่าอุณหภูมิที่ต่างกันด้วย ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบการกลายของลำดับสารพันธุกรรมได้ และนิยมใช้ตรวจสอบตัวอย่างที่มีจำนวนมากแบบ High Throughput (Lehmensick et al., 2008) จากการตรวจสอบเพศอินทผลัมจากตัวอย่างต้นตัวผู้และต้นตัวเมียอย่างละ 12 ต้น ผลที่ได้จากเครื่อง real-time PCR จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1 พบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR มีค่าการหลอมละลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ในช่วง 74.2-82.2 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 9) เมื่อเปรียบเทียบเส้นกราฟ

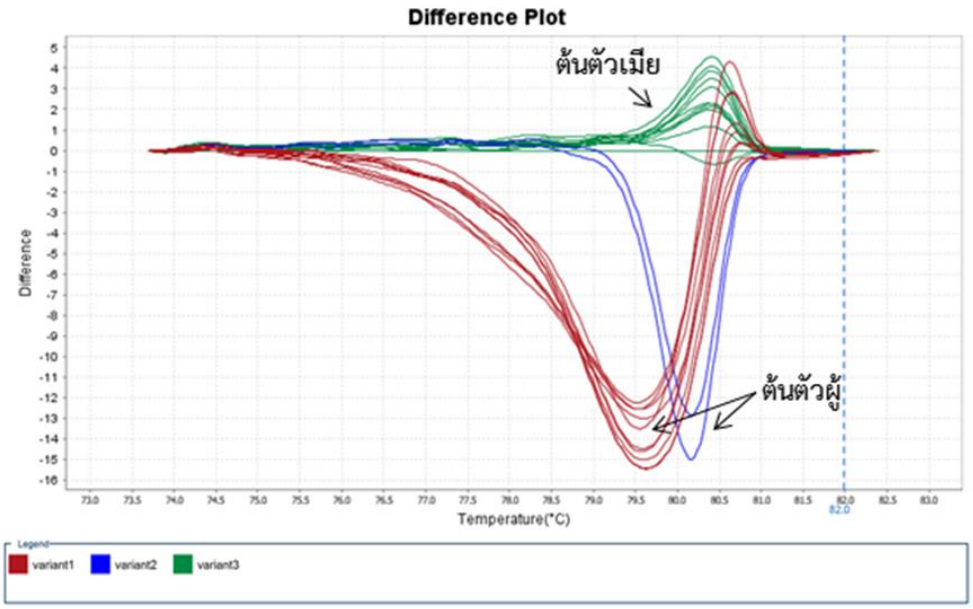
Aligned Melt Curves จะเห็นว่าต้นตัวผู้แสดงเส้นกราฟสองเส้น แต่ต้นตัวเมียสามารถแยกออกจากต้นตัวผู้ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 10) เมื่อโปรแกรมคำนวณเส้นกราฟ Difference Plot พบว่า ต้นอินทผลัมตัวผู้มีค่าติดลบที่แตกต่างกับต้นตัวเมียอย่างชัดเจนเช่นกัน (ภาพที่ 11) เมื่อทำการวิเคราะห์ค่า variant พบว่า ไพรเมอร์ DpHRM สามารถแบ่งกลุ่ม variant ได้ 3 variant ต้นตัวผู้จะถูกแยกออกเป็น 2 variant โดยค่าอุณหภูมิกลุ่ม variant ที่ 1 อยู่ที่ 79.7-79.8 องศาเซลเซียส variant ที่ 2 มีค่า 80.2 องศาเซลเซียส มีค่า Difference อยู่ระหว่าง -12.1 ถึง -14.6 และ -12.5 ถึง -14.6 ตามลำดับ ส่วนต้นตัวเมียจะถูกแยกเป็น variant ที่ 3 ซึ่งแยกออกจากกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน โดยมีอุณหภูมิอยู่ที่ 80.5-80.6 องศาเซลเซียส และมีค่า Difference อยู่ระหว่าง -0.6 ถึง 4.2 (ตารางที่ 3) จะเห็นได้ว่าเทคนิค HRM สามารถแยกเพศอินทผลัมต้นตัวผู้และต้นตัวเมียออกจากกันได้อย่างชัดเจน ถึงแม้ว่าต้นตัวผู้จะแบ่งออกเป็น 2 variant ก็ตาม ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจสอบเพศอินทผลัมที่มีจำนวนตัวอย่างมากได้โดยไม่ต้องเสียเวลาในการตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส สามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบลงได้



