การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดเพศอินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) พันธุ์แม่โจ้ 36

สายชล โนสุวรรณ

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดเพศอินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) พันธุ์แม่โจ้ 36

สายชล โนสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดเพศอินทผลัม
(*Phoenix dactylifera* L.) พันธุ์แม่โจ้ 36

สายชล โนสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพพร บุญปลอด)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วินัย วิริยะอลงกรณ์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรนุช เจริญกิจ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รักษาการแทนรองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดเพศอินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.*)* พันธุ์แม่โจ้ 36
ชื่อผู้เขียน นางสาวสายชล โนสุวรรณ
ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์

บทคัดย่อ

การกำหนดเพศอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อสืบค้นและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบต้นเพศผู้ และต้นเพศเมียของอินทผลัม เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ได้ถูกใช้ในการบ่งชี้ต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ตัวอย่างดีเอ็นเอรายต้นจาก 10 ต้น ของเพศผู้และเพศเมียพันธุ์แม่โจ้ 36 ได้ถูกนำมารวมกัน ตัวอย่างกลุ่มดีเอ็นเอเพศผู้และกลุ่มดีเอ็นเอเพศเมียได้นำมาใช้สำรวจความแตกต่างของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ไพร์เมอร์ทั้งหมด 520 หมายเลข ถูกนำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่ามี 7 หมายเลข ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มเพศผู้และกลุ่มเพศเมีย ตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งสองกลุ่มแสดงรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คงเดิมไม่เปลี่ยนแปลง ไพร์เมอร์ OPP03 ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบรายต้นของเพศผู้ และเพศเมียอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันกับกลุ่มเพศผู้และกลุ่มเพศเมีย ผลการทดลองนี้บ่งชี้ให้เห็นว่า ไพรเมอร์ OPP03 สามารถใช้ตรวจสอบต้นเพศผู้และเพศเมียอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 ได้ ชิ้นส่วนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพร์เมอร์หมายเลข OPP03 ขนาด 1200 คู่เบสได้ถูกนำมาหาลำดับเบส และออกแบบไพร์เมอร์เพื่อที่จะนำมาพัฒนาบ่งชี้เพศ ต้นเพศผู้ และเพศเมียในต้นกล้าอินทผลัมต่อไป

คำสำคัญ : อินทผลัม, เครื่องหมายดีเอ็นเอ, เครื่องหมายอาร์เอพีดี, การกำหนดเพศ

Title DETECTION OF DNA MARKER FOR SEX DETERMINATING IN DATE PALM (*Phoenix dactylifera* L.) ' MAEJO 36 ' CULTIVAR

Author Miss Saichon Nosuwan

Degree Master of Science in Horticulture

Advisory Committee Chairperson Dr. Pornpan Pooprompan

ABSTRACT

Sex determination of date palm plants (*Phoenix dactylifera* L.) CV 'Maejo 36' using DNA markers was studied. This research aimed to investigate and develop DNA marker for detecting male and female in date palm plants. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to determine male and female plants. Individual DNA samples from 10 plants of each male and female of 'Maejo 36' were bulked. Bulked DNA samples from male and female groups were used for sreening polymorphic markers. A total of 520 primers were screened and resulted that 7 primers showed polymorphisms between male and female groups. Both groups showed the same DNA pattern and consistance of primer OPP03. The primer OPP03 was used to detect individual male and female plants of 'Maejo 36' and found the same DNA pattern as bulked groups. The results indicated that The primer OPP03 can be used to detect male and female plant in date palm CV 'Maejo 36' The fragment of OPP3 at 1200 bps was sequenced and designed as primer to detect sex determination of male and female seedling date palm in the future.

Keywords : date palm, DNA marker, RAPD, Sex determinatiom

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพพร บุญปลอด ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วินัย วิริยะอลงกรณ์ กรรมการที่ปรึกษาในการให้ความรู้แนะนำ และคำปรึกษาในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.เพิ่มศักดิ์ สุภาพรเหมินทร์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์กรมหาชน) ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัย

ขอขอบคุณ บ้านสวนโกหลัก อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ไร่นวลณัฐทร อำเภอโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา คุณสมพลบ้านสวนอินทผลัมเชียงใหม่ อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ บ้านสวนวาสนาอินทผลัม อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างใบอ่อนอินทผลัมเพื่อนำมาวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อพัฒน โนสุวรรณ คุณแม่เครือวัลย์ ธิเป็ง ที่ให้กำเนิดเลี้ยงดู เอาใจใส่ อบรม สั่งสอน และสนับสนุนทุนทรัพย์ และขอขอบคุณทุกคนในครอบครัวที่ให้กำลังใจเสมอมา จนทำให้การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จ

สายชล โนสุวรรณ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
ปัญหาของงานวิจัย 2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
ขอบเขตของการวิจัย 2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 3
ประโยชน์ และสรรพคุณของอินทผลัม 7
การขยายพันธุ์อินทผลัม 8
การขยายพันธุ์อินทผลัมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 8
การปลูก 9
การผสมเกสรอินทผลัม 10
การแยกต้นเพศผู้ และต้นเพศเมียของอินทผลัม 11
เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) 12
เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) 14

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ 15
Bulked Segregant Analysis (BSA) 19
บทที่ 3 วิธีการวิจัย 20
อินทผลัมที่ใช้ในการศึกษา 20
เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี 20
วิธีการวิจัย 21
การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเออินทผลัม 21
การทดลองที่ 2 การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดเพศอินทผลัม 22
สถานที่ดำเนินการทดลอง 23
ระยะเวลาดำเนินการทดลอง 24
บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิจารณ์ 25
การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเออินทผลัม 25
การทดลองที่ 2 การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดเพศอินทผลัม 29
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 38
การทดลองที่ 1 การศึกษาการสกัดดีเอ็นเออินทผลัม 38
การทดลองที่ 2 การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเพศอินทผลัม 38
บรรณานุกรม 39
ภาคผนวก 45
ประวัติผู้วิจัย 50

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยสารละลาย 2xCTAB 2 ชนิด..... 26

ตารางที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นระหว่างกลุ่มเพศผู้และกลุ่มเพศเมียอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 29

ตารางที่ 3 การออกแบบไพร์เมอร์ที่ตำแหน่งเฉพาะเจาะจง..... 36

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ 2x CTAB ที่มีส่วนประกอบของสารละลาย Tris-HCl (1% agarose gel) 26

ภาพที่ 2 การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ 2x CTAB ที่มีส่วนประกอบของสารละลาย Tris-Cl (1% agarose gel) 27

ภาพที่ 3 การทำซ้ำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ระบุเพศ primer OPP03 30

ภาพที่ 4 การยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศรายต้นเพศผู้และรายต้นเพศเมียอินทผลัมพันธุ์ แม่โจ้ 36 ไพรเมอร์หมายเลข OPP03 31

ภาพที่ 5 การยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศรายต้นเพศผู้และรายต้นเพศเมียที่สุ่มตัวอย่างใหม่จากต้นที่ทราบเพศ จากสวนโกหลัก อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ไพรเมอร์หมายเลข OPP03 (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1200 bps) 32

ภาพที่ 6 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้36 ที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายเลข OPP03 (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1200 bps) 33

ภาพที่ 7 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศอินทผาลัมพันธุ์เดตเลตนัวส์ หมายเลข OPP03 34

ภาพที่ 8 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศอินทผลัมพันธุ์บาร์ฮี OPP03 35

ภาพที่ 9 ลำดับเบสของไพร์เมอร์ OPP03 ที่ตำแหน่ง 1200 bp 35

บทที่ 1
บทนำ

อินทผลัมเป็นพืชเศรษฐกิจดั้งเดิมในแถบตะวันออกกลาง ตอนเหนือของแอฟริกา อินทผลัมเป็นพืชที่มีอายุยาว ชนิดแยกเพศแยกดอก (dioecious) มีจำนวนโครโมโซม 2n =36 (Salem *et al*.,2007) อินทผลัมเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพราะผลอินทผลัมมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ต้นเพศเมียใช้ผลิตผลที่มีคุณภาพแต่ต้นเพศผู้ใช้ในการผสมเกสรเท่านั้น ในปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกอินทผลัมผลสดและผลแห้งเป็นอันดับต้นๆ ของเอเชีย ในส่วนของการผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค อินทผลัมสายพันธุ์ไทยสายพันธุ์แรกมีชื่อว่าพันธุ์ KL1 เป็นผลงานการปรับปรุงพันธุ์ของนายศักดิ์ ลำจวน หรือที่รู้จักกันในนามสวนโกหลัก ตำบลศรีดงเย็น อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสวนนี้ถือได้ว่าเป็นสวนอินทผลัมแห่งแรกในประเทศไทยที่ได้พัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์จนได้อินทผลัมที่มีคุณภาพดีส่งออกต่างประเทศ ซึ่งกว่าจะได้สายพันธุ์นี้ต้องใช้เวลานานในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่แน่นอนและคงที่โดยสายพันธุ์นี้ให้ผลผลิตในระยะเวลาเพียง 3 ปี และบางพื้นที่ 1-2 ปีก็เริ่มให้ผล แต่พันธุ์จากต่างประเทศจะต้องใช้เวลานานถึง 7 ปี (วีรพันธ์, 2556) อินทผลัมอยู่ในวงศ์ Arecaceae มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Date Palm และมีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Phoenix dactylifera* L. เป็นพืชในตระกูลปาล์มชนิดหนึ่ง มีความหลากหลายของสายพันธุ์ อินทผลัมมีทั้งพันธุ์ที่รับประทานผลสด และผลแห้ง (อภิชาติ และคณะ, 2556)

ดังนั้นจึงได้ศึกษาการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเพศของอินทผลัมในระยะต้นกล้า เพื่อประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในการจัดการระบบการผลิต ซึ่งในปัจจุบันเกษตรกรจะสามารถทราบเพศของอินทผลัมเมื่อมีอายุ 2 - 3 ปี เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นจึงมีพื้นที่เพาะปลูกอินทผลัมจำนวนน้อยส่งผลให้ประเทศไทยต้องมีการนำเข้าอินทผลัมทั้งผลไม้สดและแปรรูปควบคู่ไปกับการผลิตภายในประเทศ ในการผลิตอินทผลัมนั้นจะมีอัตราส่วนของต้นเพศผู้ประมาณร้อยละ 8-10 ของการเพาะปลูกเพื่อใช้ในการผสมเกสร ดังนั้นจึงมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถระบุเพศได้ในพืชที่เป็นพืชแยกเพศแยกดอก (Sedra *et al.,* 1998) ได้แก่ มะละกอ กีวี่ฟรุต ดีปลี เป็นต้น สำหรับอินทผลัม Dhawan *et al.,* (2013) ได้มีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD) เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat, SSR) ระบุเพศ และต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบสการ์ (sequence characterize amplified region, SCAR) ร่วมกับการใช้เทคนิคการรวมดีเอ็นเอของ

ประชากรที่มีการกระจายตัว (bulk segregant analysis, BSA) เพื่อระบุเครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดเพศของอินทผลัม

ปัญหาของงานวิจัย

เนื่องจากอินทผลัมเป็นพืชชนิดแยกเพศแยกดอกเมื่อนำเมล็ดของอินทผลัมมาปลูกจึงทำให้ไม่สามารถระบุเพศของอินทผลัมได้ในระยะที่ยังเป็นต้นกล้าต้องรอให้ถึงระยะออกดอกถึงจะสามารถแยกเพศของต้นอินทผลัมได้ เกษตรกรหรือผู้ที่ปลูกอินทผลัมต้องใช้เวลาถึง 2-3 ปี จึงจะสามารถระบุเพศของอินทผลัมได้ เมื่อถึงระยะออกดอกอินทผลัมที่เพาะเมล็ด อาจจะเป็นต้นเพศผู้หมดหรือเป็นต้นเพศเมียทั้งหมด

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.เพื่อสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ Random Amplified Polymorphic DNA นำมาใช้ระบุเพศอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36

2.เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จะนำมาใช้ระบุเพศต้นกล้าอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถระบุเพศของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36

2.พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถระบุเพศผู้เพศเมียได้ในอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 หรือพันธุ์อื่นๆ

ขอบเขตของการวิจัย

1.ตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บ่งชี้เพศ และยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ Random Amplified Polymorphic DNA ร่วมกับเทคนิค Bulk Segregant Analysis ในอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36