ภาพที่ 9 แผนภาพ Raw Melt Curves และ Derivative Melt Curves ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1



ภาพที่ 10 แผนภาพ Aligned Melt Curves ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1



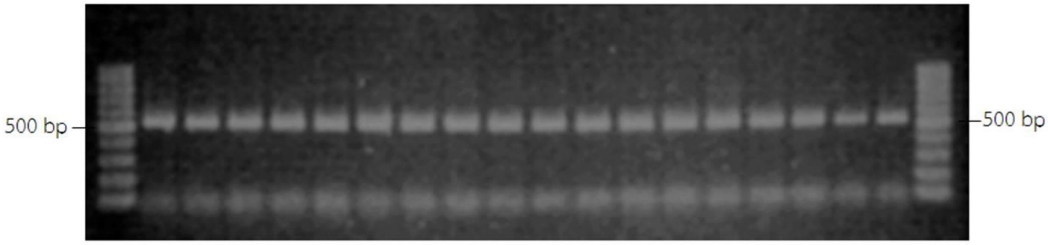
ภาพที่ 11 แผนภาพ Difference Plot ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ค่า Variant ชิ้นส่วนดีเอ็นของอินทผลัมเพศผู้และเพศเมียด้วยโปรแกรม High Resolution Melt Software v3.1

Variant	Sample No.	Sex	Temperature	Difference
1	1	Male	79.7	-13.0
1	2	Male	79.8	-14.8
1	3	Male	79.7	-14.3
1	4	Male	79.7	-14.3
1	5	Male	79.7	-12.1
1	6	Male	79.7	-15.3
1	8	Male	79.8	-12.3
1	9	Male	79.8	-15.2
1	10	Male	79.7	-12.7
2	11	Male	80.2	-12.5
2	12	Male	80.2	-14.6
3	1	Female	80.6	1.8
3	2	Female	80.6	2.7
3	3	Female	80.5	3.2
3	4	Female	80.5	-0.6
3	5	Female	80.6	1.0
3	6	Female	80.5	4.2
3	7	Female	80.5	3.8
3	8	Female	80.9	0.0
3	9	Female	80.5	1.8
3	10	Female	80.5	2.1
3	11	Female	80.6	3.4
3	12	Female	80.5	2.0

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน MAD และชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน MAD และชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ในอินทผลัมจากตัวอย่างต้นตัวผู้ 10 ตัวอย่าง และต้นตัวเมีย 10 ตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและข้อมูลเครื่องหมาย SNPs ที่สัมพันธ์กับต้นตัวผู้หรือต้นตัวเมีย พบว่า จากตัวอย่างยีน MAD ขนาดประมาณ 540 เบส (ภาพที่ 12) เมื่อนำไปวิเคราะห์