2.เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นที่ใช้ระบุเพศผู้และเพศเมียในอินทผลัมพันธุ์แมโจ้36

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

อินทผลัมจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจึงไม่มีรากแก้ว ระบบรากของอินทผลัมจะเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) และสามารถกระจายออกไปได้ไกลถึง 25 เมตร และลึกลงไปได้ถึง 6 เมตร แต่ส่วนใหญ่แล้วร้อยละ 85 ของระบบรากจะหนาแน่นมาก ในระยะรอบต้น 2 เมตร และลึก 2 เมตร ระบบรากของอินทผลัมสามารถแช่ในดินเปียกชื้นได้นานหลายเดือน แต่ถ้าหากระยะเวลายาวนาน ออกไปอีกจะมีผลกระทบกับรากและผลผลิตได้ ทางที่ดีควรทำเนินดินรอบโคนต้นปลูกอินทผลัมให้อยู่เหนือระดับพื้นดินปกติ ปัจจัยการเจริญเติบโตของรากอินทผลัมขึ้นอยู่กับน้ำ และความชุ่มชื้น ในดิน ดังนั้นระบบน้ำหยดจึงเหมาะสมกับอินทผลัมมากที่สุด นอกจากนี้สายพันธุ์ของอินทผลัมก็เป็นอีกปัจจัยที่มิอาจมองข้าม สายพันธุ์ที่ระบบรากกระจายได้เร็วที่สุดคือ เดทเลดนัวร์ (Deglet Nour) (วรรณภา, 2558)

อินทผลัมมีใบติดอยู่บนต้นประมาณ 40-60 ก้าน ทางใบยาว 3-4 เมตร ใบเป็นแบบขนนก สีบรอนซ์เงา ใบย่อยพุ่งออกหลายทิศทาง ใบอินทผลัมที่หมดสภาพให้ตัดทิ้งในต้นเล็กอาจจะใช้กรรไกรตัดแต่งใบต้นที่โตขึ้นมาอาจจะใช้เคียวในการตัดแต่งใบ ทั้งนี้เพื่อไม่ให้ใบแก่เหล่านี้เป็นที่อยู่อาศัยของแมลงและยังทำให้ทรงพุ่มดูสะอาดสวยงาม สำหรับใบที่ยังไม่แก่ให้ตัดหนามบริเวณโคนใบทิ้งเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดอันตรายในขณะทำงานและเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณโคนใบอินทผลัมจะมีหนามที่แข็งและยาวมาก (นิรนาม, 2549)

ช่อดอกของอินทผลัมออกตรงโคนกาบใบ อินทผลัมเป็นพืชชนิดแยกดอก (dioecious plant) คือมีดอกต้นเพศผู้และดอกต้นเพศเมียอยู่คนละต้น อินทผลัมจะออกดอกเป็นจั่นโดยลักษณะดอกเกสรเพศผู้จะมีสีขาวกลีบดอกเป็นแฉกๆ คล้ายหางกระรอก สำหรับอินทผลัมต้นเพศเมียจะออกดอกเป็นจั่นเหมือนกับอินทผลัมต้นเพศผู้ แต่ดอกของต้นเพศเมียจะมีลักษณะเป็นเมล็ดกลมๆเป็นช่อสีเขียวอ่อน โดยปกติแล้วอินทผลัมต้นเพศผู้จะออกดอกก่อนต้นเพศเมีย จึงต้องมีการเก็บเกสรต้นเพศผู้ไว้รอผสมให้เกสรต้นเพศเมีย เพื่อให้ติดลูกดกโดยเมื่อจั่นเพศผู้แตกออกมาเห็นกลีบดอกสีขาวเป็นแฉกๆ (กองบรรณาธิการเมืองไม้ผล, 2558)

ผลอินทผลัมมีลักษณะกลมรี เหลืองส้ม เมื่อสุกแก่จะมีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ผลมีขนาด 20x30 มิลลิเมตร ระยะการพัฒนาผลแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ระยะผลดิบ ระยะผลสมบรูณ์ เต็มที่ ระยะผลสุกแก่ และระยะผลแห้ง (นิรนาม, 2549)

สายพันธุ์อินทผลัมที่เป็นที่นิยม

อินทผลัมที่รับประทานผลในโลกมีมากกว่า 700 สายพันธุ์ เนื่องจากมีการผสมพันธุ์ข้ามต้นและกลายพันธุ์ผิดแปลกไปจากต้นพ่อแม่ หรือพันธุ์ดั่งเดิมนั้นเอง โดยมีการกระจายตัวอยู่ตามส่วนต่างๆ และสายพันธุ์อินทผลัมส่วนใหญ่จะเป็นที่รู้จักในวงแคบๆ มีการเพาะปลูกและรับประทานผลกันเองเฉพาะในท้องถิ่นแต่มีอินทผลัมราว 10 สายพันธุ์ ทั้งแบบรับประทานผลสดและผลสุกแห้งที่กลายเป็นที่รู้จักกันในระดับสากล ซึ่งมีเพียงไม่กี่สายพันธุ์เท่านั้นที่เป็นที่นิยมของผู้ที่ชื่นชอบและรู้ถึงประโยชน์ที่ได้รับจากการรับประทานอินทผลัม (จิรวรรณ, 2558)

สายพันธุ์อินทผลัมที่เป็นที่รู้จัก และนิยมปลูก ได้แก่

1. อินทผลัมสายพันธุ์อัจวะห์ (Ajwa) อินทผลัมสายพันธุ์นี้มีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ซาอุดิอาราเบีย ปลูกมากในแถบมาดิน่า ซึ่งเป็นเมืองสำคัญทางศาสนาโดยสายพันธุ์อัจวะห์เป็นสุดยอดสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมของชาวมุสลิมทั่วโลก ด้วยลักษณะผลที่มีเอกลักษณ์ ผลมีขนาดกลางรูปร่าง ผลมีลักษณะรูปไข่ ขณะที่ผลยังอ่อนอยู่จะมีสีเขียวอมเหลือง แต่เมื่อผลสุกแห้งแล้วจะมีสีเข้มค่อนไปทางสีดำ จุดเด่นคือมีรอยแตกสีขาวบริเวณปลายผล ขนาดของผลแห้งเฉลี่ยอยู่ที่ 4.5 เซนติเมตร มีน้ำหนัก 7-5 กรัมต่อผล ผลสุกแห้งอินทผลัมสายพันธุ์นี้ให้รสชาติที่หวานแตกต่างจากสายพันธุ์อื่น อีกทั้งมีลักษณะเนื้อกึ่งแห้งละเอียดเหนียวนุ่มและมีเส้นใยมากอีกด้วย อินทผลัมพันธุ์นี้ถือว่าหารับประทานค่อนข้างยาก ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง (อภิชาติ และคณะ, 2556)

2. อินทผลัมสายพันธุ์บาร์ฮี (Barhee) แหล่งกำเนิดอยู่ที่ประเทศอิรัก ซึ่งสายพันธุ์นี้เป็นที่นิยมในช่วงพิธีถือศีลอด อินทผลัมสายพันธุ์นี้มีลักษณะผลทรงไข่อ้วนกลมมากกว่าพันธุ์อื่นๆ ในผลอ่อนจะมีสีเขียวเข้มก่อนเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนจนกลายเป็นสีเหลืองสายพันธุ์นี้นิยมรับประทานผลสดมากกว่าซึ่งจะมีลักษณะเนื้อที่กรุบกรอบ รสชาติหวาน แต่ในคำแรกจะมีรสชาติฝาดเล็กน้อย นิยมเก็บเกี่ยว และจำหน่ายแบบเป็นทะลายเพื่อให้ขายได้ราคาดี อินทผลัมพันธุ์บาร์ฮีผลสด มีขนาดอยู่ที่ 7.5 เซนติเมตร มีน้ำหนักอยู่ที่ 15-20 กรัมต่อผล ลำต้นมีลักษณะหนาและแข็งแรง ราคาอินทผลัมพันธุ์บาร์ฮีผลสดที่นำเข้ามาจำหน่ายในประเทศอยู่ที่ประมาณ 500-800 บาทต่อกิโลกรัม ในผลสดของอินทผลัมพันธุ์บาร์ฮีนั้นมักจะเน่าเสียง่ายและมีอายุในอุณหภูมิปกติเพียงประมาณ 10-15 วัน หลังจากการเก็บเกี่ยว ในการเก็บเกี่ยวจึงควรทำในระยะที่ผลดิบใกล้จะแก่ ให้มากที่สุด เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผล โดยผลจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองแล้วค่อยๆ กลายเป็นสีน้ำตาลอ่อน เมื่อสุกเต็มที่ เนื้อจะนุ่มหนาและมีรสชาติที่เต็มไปด้วยคุณภาพที่ยอดเยี่ยมแต่จะต้องบรรจุในกล่องแบบพิเศษ และเก็บรักษาไว้ในตู้แช่เย็น ในประเทศไทยอินทผลัมพันธุ์นี้เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่นิยมนำมาเพาะปลูก และขยายพันธุ์และกลายเป็นสายพันธุ์ใหม่ เช่นพันธุ์แม่โจ้ 36 เป็นต้น (อภิชาติ และคณะ, 2556)

3. อินทผลัมสายพันธุ์เด็คเลตนัวร์ (Deglet Noor) อินทผลัมสายพันธุ์นี้ถูกขนานนามว่าราชินีแห่งอินทผลัม โดยจะมีผลขนาดเล็กถึงกลางรูปไข่รียาวในผลอ่อนมีสีเขียวแล้วจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนเป็นสีน้ำตาลอ่อน ผลค่อนข้างจะโปร่งแสงคล้ายสีของน้ำผึ้งสามารถรับประทานได้ทั้งผลสดและผลแห้ง มีรสชาติหวานเหมือนคาราเมลซึ่งประเทศแอลจีเรียเป็นผู้ปลูกและผลิตอินทผลัมสายพันธุ์นี้มาก อินทผลัมพันธุ์เด็คเลคนัวร์ในผลสุกมีขนาดอยู่ที่ 7 เซนติเมตรมีน้ำหนักอยู่ที่ 10-15 กรัมต่อผล สามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิปกติได้นานถึง 3 เดือนในประเทศไทยยังสามารถหาซื้อได้ในท้องตลาด ราคาอยู่ที่กิโลกรัมละ 400-500 บาท ประเทศไทยนิยมเพาะปลูกอินทผลัมสายพันธุ์นี้มากพอๆ กับพันธุ์บาร์ฮี เนื่องจากปลูกง่าย ขยายพันธุ์ง่าย อีกทั้งยังเป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคกันมาก สามารถรับประทานได้ทั้งผลสดและผลแห้ง (สาวบางแค 22, 25562)

4. อินทผลัมสายพันธุ์เมดจูลห์ (Med jool) มีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ประเทศโมร็อกโก ได้รับการยกย่องว่าเป็นราชาแห่งอินทผลัม ส่วนใหญ่นิยมรับประทานเป็นผลสุกแห้ง มีเอกลักษณ์คือมีขนาดผลใหญ่ ผลมีสีเขียวอ่อนแล้วค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีแดงในตอนที่ผลแก่ขึ้นและเมื่อผลแห้งจะมีสีน้ำตาลเข้มคล้ายมะฮอกกะนี ลักษณะเนื้อกึ่งแห้งเป็นทรายเล็กน้อยขนาดของผลที่สุกแห้งอยู่ที่ 1.5 เซนติเมตร มีน้ำหนัก 30-35 กรัมต่อผล แม้จะมีลักษณะที่โดดเด่นมีลำต้นที่แข็งแรง ให้ผลผลิตหน่อได้ค่อนข้างมาก และปลูกง่ายแต่ต้นที่โตเต็มที่จะให้ผลผลิตเพียงประมาณ 45-90 กิโลกรัม ซึ่งติดผลค่อนข้างยาก สำหรับในประเทศไทยยังไม่เป็นที่นิยมนำมาเพาะปลูกราคาที่จำหน่ายในประเทศสำหรับอินทผลัมพันธุ์เมคจูลห์ ที่คัดเกรดพิเศษมีราคค่อนข้างสูงอยู่ที่ 950-1000 บาทต่อกิโลกรัม (สุกรี, 2558)