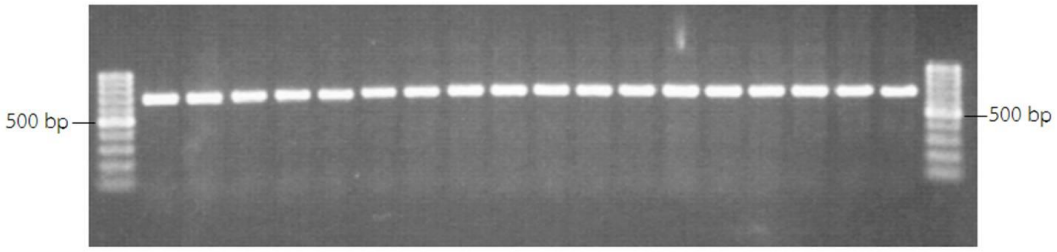
ภาพที่ 12 ภาพชิ้นส่วนยีน MAD ของอินทผลัม ขนาดประมาณ 540 เบส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

```
DPMALE2         CATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPMALE4         CATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE2       CATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE5       GATTTATATTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE6       GATTTATATTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPMALE3         GATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE7       CATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPFEMALE1       CATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
DPMALE1         CATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAG
                 ****** ***************************************************

DPMALE2         CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPMALE4         CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE2       CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE5       CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE6       CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPMALE3         CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE7       CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPFEMALE1       CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
DPMALE1         CAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGA
                ************************************************************

DPMALE2         ACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCT
DPMALE4         ACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCT
DPFEMALE2       ACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCT
DPFEMALE5       ACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCT
DPFEMALE6       ACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCT
DPMALE3         ACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCT
DPFEMALE7       ACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCT
DPFEMALE1       ACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCT
DPMALE1         ACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCT
                ************************************************************

DPMALE2         ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPMALE4         ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE2       ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE5       ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE6       ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPMALE3         ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE7       ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPFEMALE1       ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
DPMALE1         ATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCC
                ************************************************************

DPMALE2         GCCTCTATGAGTACCCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATT
DPMALE4         GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATT
DPFEMALE2       GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATT
DPFEMALE5       GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATT
DPFEMALE6       GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATT
DPMALE3         GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATT
DPFEMALE7       GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATT
DPFEMALE1       GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATT
DPMALE1         GCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATT
                ************** *********************************************

DPMALE2         TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
ELAM4           TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE2       TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE5       TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE6       TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPMALE3         TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE7       TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPFEMALE1       TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
DPMALE1         TGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATT
```

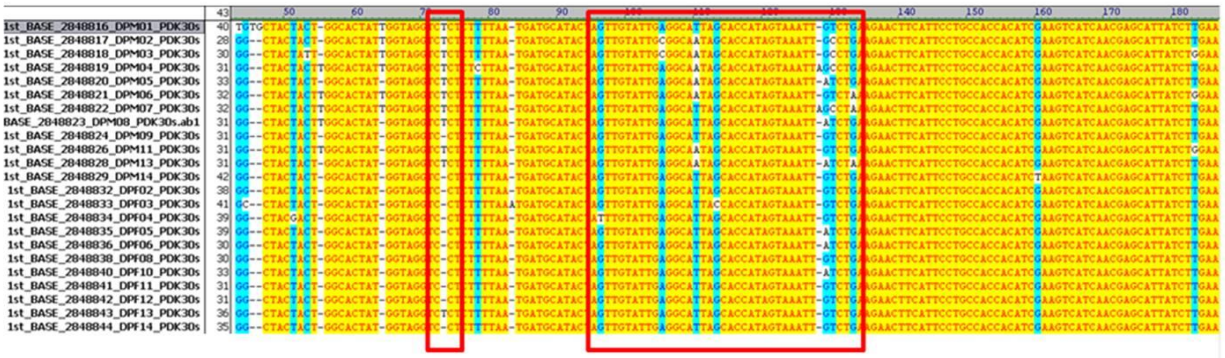
```
                    ************************************************************

DPMALE2             CTTTTTAAGTTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPMALE4             CTTTTTAAGTTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE2           CTTTTTAAGTTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE5           CTTTTTAAGGTTCTAGCTTGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE6           CTTTTTAAGGTTCTAGCTTGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPMALE3             CTTTTTAAGGTTCTAGCTTGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE7           CTTTTTAAGTTTCTAGCTTGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPFEMALE1           CTTTTTAAGGTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
DPMALE1             CTTTTTAAGGTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCT
                    ********* ******* ****************************************
```

ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MAD ในอินทผลัมต้นตัวผู้และตัวเมีย โดยวิธีการ Multiple Sequence Alignment ด้วยเว็บไซด์ Clustal Omega

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพภาคผนวก 1 และ 2) ด้วยเว็บไซด์ Clustal Omega ไม่พบเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่สัมพันธ์กับอินทผลัมต้นตัวผู้และต้นตัวเมีย (ภาพที่ 13) สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนโครโมโซมของอินทผลัม โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ของอินทผลัมเพศผู้และเพศเมียขนาดประมาณ 700 เบส (ภาพที่ 14) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพภาคผนวก 3 และ 4) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม VectorNTI (ภาพที่ 15) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าสนใจจากชิ้นส่วนนี้อยู่หลายตำแหน่งที่อาจสัมพันธ์กับการตรวจเพศอินทผลัม ซึ่งจากการทดสอบไพรเมอร์ DpHRM ในการทดลองที่ 2.3 พบว่าสามารถใช้แยกเพศด้วยเทคนิค HRM ได้



ภาพที่ 14 ภาพชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ของอินทผลัม ขนาดประมาณ 700 เบส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ในอินทผลัมต้นตัวผู้และตัวเมีย โดยวิธีการ Multiple Sequence Alignment ด้วยโปรแกรม VectorNTI

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดสอบไพรเมอร์ตามที่รายงานไว้ จำนวนทั้งสิ้น 39 คู่ กับต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้ว พบว่า ไพรเมอร์ SSR ของ Billotte และคณะ (2004) Elmeer และ Mattat (2012) และ Cherif และคณะ (2013) รวมถึงไพรเมอร์ RAPD และ SCAR ของ Dhawan และคณะ (2013) ไม่สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ แต่ไพรเมอร์ mPdCIR04 สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System เมื่อออกแบบไพร์เมอร์แบบจำเพาะกับตำแหน่ง SNPs ที่สัมพันธ์กับเพศตามรายงานของ Al-Mahmoud และคณะ (2012) สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ คือ ไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะต้นตัวผู้ มีขนาดประมาณ 450 เบส เมื่อทำพีซีอาร์แบบรวมไพรเมอร์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสองแถบในเพศผู้ และหนึ่งแถบในเพศเมีย สำหรับการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลกับต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้วจำนวน 169 ต้น พบว่า ผลการตรวจด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไม่ตรงกับเพศจำนวน 8 ต้น คิดเป็นร้อยละ 4.7 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากไพรเมอร์ DpDOAF และ DpDOAR มีความแม่นยำตรงตามเพศคิดเป็น 95.3 เปอร์เซ็นต์

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพศอินทผลัม พบว่า การตรวจสอบเพศอินทผลัมโดยการสกัดดีเอ็นเอที่ตีด้วยลูกเหล็กที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เหมาะสมกับใบอินทผลัมที่สุด ปริมาณดีเอ็นที่ได้จากการสกัดด้วยการตีลูกเหล็กมีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอ 317.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ (A260/A280) ที่ 1.868 และการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB มีค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอ 2408 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ (A260/A280) ที่ 1.886 ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอจากวิธี CTAB มีมากกว่าวิธีการตีด้วยลูกเหล็ก แต่มีความบริสุทธิ์ไม่แตกต่างกัน การสกัดดีเอ็นด้วยการตีลูกเหล็กจึงเพียงพอต่อการตรวจสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ และยังใช้เวลาในการสกัดที่สั้นและได้จำนวนตัวอย่างต่อวันมากกว่า ดังนั้นวิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีลูกเหล็กจึงเหมาะสมต่อการตรวจเพศอินทผลัมมากกว่าการสกัดด้วยวิธี CTAB สำหรับการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีไดเรกท์พีซีอาร์ พบว่า การตัดตัวอย่างใบอินทผลัมมาทำ direct PCR ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่การบดตัวอย่างด้วย dilution buffer สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แบบไพรเมอร์คู่เดียว ไม่สามามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบรวมไพรเมอร์ได้ ส่วนการตรวจสอบเพศด้วยวิธี High Resolution Melting (HRM) พบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ DpHRMF และ DpHRMR มีค่าการหลอมละลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ในช่วง 74.2-82.2 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์ค่า variant สามารถแบ่งกลุ่ม variant ได้ 3 variant ต้นตัวเมียจะถูกแยกเป็น variant ที่ 3 ซึ่งแยกออกจากกลุ่มที่ 1 และ 2 อย่างชัดเจน โดยมีอุณหภูมิอยู่ที่ 80.5-80.6 องศาเซลเซียส และมีค่า Difference อยู่ระหว่าง -0.6 ถึง 4.2 ซึ่งเทคนิค HRM สามารถแยกเพศอินทผลัมต้นตัวผู้และต้นตัวเมียออกจากกันได้อย่างชัดเจน