5. อินทผลัมสายพันธุ์ซาฟาวี (Safawi) มีแหล่งกำเนินอยู่ที่ประเทศอิรัก โดยที่ประเทศสาธารณรัฐอาหรับเอมิเรตส์ ได้มีการเพาะปลูกและส่งออกอินทผลัมสายพันธุ์นี้มากเมื่อผลยังอ่อนจะมีสีเขียวแล้วจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อผลแก่ขึ้นและผลแห้งจะมีสีน้ำตาลออกดำ มีลักษณะเนื้อกึ่งแห้ง มีกลิ่นหอมนิยมทานผลแห้งขนาดผลอยู่ที่ 6 เซนติเมตรอินทผลัมพันธุ์นี้ค่อนข้างได้ผลผลิตที่สูง ส่วนราคาของอินทผลัมพันธุ์นี้สามารถหาซื้อได้ในราคาที่ไม่สูงมากโดยเฉลี่ยจะอยู่ที่ 100 บาทต่อกิโลกรัม (เปรม, 2558)

6. อินทผลัมสายพันธุ์ซุกการี (Sukkari) เป็นอินทผลัมที่ชาวอาหรับนิยมรับประทาน มีต้นกำเนิดในซาอุดิอาระเบีย เป็นที่ต้องการของตลาดเนื่องจากรสชาติที่ดีผลมีขนาดกลางรูปทรงกรวยเมื่อผลอ่อนมีสีเขียวผลแห้งจะสีน้ำตาลอ่อน เนื้อค่อนข้างแข็งและหวานจัดเนื้อจะกรอบเก็บไว้อุณหภูมิปกติได้นานแต่เนื้อจะแข็งขึ้น ข้อมูลทางโภชนาการได้แสดงให้เห็นว่าอินทผลัมพันธุ์นี้มีประโยชน์ทางโภชนาการสูงอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุสูง และช่วยปรับปรุงระบบการย่อยอาหารเนื่องจากมี เส้นใยที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำและมีกรดอะมิโนช่วยให้สุขภาพฟันที่ดี (จิรวรรณ, 2558)

7. อินทผลัมสายพันธุ์ไคไนซี่ (Khonaizi) อินทผลัมพันธุ์โคไนซี่นั้นเป็นอินทผลัมที่นิยมปลูกและเป็นอินทผลัมที่มีการค้าขายในตลาดโลกมากพันธุ์หนึ่ง สามารถรับประทานได้ตั้งแต่เริ่มแก่จัดและแห้ง เพราะเป็นอินทผลัมพันธุ์ที่มีปริมาณเทนนินน้อยมากพันธุ์หนึ่งรสชาติของผลอินทผลัมสายพันธุ์นี้นั้นไม่หวานมากค่อนไปทางหวานมันเมื่อแห้งจะมีเนื้อสัมผัสของอินทผลัมในแบบเฉพาะตัว ผลสีของอินทผลัมพันธุ์นี้นั้นเป็นสีแดงเข้มเมื่อเข้าสีและอินทผลัมพันธุ์นี้จะเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อเริ่มสุก ขนาดผลเฉลี่ยอยู่ที่ 3 เซนติเมตรโดยที่ประเทศอิรักเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ของอินทผลัมสายพันธุ์นี้ อินทผลัมสายพันธุ์นี้นิยมจำหน่ายผลผลิตแบบผลแห้งสามารถหาซื้อได้ตามท้องตลาดราคากิโลกรัมละ 500 บาท (กองบรรณาธิการ, 2562)

8. อินทผลัมสายพันธุ์ฮัมรี่ (Hamri) เป็นพันธุ์ผลสีแดงเข้มเนื้อเยอะ มีรสชาติหวานปานกลางและเนื้อนุ่ม และมีกลิ่นที่หอมเฉพาะตัวลักษณะผลสีแดงเข้ม มีผลขนาดกลางแหล่งต้นกำเนิดของพันธุ์นี้คือประเทศอิยิปต์ และประเทศโอมาน (นิรนาม, 2559)

9. อินทผลัมพันธุ์ฮาลาวี (Halawy) อินทผลัมพันธุ์นี้มีต้นกำเนิดมาจากดินแดนแห่งอารยธรรมรุ่นแรกๆ ของมนุษย์โลก คือเมโสโปเตเมีย ดินแดนที่เชื่อมต่อระหว่างประเทศซีเรียกับประเทศอิรัก เป็นสายพันธุ์ที่ทำเพื่อส่งออกเป็นสินค้าหลักเนื่องจากเป็นสายพันธุ์อินทผลัมที่ขึ้นชื่อมากในแถบนี้ ลักษณะผลจะมีสีเหลืองอ่อนๆ และให้รสชาติหวานมาก (วรรณภา, 2558)

10. อินทผลัมสายพันธุ์ชิบีบี (Shebebei) อินทผลัมพันธุ์นี้มีต้นกำเนิดอยู่ที่ประเทศซาอุดิอาราเบีย โดยอินทผลัมพันธุ์นี้มีลักษณะผลกลม มีขนาดปานกลาง มีสีเหลืองอ่อนเนื้อเยอะ เมล็ดมีลักษณะกลม ไม่เรียวยาวเหมือนสายพันธุ์อื่นๆให้รสชาติหวานปานกลางและมีเสี้ยนน้อย (นิรนาม, 2558)

11. อินทผลัมสายพันธุ์อัมเบอร์ (Amber) เป็นอินทผลัมที่มีขนาดผลใหญ่ สีจะออกแดงส้ม เนื้อเยอะ ที่สำคัญมีรสชาติที่หวานและเสี้ยนน้อย ต้นกำเนิดของสายพันธุ์นี้จะมีมากที่ประเทศโอมาน ซาอุดิอาระเบีย และสาธารณรัฐอาหรับเอมิเรต ผลผลิตจะออกมาสู่ตลาดในช่วงก่อนปลายฤดูหนาว (กองบรรณาธิการเมืองไม้ผล, 2560)

12. อินทผลัมสายพันธุ์มับรูม (Mabroom) มีแหล่งกำเนิดอยู่แถบมาดินา่ ประเทศซาอุดิอาระเบีย เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะลำต้นใหญ่ ทรงสวย นอกจากปลูกไว้รับประทานแล้วยังปลูกไว้เพื่อประดับได้ด้วย มีลักษณะเนื้อที่เหนียวหนึบแต่ไม่เหนอะหนะและมีรสชาติหวาน (นิรนาม, 2549)

13. อินทผลัมพันธุ์คาลาส (Khalas) อินทผลัมสายพันธุ์นี้ มีต้นกำเนิดสายพันธุ์มาจากประเทศซาอุดิอาระเบีย เป็นสายพันธุ์ที่รับประทานผลสุกตั้งแต่เริ่มสุกครึ่งผลและมีสีเหลือง ให้รสชาติหวาน มีความหอมเป็นเอกลักษณ์ เนื้อนุ่ม ลักษณะผลเรียวยาวรูปไข่ มีผลขนาดเล็ก มีขนาดผลเฉลี่ยอยู่ที่ 5.25 เซนติเมตร ในผลดิบหรือผลอ่อนจะมีสีเหลืองส่วนผลแห้งจะมีสีน้ำตาลอ่อนใส

ผิวบางเรียบค่อนข้างโปร่งแสง เนื้อนิ่มปานกลางมีรสชาติหวานน้อยๆ และถูกจัดอยู่ในอันดับต้นๆ ที่นิยมนำมารับประทาน แม้ในประเทศไทยจะยังไม่เป็นที่รู้จักมากนักก็ตาม (วีรพันธ์, 2556)

14. อินทผลัมพันธุ์เคแอล1 หรืออินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 (KL 1) อินทผลัมสายพันธุ์นี้เป็นอินทผลัมชนิดทานผลสดถูกพัฒนาขึ้นและมีแหล่งกำเนิดอยู่ในประเทศไทยมีต้นสายพันธุ์ดั่งเดิมเป็นอินทผลัมพันธุ์บาร์ฮี ซึ่งเป็นอินทผลัมพันธุ์ที่รับประทานผลสดเช่นกันโดยผู้ที่พัฒนาอินทผลัมสายพันธุ์นี้ คือ คุณศักดิ์ ลำจวน (วีรพันธ์, 2556) ปัจจุบันปลูกอยู่ที่ อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ อินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 สามารถปลูกได้ดีในประเทศไทย มีขนาดผลอยู่ที่ 6 เซนติเมตร .ในผลสุกจะมีสีเหลืองสว่าง จากนั้นจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล ในผลที่เริ่มสุกงอม แต่ยังสามารถรับประทานได้อยู่ และยังให้รสชาติที่หวานจำหน่ายในราคา 500-800 บาทต่อกิโลกรัม (อภิชาติ และคณะ, 2556)

ประโยชน์ และสรรพคุณของอินทผลัม

ในด้านคุณค่าทางโภชนาการ อินทผลัมมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมาก เช่น ซัลเฟอร์ เหล็ก โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แมงกานีส และน้ำมันโวลาไดท์ เป็นต้น แถมมีเส้นใยมาก ช่วยลดอาการท้องผูกและช่วยย่อยอาหาร ทั้งยังให้พลังงานสูงทำให้ร่างกายแข็งแรง นอกจากนั้นยังบำรุงกล้ามเนื้อมดลูกและสร้างน้ำนมแม่สำหรับ เด็กทารก (อภิชาติ และคณะ, 2556)

ในด้านการรักษาโรค อินทผลัมช่วยบำรุงร่างกาย บำรุงสายตา ลดความหิวกระหาย แก้โรควิงเวียนศีรษะ ช่วยลดเสมหะ ทำให้กระดูกแข็งแรง ลดระดับน้ำตาลในเลือดและลดความดันโลหิตสูง นอกจากนี้ยังกำจัดเชื้อโรคที่ตกค้างในลำไส้ และระบบทางเดินอาหารเพราะว่าอินทผลัมมีฤทธิ์ในการกำจัดสารพิษและยับยั้งการเจริญเติบโตของโรคอันเป็นสารที่ก่อมะเร็งในช่องท้องได้เป็นอย่างดี (จิรวรรณ, 2558)

อินทผลัมจึงเป็นได้ทั้งอาหาร ยา และผลไม้ เหมาะสำหรับบำรุงร่างกายโดยที่อินทผลัมจะไม่สร้างของเสียหรือกากที่เป็นอันตราย ในทางตรงกันข้ามอินทผลัมกลับช่วยรักษาโรค อินทผลัมจึงถูกจัดให้เป็นผลไม้ที่มาจากสวรรค์มีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ประเทศอียิปต์และอีกหลายประเทศในตะวันออกกลาง (วรรณภา, 2558) โดยมีคุณค่าทางอาหารและมีประโยชน์ต่อร่างกาย ในผลของอินทผลัมทุกๆ 100 กรัม สามารถให้พลังงาน 157 กิโลแคลอรี หรืออาจถึง 383 กิโลแคลอรี ซึ่งอินทผลัมผลสุกสดๆ หรือผลแห้งชนิดต่างๆ จะมีปริมาณและส่วนประกอบที่แตกต่างกันออกไป (อภิชาติ และคณะ, 2556)

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางการแพทย์ และวิทยาศาสตร์ด้านโภชนาการ การที่รับประทานอินทผลัมเป็นจำนวนมาก จะพบเจอปัญหาทางด้านโรคมะเร็งได้น้อยมากซึ่งชาวอาหรับ และชาวทะเลทรายในแถบตะวันออกกลาง ที่ใช้ชีวิตอยู่ในสภาพที่ขาดแคลนอาหาร และรับประทานอินทผลัมอยู่เป็นประจำกลับไม่ต้องเผชิญกับโรคมะเร็ง เนื่องจากในปัจจุบันได้พิสูจน์แล้วว่า การขาดแมกนีเซียมเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งโดยในผลของอินทผลัมนั้นจะมีปริมาณแมกนีเซียมอยู่เป็น

จำนวนมาก แมกนีเซียมมีความจำเป็นสำหรับไต และถุงน้ำดี ซึ่งสามารถขจัดสิ่งเหล่านี้ได้ด้วยการรับประทานอินทผลัมวันละ 2-3 ผล ซึ่งน้ำตาลที่อยู่ในอินทผลัม ได้แก่ กลูโคส และ แซ็กกาโรส (กองบรรณาธิการเมืองไม้ผล, 2558)