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน MAD และชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 พบว่า ยีน MAD ขนาดประมาณ 540 เบส ไม่พบเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่สัมพันธ์กับอินทผลัมต้นตัวผู้และต้นตัวเมีย และชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ของอินทผลัมขนาดประมาณ 700 เบส มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าสนใจ

จากชิ้นส่วนนี้อยู่หลายตำแหน่งที่อาจสัมพันธ์กับการตรวจเพศอินทผลัม ซึ่งจากการทดสอบไพรเมอร์ พบว่าสามารถใช้แยกเพศด้วยเทคนิค HRM ได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

นักวิชาการ อาจารย์ นักศึกษา เกษตรกรผู้ปลูกอินทผลัม และผู้ที่สนใจ สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ออกแบบได้จากการทดลองนี้ไปใช้ในการตรวจเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้า เพื่อสามารถวางผังการปลูกต้นอินทผลัมให้เหมาะสม ลดค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาต้นตัวผู้ที่ไม่ต้องการ โดยสามารถเลือกเทคนิคการตรวจได้สองเทคนิคคือการตรวจด้วยการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์แล้วตรวจสอบด้วยเจลอะกาโรสซึ่งมีต้นทุนต่ำกว่า และเทคนิค HRM ที่ต้องใช้เครื่อง Real-time PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและปริมาณตัวอย่างที่มากกว่า

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผชช.ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และนางสุรภี กีรติยะอังกูร ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตร ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างดีเอ็นเออินทผลัมในการตรวจเพศ และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ สวนอินทผลัมคุณอนุรักษ์ คุณโกหลัก และคุณเด่น ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างใบอินทผลัมที่ทราบเพศแล้วสำหรับใช้ในการศึกษาทดลอง

12. เอกสารอ้างอิง

จารุฉัตร เขนยทิพย์. 2558. วิจัยและพัฒนาพันธุ์อินทผลัม. รายงานโครงการวิจัย กรมวิชาการเกษตร. 26 หน้า.

นพรัตน์ อินถา, กวี สุจิปุลิ, ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์ และ พีระศักดิ์ ฉายประสาท.2558. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการจำแนกเพศอินทผลัมไทย (แม่โจ้36). วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 33 ฉบับพิเศษ 1 การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 14 “พืชสวนไทยไร้พรมแดน”. หน้า 68-73.

วีรพันธ์ นิลวัตร. 2556. การปลูกอิทผาลัม สไตล์ไทยไทย. ศูนย์ปฏิบัติการข่าวเกษตร สำนักงานเกษตรจังหวัดนราธิวาส ศูนย์ราชการ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส. 3 หน้า.

หทัยรัตน์ อุไรรงค์, อรรัตน์ วงศ์ศรี และนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ. 2560. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 35 ฉบับที่ 2.หน้า 1-8.

อรุโณทัย ซาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, อัญชลี ศรีสุวรรณ, ประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.

Al-Mohmoud M.E., E.K. Al-Dous. E.K. Al-Azwani and J.A. Malek. 2012. DNA-based assays to distinguish date palm (Arecaceae) gender. American Journal of Botany. e7-e10

Billotte, N., N. Marseillac, P. Brottier, J.L. Noyer, J.P. Jacquemoud-Collet, C. Moreau, T. Couvreur, M.H. Chevallier, J.C. Pintaud and A.M. Risterucci. 2004. Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. Molecular Ecology Notes 4: 256-256.

Cherif E., S. Zehdi, K. Castillo, N. Chabrillange, S. Abdoulkader, J.C. Pintaud, S. Santoni, A. Salhi-Hannachi, S. Glemin and F. Aberlenc-Bertossi. 2012. Male-specific DNA markers provide genetic evidence of XY chromosome system, a recombination arrest and allow the tracing of paternal lineages in date palm. New Phytologist 197: 409-415.