การขยายพันธุ์อินทผลัม

การขยายพันธุ์ปลูกอินทผลัม สามารถทำได้ 3 วิธี คือ การเพาะเมล็ด การแยกหน่อ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทั้งนี้วิธีการแยกหน่อ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ที่ดีที่สุด คือ ต้นกล้าที่ได้จะมีคุณสมบัติเหมือนต้นพ่อแม่พันธุ์ทุกประการ แต่เนื่องจากราคาต้นพันธุ์ที่มีจำหน่ายอยู่ในประเทศราคาค่อนข้างสูง ประมาณ 1800-2500 บาท ต่อต้น ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ หากต้องการปลูกอินทผลัมด้วยวิธีนี้คงต้องใช้งบประมาณในการลงทุนที่สูง อีกทั้งต้นกล้าพันธุ์ เหล่านี้อาจยังมีไม่เพียงพอต่อความต้องการอีกด้วย ดังนั้นต้นกล้าที่เกิดจากการเพาะเมล็ดจึงเป็นอีกทางเลือกของผู้ที่สนใจปลูกอินทผลัม เพราะมีราคาไม่แพงและมีต้นกล้าจำนวนมากพอที่จะจัดหาไว้ลงแปลงปลูกได้ตามต้องการ (วีรพันธ์, 2556)

การขยายพันธุ์อินทผลัมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการนี้เป็นการขยายต้นอินทผลัมที่ได้ค่อนข้างที่จะได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการ นิยมใช้วิธการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอินทผลัมเพศเมียสายพันธุ์ดีๆ เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมากๆ เพราะต้นเพศเมียเป็นต้นที่ให้ผลผลิตหากได้ต้นเพศเมียสายพันธุ์ที่ดีมีขนาดใหญ่ออกผลดก และมีรสชาติที่ดีมีเอกลักษณ์ก็จะเป็นผลดีต่อผู้เพาะปลูกซึ่งในต่างประเทศนิยมใช้วิธีการนี้ ในการเพาะปลูกเชิงพาณิชย์ แต่สำหรับในประเทศไทยมีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพียงเฉพาะกลุ่มเท่านั้น เนื่องจากต้นพันธุ์ยังมีราคาค่อนข้างที่จะสูงอยู่พอสมควร ราคาอยู่ที่ 1700-2000 บาทต่อต้น และยังคงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แต่ในความเป็นจริงในประเทศไทยเองมีการทำการวิจัยเกี่ยวกับ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออินทผลัมจนประสบความสำเร็จแล้ว แต่เนื่องจากยังไม่เป็นที่นิยมมากนัก และยังต้องใช้การลงทุนที่ค่อนข้างที่จะสูงโดยการศึกษาการขยายพันธุ์อินทผลัมด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งใช้ต้นพันธุ์จากประเทศอิสราเอลทำการตัดส่วนยอด ใบ และรากของต้นอินทผลัม ที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อ (อรดี และทวีพงศ์, 2530)

การปลูก

อินทผลัมจะใช้ระยะเวลาเพาะชำต้นกล้าไม่เท่ากัน แต่เมื่อปลูกจะใช้เวลาประมาณ 2 ปี เป็นอย่างน้อยจึงจะเริ่มให้ผลผลิตพื้นที่ปลูกควรเป็นที่ดอนไม่มีน้ำท่วมขังเป็นเวลานานดินระบายน้ำได้ดี ดินร่วนปนทรายเหมาะสมที่สุดการย้ายต้นกล้ามาปลูกจะขุดหลุมขนาดพอเหมาะกับต้นกล้าที่จะปลูก วางต้นกล้าอย่าให้หน่ออยู่ลึกจนเกินไป ควรปลูกเสมอหน้าดินเดิมหรือให้ดินกลบโคนต้นเล็กน้อยการลงปลูกใหม่ยังไม่ต้องใส่ปุ๋ย ควรใส่ปุ๋ยคอกจากมูลสัตว์รองก้นหลุมเพียงเล็กน้อย ส่วนการให้น้ำควรที่จะให้ทุกๆ 2-3 วัน เมื่อต้นตั้งตัวแล้วประมาณ 1 เดือน จึงจะเริ่มให้ปุ๋ยคอกอีกครั้งใส่ต้นละน้อย

การดูแลรักษา

อินทผลัมเป็นพืชเขตร้อนที่ปลูกในประเทศแถบตะวันออกกลางมีความทนต่อสภาพอากาศร้อน ทำให้ความใจว่าอินทผลัมเป็นพืชที่ต้องการน้ำในปริมาณที่น้อยแต่ในความเป็นจริงอินทผลัมเป็นพืชที่ต้องการน้ำในปริมาณที่มากประมาณ 2000-2500 มิลลิลิตร ปัจจุบันอินทผลัมนิยมปลูกในภาคใต้ ภาคอีสาน และภาคเหนือ

การให้น้ำ

เมื่อนำอินทผลัมลงปลูกจะต้องพยายามรดน้ำไม่ให้ขาดอย่างน้อยวันละ 1ครั้ง เมื่อระยะเวลาผ่านไปประมาณ 1 เดือน จึงค่อยๆลดการให้น้ำลง และเปลี่ยนแปลงการให้น้ำ ไปตามสภาพความแห้งของหน้าดินเป็นหลัก ในฤดูร้อนควรให้ 7-10 วันครั้ง ในฤดูร้อนไม่ต้องให้น้ำก็ได้ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสะสมความชื้นหรือชุ่มน้ำมากเกินไป จะเป็นสาเหตุการเกิดโรคเนื่องจากอินทผลัมเป็นพืชอาศัยได้ดีในสภาพภูมิอากาศแห้งแล้ง เมื่ออินทผลัมอายุประมาณ 3 ปี จะเริ่มสะสมอาหารในช่วงเดือนธันวาคม-มกราคม เป็นช่วงที่จะต้องให้น้ำอย่างสม่ำเสมออย่างน้อยอาทิตย์ละ 1 ครั้งเพื่อให้ต้นอินทผลัมสะสมอาหารและต้องให้น้ำแบบนี้ไปเรื่อยๆจนกว่าจะเข้าฤดูฝน ไม่ควรให้อินทผลัมขาดน้ำ

การใส่ปุ๋ย

การใส่ปุ๋ยอินทผลัมเริ่มแรกควรที่จะใส่ปุ๋ยคอกเพื่อให้อินทผลัมสามารถตั้งต้นได้ และแข็งแรง เมื่อต้นอินทผลัมมีอายุได้ 1-3 ปี ให้เริ่มใส่ปุ๋ยคอกปีละ 2 ครั้ง ใส่บริเวณรอบๆโคนต้น และเสริมด้วยธาตุอาหารเสริมปีละ 2 ครั้ง ช่วงปีที่ 1-2 ควรที่จะใช้ปุ๋ยสูตร 25-7-7 หรือ 20-10-10 ผสมกับปุ๋ยคอกเพื่อสร้างราก สร้างลำต้นที่แข็งแรง ปีที่3 เป็นปีที่จะเริ่มออกดอกติดผล ควรใส่ปุ๋ยคอก เช่น มูลค้างคาว มูลไก่ เมื่อถึงปลายฤดูฝนเดือนตุลาคม ใส่ปุ๋ยอินทรีย์อีกครั้งแล้วหยุดให้น้ำ อินทผาลัมจะเริ่มออกดอกตั้งแต่เดือนธันวาคม-มีนาคม หลังจากอินทผลัมอายุ 3 ปีขึ้นไปควรใช้ปุ๋ยสูตร 8-24-24 และลดปุ๋ยคอกให้น้อยลง

การตัดแต่งทางใบ

การตัดแต่งทางใบรวมไปถึงการตัดแต่งหนาม ปกติจะตัดปีละ 1 ครั้ง ในช่วงเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์ หรือในช่วงที่ต้นอินทผลัมมีการแทงจั่นเพื่อให้ง่ายต่อการผสมเกสร และการจัดการกับช่อผลอินทผลัม ไม่ให้ใบเก่าเป็นที่อยู่ของโรคและแมลง ป้องกันไม่ใช้เกิดอันตรายในขณะที่ทำงาน เนื่องจากโคนใบของอินทผลัมจะมีหนามที่ยาวและแข็ง การตัดแต่งทางใบควรตัดเฉพาะใบล่าง ไม่ควรที่จะตัดใบรอบๆ ต้นเพราะจะทำให้จำนวนใบน้อย ควรระมัดระวังไม่ให้ต้นอินทผลัมเกิดบาดแผล เพราะจะทำให้ด้วงงวงเข้าทำลายได้ง่าย

การผสมเกสรอินทผลัม

เนื่องจากอินทผลัมมีต้นเพศผู้ และต้นเพศเมียที่แยกต้นกัน การอาศัยธรรมชาติจากลมและแมลงเพียงอย่างเดียวเพื่อช่วยในการผสมเกสรนั้น จะทำให้อินทผลัมติดลูกไม่ดก ดังนั้นจึงต้องอาศัยแรงงานคนเข้าช่วยในการผสมเกสรถึงจะทำให้อินทผลัมติดลูกดกที่สุด คือช่วงเวลา 09.00 น. ซึ่งเป็นช่วงที่ละอองเกสรมีความแข็งแรงทำให้ติดผลง่าย และดก อินทผลัมจะออกดอกเป็นจั่นก่อนปกติแล้วอินทผลัมต้นเพศผู้จะออกดอกก่อนต้นตัวเมีย ประมาณ 15 วัน จึงจำเป็นต้องมีการเก็บละอองเกสรเพศ ไว้รอผสมกับละอองเกสรต้นเพศเมีย มิฉะนั้นละอองเกสรเพศผู้จะร่วง

วิธีการผสมเกสรอินทผลัมเมื่อดอกเพศผู้แตกออกมาเห็นกลีบดอกสีขาวเป็นแฉกๆ ให้นำถุงพลาสติกขนาดใหญ่กว่าช่อดอกเล็กน้อยมาคลุมแล้วผูกปากถุงมัดไว้ที่โคนจั่น จากนั้นตัดช่อดอกออกนำมาเขย่าจะได้ละอองเรณูตกลงมาให้นำละอองเรณูใส่ถุง ปิดปากให้แน่นสนิทแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นช่องปกติ ซึ่งสามารถเก็บรักษาละอองเกสร ไว้ได้นานเป็นปีเพื่อรอการผสมเกสรให้กับเกสรเพศเมีย สำหรับการผสมเกสรอีกวิธีหนึ่งที่ให้ผลใกล้เคียงกันคือการที่นำดอกเพศผู้ทั้งช่อมาเก็บไว้ในตู้เย็นช่องปกติ เมื่อช่อดอกเพศเมียแตกออกมาให้ตัดก้านเกสรเพศผู้มา 1 ก้าน หรือ 1 ทะลาย เสร็จแล้วรวบมัดส่วนโคน และส่วนปลายช่อดอกเพศเมียไว้ให้ก้านเกสรตัวผู้อยู่ตรงกลางช่อดอกเพศเมีย นำถุงพลาสติกขนาดใหญ่กว่าช่อดอกเล็กน้อยมาครอบช่อดอกเพศเมียไว้ แล้วมัดไว้ปิดปากถุงไว้กับโคนช่อดอกเพศเมีย เขย่าช่อดอกให้ละอองเรณูเพศผู้กระจายและทิ้งไว้ 10 วัน หรือจนกระทั่งเริ่มติดลูกให้เห็นบ้างแล้วจึงแกะถุงออกแม้จะได้ผลอินทผลัมในปริมาณมาก แต่ในปริมาณที่มากนี้กลับไม่เป็นผลดีมากนักจึงต้องทำการปลิดผลอินทผลัมบางส่วนออกบ้าง ในขณะที่ผลยังมีขนาดเล็กอยู่ประมาณปลายนิ้วก้อยเพื่อให้ผลอินทผลัมที่เหลืออยู่มีขนาดใหญ่ มีคุณภาพดี สุกเร็ว ติดขั้วไม่หล่นร่วงง่ายทำให้มีราคาจำหน่ายได้สูง และเป็นที่ต้องการของตลาด โดยให้มีผลอินทผลัมเหลืออยู่ในแต่ละก้านผลประมาณ 20-25 ผล และมีก้านผลอยู่ 45-50 ก้าน ต่อ 1 ช่อ (ทลาย) การปล่อยให้แต่ละทลายมี

จำนวนก้านและติดผลดกมากจนเกินไปจะทำให้ผลที่ได้มีขนาดเล็กและผลบางส่วนไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเกิดการแย่งสารอาหารกันเอง (อภิชาติ และคณะ, 2556)