Elmeer K. and I. Mattat. 2012. Marker-asisted sex differentiation in date palm using simple sequence repeats. Biotech 2: 241-247.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Worldwide dates production statistics. Last update 15 December 2017. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC

Khanam S., A. Sham, J.L. Bennetzen and M.A.M. Aly. 2012. Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Australian Journal of Crop Science 6(8): 1236-1244.

Lehmensick, A., M.W. Sutherland and R.B. McNamora. 2008. The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. Theor Appl Genet 117:721–728.

Marsafari M. and A.A. Mehrabi. 2013. Molecular identification and genetic diversity of Iranian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR and RAPD markers. Australian Journal of Crop Science 7(8): 1160-1166.

Wellmann A.P, A.H. Escobar and D.V. Johnson. 2007. Date palm cultivation in Chile and Peru (South America): current status and future prospects for development. Acta Hort 736: 71-85.

Wrigley G. 1995. Date palm, *Phoenix dactylifera*. In: Smartt J, Simmonds NW (eds), Evolution of crop plants, 2nd ed. Longman, London: pp. 399-403.

Yu, F., H. Harada, K. Yamasaki, S. Okamoto, S. Hirase, Y. Tanaka, N. Misaw and R. Utsumi. 2008. Isolation and functional characterization of a β-eudesmol synthase, a new sesquiterpene synthase from Zingiber zerumbet Smith. FEBS Letters 582(5): 565-572.

13. ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายสำหรับการสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีลูกเหล็ก

Sol^{n}1

30 mM	Tris-HCl pH 8.0
0.1 M	NaCl
0.2 M	Sucrose
10 mM	EDTA

Sol^{n}2

400 mM	Tris-HCl pH 9.2
250 mM	EDTA
2.5%	SDS

Sol^{n}3 (ปริมาตร 400 ml)

240	ml	(5M KOAC)
46	ml	(96% Acetic acid)
114	ml	(ddH2O)

```
>DpMale1
AGGTCATGTTGGTCCCGTTATTTCATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCTTCGTTCTTGGCAATCTAGATCAA
CTTCAGCAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCAAGAGGATCGAGAACACCACAAGC
CGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCTATGAATTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGA
GGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAACAGGTATGAGGTTATTATGATGT
CTTCTCTTCCTAATTTGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTTGTTCTATGGCCAAGCCAAATTCT
TTTTAAGGTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTTCCCTTTTATCCCTGATCCAAAA
```

ภาพภาคผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MAD ในอินทผลัมต้นตัวผู้

```
>DpFemale1
AAACATGTCATATGTGCAGGTTTATGTCATGTTGGTCCCGTTATTTCATTTATGTTTTAGAAAACTTTTTTTTTTCT
TCGTTCTTGGCAATCTAGATCAACTTCAGCAGATAGAGGAGAAAGAGAGATCATGGGGAGGGGAAAGATTGAGATCA
AGAGGATCGAGAACACCACAAGCCGGCAGGTCACTTTCTGCAAGCGCCGAAATGGACTGCTGAAAAAAGCCTATGAA
TTGTCCGTCCTTTGTGATGCTGAGGTTGCCCTTATCGTCTTCTCCAGCCGGGGCCGCCTCTATGAGTACGCCAATAA
CAGGTATGAGGTTATTATGATGTCTTCTCTTCCTAATTTGCTCATCCCTTCTGATATCGAGTTTTATGGCTTTATTT
GTTCTATGGCCAAGCCAAATTCTTTTTAAGGTTCTAGCATGTTAGTGATTGAAGTATTGCTCCTCTTTCATATGCTT
CCCTTTTATCCCTGATCCAAAAA
```

ภาพภาคผนวกที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MAD ในอินทผลัมต้นตัวเมีย

```
TGTTATTTTTTTTAAATCATGTCTTTTAGGACTACGTTTTGTGCTACTACTGGCACTATTGGTAGGTCTCTCTTTTA
ATGATGCATACTAGTTGTATTGAGGCATTAGCACCATAGTAAATTGTCTGAAGAACTTCATTCCTGCCACCACATCG
AAGTCATCAACGAGCATTATCTTGAAATCAACCTTACAACTCCAATTGCCTAGGTGCAACTCTACTCCATGAGCTAC
ATCATTAAGGGCCTGGGCTTGAGCATTCACTGTCTTCATCTAGCCCTTCTCCTTTATCACCTCAACCCCAAGCCATT
```

TTGCCTCATTCAGCTTGATAAAGTTGTATGTTGCACTTATGTTGACCATCACATGAGTAGACTTTCCATTGATTTGG
GCCTTGCCATATATCAAGGTCCTATCTTTTGGAGATCCGTGCACCAAGTTAGCCCTCAAGGCATTTAAGTGTGAAGA
CGACTCATTTGGGTAGCATCCTAGTTCTCTCACTCCTCTATTATAGTACTGAGTGCACTCTGATTGGGACAACCCTT
GCCATATGTGGACTATCATATAGAAAGCGGTTACCTCAAGGGTTTCTTTTTTCCTGTCCAACCTATTTATCTTTTTG
GTGGTTTTTTCTCCCACCCTTAAGAGTTGTTCCACCCCTTGGGTGTGGCCTTTCCCTTCTTGGTTGTTGAGGGTGGT
TTTGCCAA

ภาพภาคผนวกที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ของอินทผลัมต้นตัวผู้

CTTCCGTAATTCTTTTTTAACAGTTATTATGACTCATTTTGCCTACTACTGGCACTATGGTAGGTCCTCTTTTAAAT
GATGCATACTAGTTGTATTGAGGCATTACCACCATAGTAAATTGTCTGAAGAACTTCATTCCTGCCACCACATCGAA
GTCATCAACGAGCATTATCTTGAAATCAACCTTACAACTCCAATTGCCTAGGTGCAACTCTACTCCATGAGCTACAT
CATTAAGGGCCTGGGCTTGAGCATTCACTGTCTTCATCTAGCCCTTCTCCTTTATCACCTCAACCCCAAGCCATTTT
GCCTCATTCAGCTTGATAAAGTTGTATGTTGCACTTATGTTGACCATCACATGAGTAGACTTTCCATTGATTTGGGC
CTTGCCATATATCAAGGTCCTATCTTTTGGAGATCCGCACACCAAGTTAGCCCTCAAGGCATTTAAGTGTGAAGACG
ACTCATTTGGGTAGCATCCTAGTTCTCTCACTCCTCTATTATAGTATTGAGTGCACTCTGATTGGGACAACCCTTGC
CATATGTGGACTATCATATACGAAGCGGTTACCTCAAGGGTTCTTTTTTCTATCCAATCTTATATCTTATGGAGGTT
TTTCTCCA

ภาพภาคผนวกที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนโครโมโซม PDK_30s944511 ของอินทผลัมต้นตัวเมีย