สิ่งที่ควรคำนึงในการปลูกต้นอินทผลัม คือจะต้องมีทั้งต้นเพศผู้ และต้นเพศเมีย ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 คือ เพศผู้ 1 ต้น ต่อ เพศเมีย 5 ต้น เพื่อการผสมเกสรให้เพียงพอต่อพื้นที่ในการปลูก สำหรับเกษตร ที่ปลูกเป็นการค้านิยมใช้การขยายพันธุ์แบบแยกหน่อและการปลูกขยายพันธุ์แบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากต้นพ่อต้นแม่สายพันธุ์ดีที่ดีเพราะจะทำให้ได้ต้นเพศผู้ เพศเมียที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ และไม่นิยมใช้การปลูกต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ด ซึ่งการปลูกแบบเพาะเมล็ดมักจะปลูกกันในเชิงวิจัย และพัฒนาสายพันธุ์มากกว่า แต่การปลูกแบบแยกหน่อ และการปลูกแบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะใช้ต้นทุนค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในประเทศไทยยังต้องทำการสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้ง อินทผลัมยังเป็นพืชใหม่ในประเทศไทย (กองบรรณาธิการเมืองไม้ผล, 2558)

การแยกต้นเพศผู้ และต้นเพศเมียของอินทผลัม

อินทผลัมเป็นพืชที่ต้องมีทั้งต้นเพศผู้ และเพศเมีย การผสมเกสรจึงจะติดผล โดยที่ต้นเพศผู้เพื่อใช้ละอองเกสรมาช่วยในการผสมพันธุ์ ในการผสมเกสรก็จะได้อินทผลัมลูกผสมขึ้นมา สามารถนำไปเพาะปลูกขยายพันธุ์ได้ อินทผลัม ลูกผสมนี้จะไม่เหมือนกับต้นพ่อและต้นแม่ คือจะมีการกลายพันธุ์ได้สูง และอาจจะไม่ได้ผลผลิต ไม่เหมือนเดิมด้วยอีกทั้งยังต้องลุ้นว่าจะได้ต้นเพศผู้ หรือต้นเพศเมีย ส่วนใหญ่การคัดแยกเพศว่า เป็นต้นเพศผู้ หรือต้นเพศเมีย จะทำได้และสามารถยืนยันได้ก็ต่อเมื่อต้นอินทผลัมอายุ 3-4 ปี คือเริ่มแตกจั่น แทงช่อดอกขึ้นมาแล้ว โดยการสังเกตที่จั่นของต้นเพศผู้ จะมีทรงอ้วนป้อมกว่าจั่นของเพศเมีย และจั่นของเพศเมียจะมีลักษณะเรียวยาว ซึ่งจั่นของต้นเพศผู้จะแทงช่อดอกก่อนจั่นของเพศเมีย อย่างน้อย 15 วัน ในการผสมเกสรในรุ่นแรกๆ จะยังได้ไม่ค่อยดี แต่จั่นของเพศผู้ หรือว่าช่อดอกของเพศผู้ เมื่อแตกเป็นช่อดอกออกมาแล้ว สามารถตัดออกมาทั้งจั่นใส่ถุงพลาสติกมัดปาก นำมาแช่ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นาน 6-12 เดือน หรืออาจจะตัดเฉพาะละอองเกสรนำมาใส่ถุงแช่ตู้เย็นสำหรับการสังเกตเกสร ในกรณีที่ดอกเป็นเกสรตัวผู้ เมื่อจั่นแทงโผล่ออกจากส่วนยอดมีลักษณะทรงอ้วนและแตกออกเป็นช่อแล้วจะมีช่อดอกเป็นกลีบๆ สีขาวเรียงติดกันยาวในก้านดอกเดียวกันคล้ายหางกระรอก มีละอองเกสรกระจัดกระจายอยู่ด้วย ส่วนเกสรตัวเมียเมื่อจั่นแทงโผล่ออกมาจากส่วนยอด มีลักษณะทรงเรียวยาวแตกต่างจากต้นตัวผู้อย่างเห็นได้ชัด และแตกออกเป็นช่อแล้วในจั่นมีช่อดอกเป็นตุ่มๆ สีเหลืองปนเขียวอ่อนๆ (วีรพันธ์, 2556)

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker)

ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตรู้จักในชื่อว่ายีน คือหน่วยพันธุกรรมหรือหน่วยควบคุมลักษณะเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวแบบเฉพาะตั้งอยู่บนโครโมโซม ประกอบด้วยส่วนที่ควบคุมการแสดงออก (promoter) และส่วนโครงสร้าง (structural) ความแตกต่างของยีนที่เกิดขึ้นจากการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่าง การแสดงออกของยีนจะแสดงออกในรูปของลักษณะฟีโนไทป์ส่วนข้อมูลทางพันธุกรรมจะแสดงออกผ่านทางอาร์เอ็นเอซึ่งเกี่ยวกับขบวนการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นๆ ลักษณะต่างๆ ที่ปรากฏในสิ่งมีชีวิตเกิดจากผลรวมของการทำงานร่วมกันของโปรตีนต่างๆนั้นเอง

ความหมายโดยทั่วไปของคำว่า เครื่องหมาย คือสิ่งที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งสองสิ่งซึ่งสามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลเป็นสิ่งที่บอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้

อรรัตน์ (2548) ได้กล่าวไว้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เป็นที่มาของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ที่ระดับสัณฐานวิทยา (morphological marker) ระดับชีวเคมี (biochemical marker) และระดับโมเลกุล (molecular marker หรือ DNA marker) ดังนั้น genetic marker จึงมี 3 ประเภทตามระดับการแสดงออก

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นได้ทันที เป็นลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตนั้นเองแต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดที่สำคัญ คือการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยามักจะได้รับผลกระทบ จากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่น ความสูงต้น ผลผลิต

2. เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical marker) เป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้น จากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ วิธีการศึกษาเอนไซม์ค่อนข้างง่ายและจัดว่าไม่แพงแต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดที่แสดงออกของเอนไซม์ ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงและระยะการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกับเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะเจาะจงต่ำ กล่าวคือถ้ายีนควบคุมการสร้างเอนไซม์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเล็กน้อย ซึ่งอาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิโนหรืออาจไม่มีก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียงเล็กน้อยนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้

3. เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เป็นเครื่องหมายที่สร้างมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA) ดังนั้นเครื่องหมายชนิดนี้จึงถูกเรียกว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ และมีข้อได้เปรียบกว่าเครื่องหมายที่กล่าวมาทั้งสองชนิด ตรงที่มีจำนวนมากมายมหาศาล ดังที่ทราบแล้วว่าขนาดจีโนมของ

พืชมีประมาณ 10^8 - 10^9 นิวคลีโอไทด์ สภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายชนิดนี้จากจุดเด่นของเครื่องหมายโมเลกุลนี้ จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมายในการศึกษาจีโนมและวงการเกษตร ได้แก่ การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตและการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต การสร้างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) เพื่อใช้ตรวจสอบโรคหรือตรวจหาสิ่งที่ต้องการ การสร้างแผนที่โครโมโซมการหาตำแหน่งที่ต้องการบนโครโมโซมและการแยกสกัดยีนโดยอาศัยแผนที่และการใช้เครื่องหมายเพื่อตรวจสอบเพศ คัดเลือกลักษณะที่สำคัญและคัดเลือกยาก

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่มาของการศึกษาเพื่อบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณ และคุณภาพอาจเป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่างและภายในสปีชีส์ (between and within species) ระหว่างและภายในประชากร (between and within population) หรือระหว่างแต่ละตัว (between individual) (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) บ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชิวิตตัวหนึ่งสายพันธุ์หนึ่งสปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งหนึ่งๆบนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนั้นเอง ซึ่งการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีหลายประการคือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรจึงสามารถเก็บรักษาได้ตรวจสอบได้เป็นเวลานานโดยไม่เสื่อมสภาพและเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากันจึงสามารถตรวจสอบได้จากเนื้อเยื่อใดๆ และตลอดระยะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้จากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ มีหรือไม่มีการแสดงออกของยีนก็ได้จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนมประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ แบบต่างๆให้เลือกมากมายการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงสามารถทำได้อย่างกว้างขวาง (สุรินทร์, 2545)

ปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เพื่อจำแนกหรือตรวจสอบลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอได้ โดย (Botstein *et al.*, 1980) ได้พัฒนาเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism, RFLP) ซึ่งเป็นเทคนิคแรกที่เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในระดับดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักของความแตกต่างในลำดับเบสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อเสีย คือ ต้องใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจำนวนมากและดีเอ็นเอต้องมีคุณภาพดีอีกทั้งมีขั้นตอน ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายที่สูง (Kaundun *et al.*, 2000) ต่อมานักวิทยาศาตร์พยายามค้นหาเทคนิคใหม่ๆ มาทดแทน ได้แก่ เทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งอาศัยกระบวนการพีซีอาร์เข้าช่วยเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR)

มาลินี (2552) กล่าวไว้ว่าเทคนิคพีซีอาร์ เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะขึ้นในหลอดทดลองโดยทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ จากการทำปฏิกิริยาร่วมกันระหว่าง (1) เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (2) ดีเอ็นเอสายสั้นๆ สองสายหรือไพร์เมอร์ (DNA primer) ที่เป็นจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่เป็นตัวกำหนดขนาดของดีเอ็นเอที่ทำการสังเคราะห์ (3) นิวคลีโอไทด์อิสระ และ (4) สายดีเอ็นเอเป้าหมาย ภายในหลอดทดลองภายหลังปฏิกิริยาจะได้สายดีเอ็นเอสายใหม่จำนวนมากที่ถูกกำหนดขนาด ตามระยะห่างไพร์เมอร์ทั้ง 2 สายที่จับบนสายต้นแบบเมื่อเริ่มปฏิกิริยาสังเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้รับการพัฒนาจากเทคนิคพีซีอาร์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. ประเภทที่มีไพร์เมอร์ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific primer) เครื่องหมายชนิดนี้มีบริเวณจับบนสายดีเอ็นเอที่สนใจในตำแหน่งที่แน่นอน ได้แก่ Sequence Tagged Site (STS) และ Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) หรือ Microsatellite

2. ประเภทที่มีไพร์เมอร์ชนิดที่ไม่จำเพาะเจะจง (random primer) เครื่องหมายชนิดนี้สามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้หลายๆ ตำแหน่งได้แก่ อาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD) และเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism, AFLP) ผลที่ได้จากการตรวจสอบคือแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นโดยขนาดของ ชิ้นดีเอ็นเอจะถูกกำหนดจากตำแหน่งที่ไพร์เมอร์ใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์จับบนสายดีเอ็นเอ ที่ต่างกันจึงทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดต่างกัน

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล เป็นการศึกษาลึกลงไปถึงความแตกต่างในระดับของยีน ที่ทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายโมเลกุล จึงได้นำมาใช้ในงานหลายด้านๆ เช่น การสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม (DNA fingerprint) การแยกสายพันธุ์ (varietal identification) การแยกเพศ (sex determination) การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) การหาตำแหน่งของยีน (gene tagging) และการนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ (หัทยา, 2548)

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยการใช้เทคนิคไฮบริไดเซชั่น (hybridization) ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) (Kochert *et al.*, 1994; McCouch and Tanksley, 1991; Tanksley *et al.,* 1989; สุรีพร, 2546)

2. PCR-based marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอหรือเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD) (Williams *et al.,* 1990) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) (Vos *et al.*, 1995) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR marker) (Brown *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996; สุรีพร, 2546) เป็นต้น และปัจจุบันมีการคิดค้นและใช้เทคนิคโมเลกุลในระดับดีเอ็นเอหลายชนิด ซึ่งเทคนิคแต่ละชนิดมีวิธีการและวัตถุประสงค์แตกต่างกันไป เช่น ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช การหาตำแหน่งของยีน (gene tagging) การทำแผนที่ยีน (gene mapping) หรือใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกลักษณะสำคัญต่างๆ เช่นการตรวจสอบเพศโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2554)

อาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA)