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพร์เมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
1	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 2	ผู้*			
2	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 3	ผู้*			
3	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 4	ผู้			
4	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 5	ผู้			
5	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 6	ผู้			
6	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 7	ผู้			
7	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 8	ผู้			
8	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 9	ผู้			
9	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 10	ผู้			
10	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 11	ผู้			
11	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 12	เมีย*			
12	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 13	เมีย			
13	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 14	เมีย			
14	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 15	เมีย			
15	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 16	เมีย			
16	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 17	เมีย			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพร์เมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
17	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 18	เมีย			
18	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 19	เมีย			
19	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 20	เมีย			
20	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 21	ผู้			
21	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 22	เมีย			
22	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ต้นที่ 1	ผู้			
23	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 2	ผู้			
24	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 3	ผู้			
25	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 4	ผู้			
26	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 5	ผู้			
27	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 6	ผู้*			
28	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 7	ผู้			
29	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 8	ผู้			
30	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 9	ผู้			
31	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 10	ผู้			
32	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 11	ผู้			
33	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 12	ผู้*			
34	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 13	ผู้			
35	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 14	ผู้			
36	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 15	ผู้			
37	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 16	ผู้*			
38	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 17	ผู้			
39	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 18	ผู้			
40	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 19	ผู้			
41	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 20	ผู้			
42	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 21	เมีย			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพร์เมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
43	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 22	เมีย			
44	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 23	เมีย			
45	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 24	เมีย			
46	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 25	เมีย			
47	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 26	เมีย			
48	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 27	เมีย			
49	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 28	เมีย			
50	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 29	เมีย			
51	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 30	เมีย			
52	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 31	เมีย			
53	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 32	เมีย			
54	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 33	เมีย			
55	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 34	เมีย			
56	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 35	เมีย			
57	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 36	เมีย			
58	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 37	เมีย			
59	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 38	เมีย			
60	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 39	เมีย			
61	สวนโกหลัก จ.เชียงใหม่ ต้นที่ 40	เมีย			
62	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 1	ผู้			
63	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 2	เมีย			
64	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 3	ผู้			
65	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 4	เมีย			
66	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 5	เมีย			
67	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 6	เมีย			
68	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 7	ผู้			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพร์เมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
69	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 8	เมีย			
70	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 9	ผู้			
71	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 10	ผู้			
72	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 11	ผู้			
73	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 12	ผู้			
74	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 13	ผู้			
75	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 14	เมีย			
76	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 15	เมีย			
77	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 16	เมีย			
78	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 17	เมีย			
79	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 18	เมีย			
80	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 19	ผู้			
81	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 20	เมีย			
82	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 21	เมีย			
83	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 22	เมีย			
84	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 23	เมีย			
85	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 24	เมีย			
86	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 25	เมีย			
87	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 26	เมีย			
88	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 27	เมีย			
89	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 28	ผู้			
90	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 29	เมีย			
91	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 30	เมีย			
92	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 31	ผู้			
93	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 32	ผู้			
94	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 33	เมีย			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพร์เมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
95	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 34	เมีย			
96	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 35	เมีย			
97	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 36	เมีย			
98	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 37	เมีย			
99	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 38	เมีย			
100	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 39	เมีย			
101	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 40	เมีย			
102	สวนคุณอนุรักษ์ จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 41	เมีย			
103	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 1	ผู้			
104	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 2	ผู้			
105	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 3	ผู้			
106	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 4	ผู้			
107	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 7	ผู้			
108	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 8	ผู้			
109	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 9	ผู้			
110	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 10	ผู้			
111	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 11	ผู้			
112	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 12	ผู้			
113	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 13	ผู้			
114	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 14	ผู้			
115	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 15	ผู้			
116	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 16	ผู้			
117	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 17	ผู้			
118	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 18	ผู้			
119	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 19	ผู้			
120	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 20	ผู้			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพร์เมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
121	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 21	ผู้			
122	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 22	ผู้			
123	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 23	ผู้			
124	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 24	ผู้			
125	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 25	ผู้			
126	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 26	ผู้			
127	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 27	ผู้			
128	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 28	ผู้*			
129	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 29	ผู้*			
130	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 36	เมีย			
131	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 37	เมีย			
132	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 38	เมีย			
133	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 39	เมีย			
134	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 40	เมีย			
135	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 41	เมีย			
136	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 42	เมีย			
137	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 43	เมีย			
138	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 44	เมีย			
139	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 45	เมีย			
140	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 46	เมีย			
141	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 49	เมีย			
142	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 50	เมีย			
143	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 51	เมีย			
144	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 52	เมีย			
145	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 53	เมีย			
146	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 54	เมีย			

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

No.	ต้น	เพศ	ไพร์เมอร์ที่ใช้		
			ม.นเรศวร	DpDOA +Ubi	DpDOA +PDK30s
147	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 55	เมีย			
148	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 57	เมีย			
149	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 58	เมีย			
150	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 60	เมีย			
151	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 61	เมีย			
152	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 62	เมีย			
153	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 63	เมีย			
154	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 64	เมีย			
155	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 65	เมีย			
156	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 66	เมีย			
157	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 67	เมีย			
158	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 68	เมีย			
159	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 69	เมีย			
160	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 70	เมีย			
161	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 71	เมีย			
162	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 72	เมีย			
163	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 74	เมีย			
164	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 75	เมีย			
165	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 76	เมีย			
166	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 77	เมีย			
167	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 78	เมีย			
168	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 79	เมีย			
169	สวนคุณเด่น จ.กาญจนบุรี ต้นที่ 80	เมีย			

หมายเหตุ: *เพศกับเครื่องหมายโมเลกุลไม่ตรงกัน