อาร์เอพีดี เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย (Welsh and McClelland, 1990) และ (Williams *et al.*, 1990) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพร์เมอร์สายสั้นๆ ขนาด 10 ถึง 12 เบส ที่เกาะแบบสุ่มบนส่วนของจีโนม ที่ต้องตรวจสอบปฏิกิริยาอาร์เอพีดีเป็นปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั่วไป เพียงแต่อาร์เอพีดีใช้ไพร์เมอร์เพียงข้างเดียว สามารถเกาะได้โดยสุ่มมากที่สุดและเกิดการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ แต่เนื่องจากทิศทางการเกาะของไพร์เมอร์ไม่แน่นอนแต่การที่เอนไซม์จะนำเบสมาต่อกับไพร์เมอร์ให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่เฉพาะในทิศทางบริเวณปลาย 3’ ของไพร์เมอร์เท่านั้น โดยมีหลักการดังนี้

หลักการของอาร์เอพีดีโดยทั่วไปก็เป็นปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือการทำให้เส้นดีเอ็นเอเป้าหมายแยกเป็นสายเดี่ยวแล้วให้ไพร์เมอร์ไปเกาะตรงบริเวณที่เป็นคู่สมกันและเอนไซม์ DNA polymeraseก็จะนำนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับเส้นแม่พิมพ์มาต่อกับไพร์เมอร์จนเป็นเส้นยาว เกิดเป็นเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมา ต่อจากนั้นก็เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่หลายๆรอบจนเกิดการจำลองเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นปริมาณมากจนสามารถมองเห็นได้ชัดเมื่อย้อมสี

มีรายงานเกี่ยวกับใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอาร์เอพีดี วลัยลักษณ์ และเจษฎา (2554) ได้ศึกษาเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ และการระบุเพศของสละหม้อจากจังหวัดจันทบุรีพืชสกุลระกำ (salacca) โดยเก็บตัวอย่างพันธุ์ระกำมี 3 พันธุ์ โดยเริ่มจากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ทั้ง 3 พันธุ์ ผลการวิเคราะห์โดยใช้ไพเมอร์ จำนวน 187 ไพรเมอร์ พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ของพืชสกุลระกำซึ่งในจำนวน 5 ไพรเมอร์ นี้พบว่ามีเพียง 1 ไพรเมอร์ (NAPS062) ที่แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจทั้ง 3 พันธุ์ และให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 410 คู่เบสที่มีความจำเพาะต่อสละหม้อเพศเมียเท่านั้น

Alstrom-Rapaport *et al.* (1998) ได้กล่าวว่าได้มีการใช้เครื่องหมาย DNA แบบ Random Ampified Poiymorphic (RAPD) ร่วมกับการใช้เทคนิค Bulked Segregant Analysis (BSA) ระบุเพศใน Basket Willow พบว่าเครื่องหมาย DNA หมายเลข UBC 354 สามารถใช้ในการจำแนกเพศได้ ต่อมา Al-Khalifah and Askari, (2003) ใช้วิธี Random Ampified Polymorphic (RAPD) จำแนกสายพันธุ์อินทผาลัม 13 สายพันธุ์ที่ปลูกในซาอุดิอาราเบีย ซึ่ง RAPD เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ แบบหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีก เช่น arbitrarily primed PCR (AP-PCR) (Mirbahar *et al.,* 2014) DNA amplification fingerprinting(DAF) หรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีที่เรียกนี้มีข้อแตกต่างกันบ้าง คือ ขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่หลักการไม่แตกต่างกัน คือ ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม

เอสเอสอาร์ หรือไมโครแซทแทลไลท์ (simple sequence repeats (SSR) หรือ microsatellite

เอสเอสอาร์ หรือไมโครแซทแทลไลท์ เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความแปรผันของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิตสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีโดยที่โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทแทลไลท์ ในตำแหน่งโลกัสหนึ่งๆ (Powell *et al*., 1996) ไมโครแซทแทลไลท์มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น simple sequence repeat, (SSR) simple sequence length polymorphisms, (SSLP) และ sequence tagged microsatellite site, (STMS) เป็นต้น

โดยทั่วไปไมโครแซทแทลไลน์จะประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) มีตั้งแต่ 1-6 เบส โดยเบสซ้ำหนึ่งเบส เรียกว่า mono-nucleotide repeat ซ้ำสองเบสเรียกว่า di-nucleotide repeat ซ้ำสามเบสเรียกว่า tri-nucleotide repeat และซ้ำสี่เบสเรียกว่า tetra-nucleotide repeat เบสซ้ำเหล่านี้ พบกระจายอยู่บริเวณต่างๆของจีโนมประมาณ 10^4-10^5 โลกัส ในจีโนมของพืชเขตร้อน โดยการออกแบบไพร์เมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสที่จำเพาะ ซึ่งเรียกว่าไมโครแซทแทลไลท์ไพร์เมอร์ หรือเอสเอสอาร์ไพร์เมอร์ ไพร์เมอร์เหล่านี้จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วน ที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่าง unique sequence ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งเป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากัน ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต (Brown *et al.,* 1996; Morgante andOlivieri, 1993; Paterson, 1996; สุรีพร, 2546)

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทแทลไลท์นั้นจะประกอบด้วยด้วยการค้นหา และออกแบบ ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับเบสจำเพาะในแต่ละตำแหน่งของไมโครแซทแทลไลท์ ดังนั้นไมโครแซทแทลไลท์หนึ่งคู่ จึงหมายถึงไมโครแซทแทลไลท์ในหนึ่งตำแหน่ง

ปัจจุบันการปรับปรุงประสิทธิภาพการค้นหา และแยกเครื่องหมายไมโครแซทแทลไลท์ (isolation of microsatellite clone) โดยการสร้าง SSR-enriched library ขึ้นในพืชชนิดนั้นๆ ซึ่งพบว่าวิธีดังกล่าวจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทแทลไลท์ได้จำนวนมากและรวดเร็วขึ้น มีรายงานเกี่ยวกับใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบไมโครแซทแทลไลท์หรือเอสเอสอาร์ดังนี้ Elmeer and Mattat (2012) ใช้ SSR แยกความแตกต่างทางเพศของอินทผลัม ซึ่งเครื่องหมายเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างแบบข่มร่วมทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัสและเฮทเทอโรไซกัสได้ซึ่งมีบทบาทอย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 25 ไพรเมอร์ซึ่งมีอยู่ 22 ไพร์เมอร์ที่แสดงความแตกต่างใน 16 สายพันธุ์ของอินทผลัมมที่มาจากอิหร่าน อิรัก และแอฟริกา (Sedra *et al.*, 1998)

สการ์ (sequence characterize amplified region , SCAR)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้พัฒนามาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์แบบสุ่มหลายๆตำแหน่ง เช่นอาร์เอพีดี หรือเอเอฟแอลพีโดยการตัดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี หรือเอเอฟแอลพีแยกออกมา เพื่อนำมาโคลนแล้วหาลำดับเบสจากนั้นออกแบบไพร์เมอร์คู่ใหม่จากลำดับเบสที่ได้ และเพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์เมื่อทำการตรวจสอบจะพบความแตกต่างในลักษณะการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอแบบเดียวกับเครื่องหมายเดิมแต่เป็นการเพิ่มปริมาณ โดยพีซีอาร์เพียง 1 ตำแหน่ง ซึ่งมีความแม่นยำ และรวดเร็วกว่า (สุรินทร์, 2554)

การประยุกต์ใช้เทคนิค SCAR เพื่อจำแนกพันธุ์พืช

Kim *et al.*, (2000) ศึกษาการใช้ SCAR marker เพื่อระบุพันธุ์สาลี่ จำนวน 19 สายพันธุ์ โดยออกแบบคู่ SCAR primer ที่จำเพาะจำนวน 7 คู่ คือ LCH322 LCH322-1 LCH322-4 LCH350 LCH351 LCH384 และLCH387 จากลำดับนิวคลีโอไทค์ของ RAPD marker ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดที่แตกต่างกันทำให้สามารถจำแนกสาลี่ทั้ง 19 พันธุ์ได้

Bautista *et al.,* (2003) สามารถระบุพันธุ์มะกอกจำนวน 22 สายพันธุ์ ที่มาจากพื้นที่ ทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันได้ โดยใช้ SCAR marker จำนวน 10 คู่ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RAPD marker

Mariniello *et al.*, (2002) สามารถจำแนกสายพันธุ์แอพริคอต จำนวน 19 สายพันธุ์ โดย ใช้ RAPD marker ซึ่งพบว่ามีไพร์เมอร์ 1 หมายเลขจากทั้งหมด 44 หมายเลข ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของแอพริคอต และพบว่า SCAR marker ที่ได้มาจาก RAPD marker สามารถจำแนกพันธุ์ แอพริคอตจากทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี อเมริกาเหนือ และประเทศกรีซออกจากกันได้

Wang *et al.,* (2007) ตรวจสอบพันธุ์สตอเบอร์รี่จำนวน 32 สายพันธุ์ โดยใช้ RAPD และ SCAR marker พบว่ามี RAPD primer 8 หมายเลข ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 71 แถบ สามารถจำแนกสตอเบอร์รี่ได้จำนวน 25 สายพันธุ์ และพบว่า SCAR marker ที่พัฒนาจาก RAPD marker จำนวน 2 หมายเลข คือ WS01 และ WS02 ให้ผลที่สอดคล้องกับผลของ RAPD marker ซึ่งสามารถ จำแนกสตอเบอร์รี่จำนวน 25 สายพันธุ์ได้

Dhawan *et al.,* (2013) ได้พัฒนาเครื่องหมาย DNA แบบ SCAR เพื่อใช้ระบุเพศในอินทผลัมโดยใช้เทคนิค Bulked Segregant Analysis (BSA) ซึ่งพัฒนาจากเครื่องหมาย RAPD เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์อินทผลัมที่เป็นพันธุ์การค้าในทวีปแอฟริกา อเมริกา เอเชียใต้และออสเตรเลีย

นพรัตน์ และคณะ (2015) ได้พัฒนาเครื่องหมาย DNA แบบ SCAR เพื่อใช้ในการระบุเพศในอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36

Bulked Segregant Analysis (BSA)

เป็นวิธีที่ใช้เพื่อการค้นหาความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม คือ DNA pool และ DNA bulk ที่ได้จากประชากรที่มีการกระจายตัว โดยที่ประชากรนี้สร้างมาจากการผสมระหว่างพ่อแม่คู่เดี่ยวในดีเอ็นเอแต่ละกลุ่มประกอบด้วยดีเอ็นเอของพืชที่มีจีโนไทป์ของลักษณะที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษาเหมือนกัน แต่จีโนไทป์ของลักษณะอื่นๆ เป็นอย่างไรก็ได้ ดังนั้นดีเอ็นเอรวมทั้ง 2 กลุ่ม (DNA bulk) ย่อมมีความแตกต่างกันเฉพาะบริเวณที่มียีนควบคุมลักษณะที่สนใจและในขณะเดียวกันดีเอ็นเอรวม 2 กลุ่ม มีจีโนไทป์ของบริเวณอื่นๆ ที่นอกเหนือจากบริเวณยีนที่สนใจแตกต่างกัน ทำให้ดีเอ็นเอรวมทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันในบริเวณอื่นๆ เมื่อนำดีเอ็นเอรวมทั้ง 2 กลุ่ม มาตรวจสอบหาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางโมเลกุลเครื่องหมายเปิดโอกาสให้พบเครื่องหมายในบริเวณที่มียีนนั้นได้เร็วขึ้น (Michelmore *et al.*, 1991)

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

อินทผลัมที่ใช้ในการศึกษา

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการกำหนดเพศของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างอินทผลัมพันธุ์บาร์ฮีเป็นพันธุ์แม่ ที่เป็นพันธุ์รับประทานผลสด และอินทผลัมพันธุ์เดดเล็ทนัวร์ เป็นพันธุ์พ่อที่เป็นพันธุ์รับประทานผลแห้ง (วีรพันธ์,2556) ซึ่งอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 เป็นอินทผลัมพันธุ์รับประทานผลสด ที่มีรสชาติหวานซึ่งลักษณะประจำพันธุ์ของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 จะเริ่มให้ผลผลิตเมื่ออายุได้ 4 ปี สำหรับใช้เป็นพันธุ์เพื่อตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ที่ใช้ในการกำหนดเพศของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 ร่วมกับการใช้เทคนิค Bulked Segregant Analysis (BSA)

เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุล ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine, Biometra model GRADIENT. Germany) ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตู้แช่ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Li-Cor, Biosciences. USA) ไมโครปิเปต บีกเกอร์ และหลอดทดลองขนาดต่างๆ เป็นต้น

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยา ได้แก่ 10x PCR buffer, 50mM $MgCl_2$, 1mM dNTPs, 2mM Primer, *Taq* DNA polymerase, 2x CTAB, Isopropanal, 1x TE buffer, chloroform-isoamy alcohol, isopropanal, 75% ethanol, TAE buffer, และกลั่น เป็นต้น

วิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเออินทผลัม

การสกัดดีเอ็นเอเป็นการทำให้เซลล์แตกและแยกออกจากองค์ประกอบอื่นๆในเซลล์ โดยใช้ buffer ที่มีส่วนประกอบของ Tris-buffer ทำหน้าที่ในการปรับความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งมีผลทำให้เกิดการคลายตัวระหว่างโปรตีนและดีเอ็นเอ การสกัดดีเอ็นเอต้นเพศผู้และต้นเพศเมียรายต้นด้วยสารละลาย CTAB 2 ชนิด ชนิดแรกประกอบด้วยสารละลาย 100mM TrisHCl pH 8.0 20mM EDTA pH 8.0 1.4 NaCl และ CTAB (2%) ชนิดที่สองประกอบไปด้วยสารละลาย 100 mM TrisCl pH 8.0 20 mM EDTA pH 8.0 1.4 NaCl CTAB (2%) และ PVP-400 (1%) ดัดแปลงมาจาก (Agrawal *et al.*, 1992; Doyle, 1987) และ (หทัยรัตน์ และคณะ, 2017) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

1.นำใบอ่อนอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 บดในโกร่งเติมไนโตรเจนเหลว รอให้ไนโตรเจนเหลวระเหยออกจนใกล้หมดจึงทำการบด จนได้เป็นผงละเอียด

2.เติมสารละลาย 2xCTAB buffer ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด และเติม 2-mercaptoehtanol (อุ่นที่ 60 องศาเซลเซียสก่อนใช้งาน)

3.บ่มในเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

4.เติมคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ผสมกันให้ เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดทดลองกลับไปกลับมา

5.นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อที่จะแยกชั้นตะกอนดีเอ็นเอ

6.เตรียมหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตรแล้วดูดสารละลายที่แขวนลอยอยู่ชั้นบนมาใส่หลอดทดลองที่เติม isopropanol ไว้ กลับหลอดไปมาเบาๆ นำเข้าตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศา เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง 15,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

7.เทของเหลวทิ้งแล้วตากหลอดทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างโดยการเติม 75% ethanol + 10mM ammonium acetate ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที แล้วนำเข้าไปปหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที เทของเหลวทิ้งแล้วตากไว้ เป็นเวลา 30 นาที เติม 75% ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปหมุนวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วตากทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน

8.เติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม RNase ปริมาตร 2 ไมโครลิตรจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าดีเอ็นเอละลายหมด แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสในกรณีที่ต้องการเก็บตัวอย่างไว้เป็นระยะเวลานาน

การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และการรวมดีเอ็นเอ (DNA pooling)

เตรียมอะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TAE buffer ผสมดีเอ็นเอตัวอย่างที่ละลายใน TE buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับ TE dye ปริมาตร 9 ไมโครลิตร หยดดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมกับ TE dye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในช่องหยดตัวอย่างในอะกาโรสเจลพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 500 300 100 นาโนกรัม ต่อ 10 ไมโครลิตร เพื่อประเมินความเข้มข้นโดยใช้วิธี minigel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ เป็นเวลา 30 นาที ในการเคลื่อนที่ของตัวอย่าง และดีเอ็นมาตรฐานใช้แถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue ที่มีใน TE dye เป็นตัวสังเกต ให้เคลื่อนตัวห่างจากช่องหยดตัวอย่างประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นนำอะกาโรสเจลมาแช่ในสารละลาย TAE buffer ที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาที บันทึกภาพถ่ายภายใต้แสงอัตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบความชัดเจน และความหนาของแถบ ประเมินความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้

นำดีเอ็นเอรายต้นที่ตรวจสอบความเข้มข้นเสร็จเรียบร้อยแล้วรวมดีเอ็นเออินทผลัมรายต้นเพศเมียจำนวน 10 ต้น ในปริมาณต้นละ 2500 นาโนกรัม และรวมดีเอ็นเอของอินทผาลัมรายต้นเพศผู้จำนวน 10 ต้น ปริมาณเท่ากัน แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

การทดลองที่ 2 การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดเพศอินทผลัม

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction , PCR) เทคนิค RAPD

องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัม 1x PCR buffer 0.4uM primer 200uM dNTPs 3mM $MgCl_2$ 0.8 unit *Taq* DNA polymerase และน้ำกลั่น ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ระยะ pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ในระยะ denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที ระยะ annealing ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 45 รอบ ระยะ extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ ระยะสิ้นสุดใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1x TAE buffer การทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 60 โวลล์ ใช้เวลา 120 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลอะกาโรสไปแช่ในสารละลายที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ไว้ 30 นาที แล้วจากนั้นแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ

การสำรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphisms) ของกลุ่มเพศเมีย และกลุ่มเพศผู้

คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอกลุ่มเพศเมีย กลุ่มเพศผู้ โดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏโดยพิจารณาแถบหลักที่มีความชัดเจน (major band) เท่านั้น ซึ่งจะใช้วิธีการรวมดีเอ็นเอ (bulk segregant analysis) จากอินทผลัมเพศเมีย 10 ต้น และอินทผลัมเพศผู้ 10 ต้น เพื่อใช้สำหรับสำรวจความแตกต่างระหว่างกลุ่มเพศเมีย และกลุ่มเพศผู้ เมื่อได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอ ได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมาทดสอบกับดีเอ็นเอรายต้นของอินทผลัมเพศเมีย และเพศผู้

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ที่ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1200 คู่เบส ในผลผลิตพีซีอาร์ ไพร์เมอร์หมายเลข OPP03 ของอินทผลัมเพศเมียและเพศผู้ เตรียมผลผลิตพีซีอาร์ที่ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ส่งตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ให้กับบริษัท Ward medic เพื่อหาลำดับเบสที่จะใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการแยกเพศอินทผลัมเพศเมียและเพศผู้ของพันธุ์แม่โจ้ 36

สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ฯ (ตึกกล้วยไม้) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

บ้านสวนอินทผลัมโกหลัก ตำบลศรีดงเย็น อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่

บ้านสวนอินทผลัมเชียงใหม่ ตำบลต้นเปา อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่

บ้านสวนวาสนาอินทผลัม ตำบลบ้านตาล อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่

บ้านสวนนวลณัฐทร ตำบลโชคชัย อำเภอโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา

ระยะเวลาดำเนินการทดลอง

เริ่มดำเนินการทดลองเดือน สิงหาคม 2558

สิ้นสุดการทดลองเดือน มิถุนายน 2560

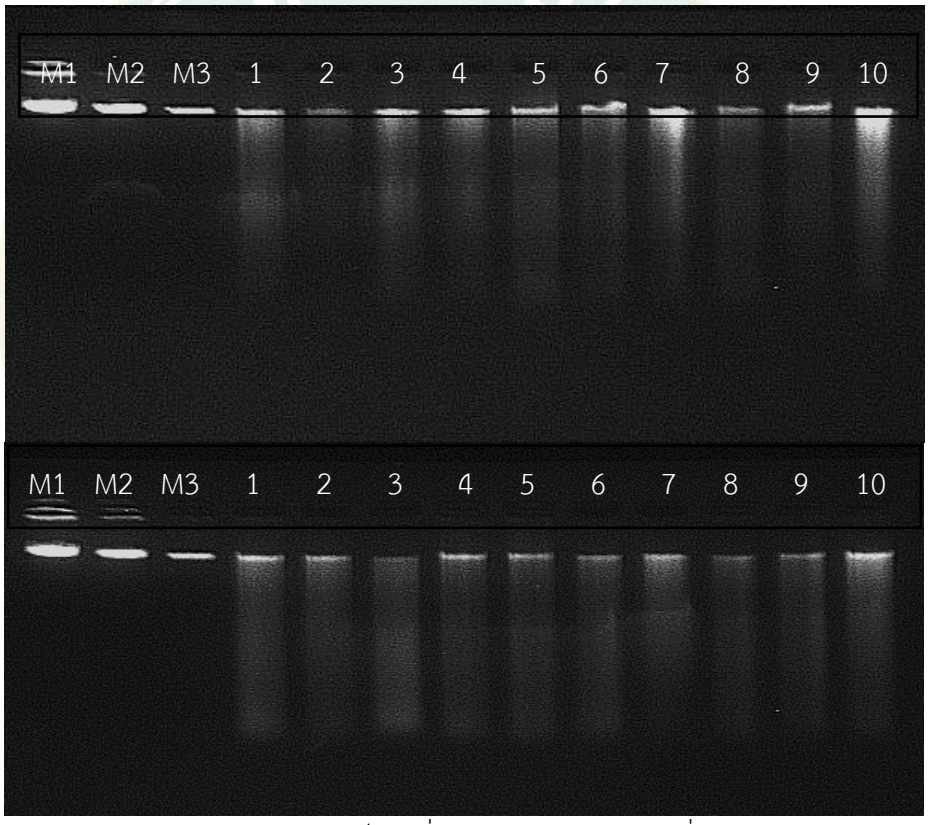
บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเออินทผลัม

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 จำนวน 20 ต้น เพศผู้ 10 ต้น และเพศเมีย 10 ต้น ที่เก็บจากบ้านสวนโกหลัก จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโพริซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด มีความหนาและความคมชัดต่างกัน การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานคือ 500 300 100 นาโนกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรความเข้มข้นของดีเอ็นเอดังแสดงใน ตารางที่ 1 และในภาพที่ 1-2 จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้สารละลาย 2xCTAB สองชนิด พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอใบอ่อนของต้นตัวเมีย ที่ใช้สารละลาย 2xCTAB ทีมีส่วนประกอบของ Tris-HCl ได้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเฉลี่ย 60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเปรียบเทียบกับใบอ่อนตัวตัวเมียที่ใช้สายละลาย 2xCTAB Tris-Cl ได้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเฉลี่ย 25.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร การสกัดดีเอ็นเอของใบอ่อนต้นเพศเมียที่มีการใช้สารละลาย CTAB ทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเช่นเดียวกัน ในส่วนของต้นเพศผู้ที่ใช้สารละลาย 2xCTAB ทีมีส่วนประกอบของ Tris-HCl ได้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเฉลี่ย 60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเปรียบเทียบกับใบอ่อนต้นเพศผู้ ที่มีการใช้สารละลาย 2xCTAB Tris-Cl ได้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเฉลี่ย 36.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากการใช้ใบอ่อนต้นเพศผู้และต้นเพศเมียมีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยการใช้ CTAB ที่มีส่วนประกอบของ Tris-HCl มีปริมาตรดีเอ็นเอเฉลี่ย 60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรแต่การใช้ CTAB ที่มีส่วนประกอบของ Tris-Cl มีปริมาตรดีเอ็นเอเฉลี่ย 31 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยสารละลาย 2xCTAB 2 ชนิด

ค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul)	n	ชนิดสารละลาย CTAB		t-value	*P-value*
		Tris-HCl	Tris-Cl		
ใบอ่อนต้นเพศเมีย	10	60	25.5	6.94	<0.01
ใบอ่อนต้นเพศตัวผู้	10	60	36.5	3.06	0.0052
รวมต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย	20	60	31.0	6.27	<0.01



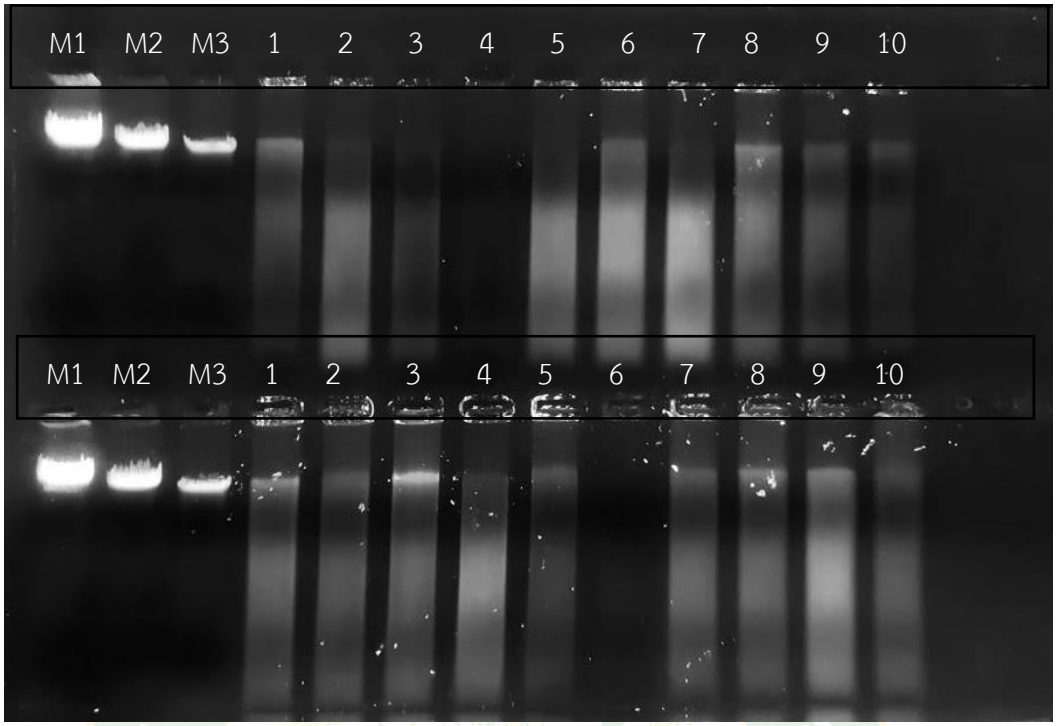
ภาพที่ 1 การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ 2x CTAB ที่มีส่วนประกอบของสารละลาย Tris-HCl (1% agarose gel)

หมายเหตุ Lane M1 คือ DNA Marker 500 นาโนกรัม

Lane M2 คือ DNA Marker 300 นาโนกรัม

Lane M3 คือ DNA Marker 100 นาโนกรัม

Lane 4-10 คือ เอ็นเอรายต้นของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 เพศเมีย และแถวล่างคือดีเอ็นเอรายต้นของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 เพศผู้



ภาพที่ 2 การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้ 2x CTAB ที่มีส่วนประกอบของสารละลาย Tris-Cl (1% agarose gel)

หมายเหตุ Lane M1 คือ DNA Marker 500 นาโนกรัม
Lane M2 คือ DNA Marker 300 นาโนกรัม
Lane M3 คือ DNA Marker 100 นาโนกรัม
Lane 4-10 คือ ดีเอ็นเอรายต้นของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 เพศเมีย และแถวล่างคือ ดีเอ็นเอรายต้นของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 เพศผู้

วิธีการสกัดดีเอ็นเอมีหลายวิธี แต่ละวิธีมีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชหรือเซลล์แต่ละชนิดและงานที่จะต้องนำไปใช้ คือต้องการใช้ดีเอ็นเอมากน้อยตามความเหมาะสม และมีความบริสุทธิ์ เช่นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์แบบสุ่ม (random primer) หรือต้องการดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ มีการแตกหักที่น้อย และต้องมีความบริสุทธิ์ การสกัดดีเอ็นเอนิยมสกัดดีเอ็นเอจากยอดอ่อนหรือต้นอ่อนเพราะมีเส้นใยน้อย ทำให้เซลล์แตก (สุรินทร์ ,2545) จากการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเออินทผลัมพบว่าดีเอ็นเออินทผลัม ที่สกัดโดยใช้วิธีการประยุกต์ของ Agrawal *et al*.,(1992) ตัวอย่างอินทผลัมมีคุณภาพดีสอดคล้องกับหทัยรัตน์ และคณะ (2017) กล่าวว่าการสกัดดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันดีเอ็นเอมีคุณภาพดีมีความเข้มข้นอยู่ที่ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และอดิศักดิ์ (2551) ที่ทำการประยุกต์วิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Agrawal *et al*.,(1992) พบว่าการสกัดดีเอ็นเอเจตมูลเพลิงขาว

และเจตมูลเพลิงแดงจะได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพที่ดีที่สุด สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพร์เมอร์แบบสุ่ม จากการศึกษาการเปรียบการสกัดดีเอ็นเอ 2 วิธี คือ วิธีประยุกต์ของ Agrawal *et al*.,(1992) และวิธีของ Dolye and Dolye (1987) อ้างจากงานวิจัยของชมนาทและเนตรชนก (2561) เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบโคลงเคลงที่ประยุกต์วิธีการสกัดดีเอ็นเอจาก Dolye and Dolye (1987) ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม และดีเอ็นเอมีคุณภาพดี เช่นเดียวกับธนกร และคณะ (2551) รายงานวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลช้างคือวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ประยุกต์จาก Dolye and Dolye (1987) นอกจากนี้ยังพบว่ามีงานวิจัยที่ศึกษาการเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอ ดังเช่นงานวิจัยของจิรพันธ์ (2545) ทำการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนใบมะตูมด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธีการ คือ (1) วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการของสุรินทร์ (2) วิธีการของ Agrawal *et al*.,(1992) (3) วิธีการของ Dellaporta *et al*.,(1987) พบว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการของสุรินทร์ให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงที่สุด และเอกพจน์ (2546) ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอในพืชตระกูลขิงด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB และวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Plant extraction buffer พบว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Plant extraction buffer ให้ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอมากกว่า และคุณภาพดีเอ็นเอดีกว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB

จากผลการทดลองพบว่าการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Agrawal *et al*.,(1992) อ้างโดยหทัยรัตน์และคณะ (2552) พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอมีคุณภาพที่ดีมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 60-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และได้ทำการรวมกลุ่มดีเอ็นเอเพศผู้และกลุ่มดีเอ็นเอเพศเมีย โดยใช้ดีเอ็นเอรายต้นปริมาณ 2500 นาโนกรัม กลุ่มละ 10 ต้น และได้ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอกลุ่มเพศผู้ และกลุ่มเพศเมียให้เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ให้ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

การทดลองที่ 2 การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการกำหนดเพศอินทผลัม

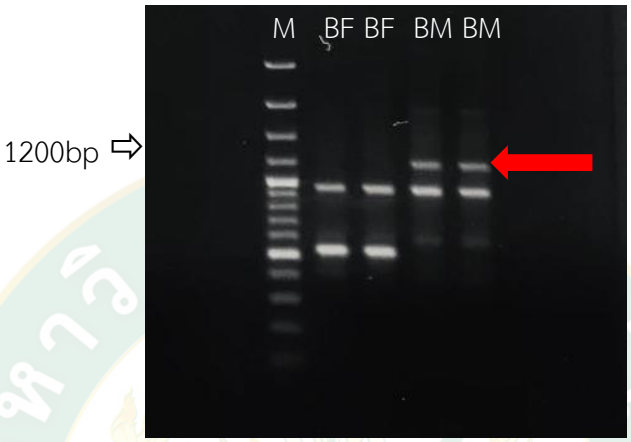
การสำรวจความแตกต่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกลุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอเพศผู้และกลุ่มเพศเมียที่เชื่อมโยงกับการระบุเพศอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 โดยใช้ไพร์เมอร์ของ Operon Technologies Inc (USA) ทั้งหมด 520 หมายเลข ได้แก่ ชุดไพรเมอร์ OPA , OPC, OPD, OPE, OPF, OPG, OPH, OPI, OPJ, OPK, OPL, OPM, OPN, OPO, OPP, OPR, OPS, OPT, OPU, OPV, OPW, OPX, OPY, OPZ,OPAH และ OPBH จำนวน 520 หมายเลข พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 7 หมายเลข แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ซ้ำอีก พบว่าไพรเมอร์ OPP03 แสดงรูปแบบลายพิมพ์ที่คงที่ และสามารถทำซ้ำได้ ดังแสดงในภาพที่ 3 ขณะที่ (Dhawan *et al*., 2013) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ RAPD ร่วมกับการรวมดีเอ็นเออินทผลัมกลุ่มเพศผู้และกลุ่มเพศเมีย ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 100 หมายเลข เพื่อจำแนกความแตกต่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างกลุ่ม พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ OPA02 ที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม แต่เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกลุ่มเพศผู้และกลุ่มเพศเมียในพันธุ์แม่โจ้ 36 ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม

ตารางที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นระหว่างกลุ่มเพศผู้และกลุ่มเพศเมียอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36

ไพรเมอร์	ลำดับเบส
OPD15	5’ CATCCGTGCT 3’
OPF04	5’ ACCCCCGAAG 3’
OPG05	5’ CTGAGACGGA 3’
OPG08	5’ ACCTCAGCTC 3’
OPK10	5’ GTGCAACGTG 3’
OPP03	5’ CTGATACGCC 3’
OPU02	5’ CTGAGGTCTC 3’

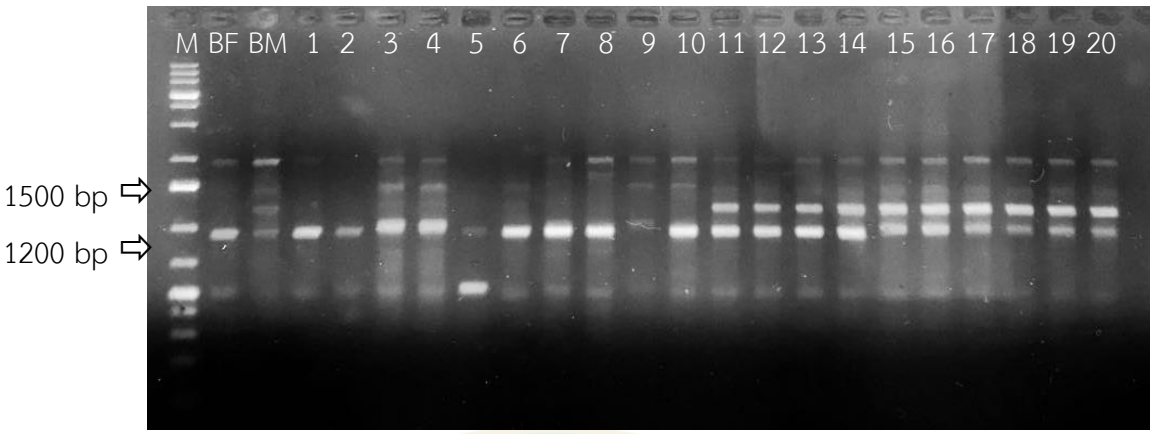
การยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเพศ

ดังนั้นจึงมีการทำซ้ำอีกครั้งเพื่อยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 จาก 7 เครื่องหมายที่พบความแตกต่างเมื่อทำซ้ำแล้วได้ตำแหน่งเดิมพบว่า มีเพียง 1 เครื่องหมายที่ได้ตำแหน่งเดิมคือ OPP03 ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การทำซ้ำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ระบุเพศ primer OPP03
(ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์กลุ่มเพศผู้ และกลุ่มเพศเมีย)
หมายเหตุ BF = กลุ่มดีเอ็นเอเพศเมีย BM = กลุ่มดีเอ็นเอเพศผู้

การตรวจสอบดีเอ็นเอตัวอย่างรายต้นของเพศผู้และเพศเมียไพรเมอร์ OPP03 พบว่าสามารถแสดงรายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ขนาดชิ้นส่วน 1200 bps ในการระบุเพศทุกตัวอย่าง และในเพศเมีย รายต้นทุกตัวอย่างไม่พบการปรากฏของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งชิ้นส่วนดังกล่าว ดังที่แสดงในภาพที่ 4 และเมื่อสุ่มตัวอย่างจากสวนโกหลัก อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ รายต้นเพศผู้และเพศเมียจำนวน 5 ตัวอย่าง มาตรวจสอบการระบุเพศโดยใช้ไพรเมอร์ OPP03 พบว่าสามารถระบุเพศผู้และเพศเมียของอินทผลัมรายต้นได้โดยเพศเมียจะไม่มีการปรากฏของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1200 bps แต่ในต้นเพศผู้จะมีการปรากฏของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1200 bps ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 4 การยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศรายต้นเพศผู้และรายต้นเพศเมียอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 ไพรเมอร์หมายเลข OPP03

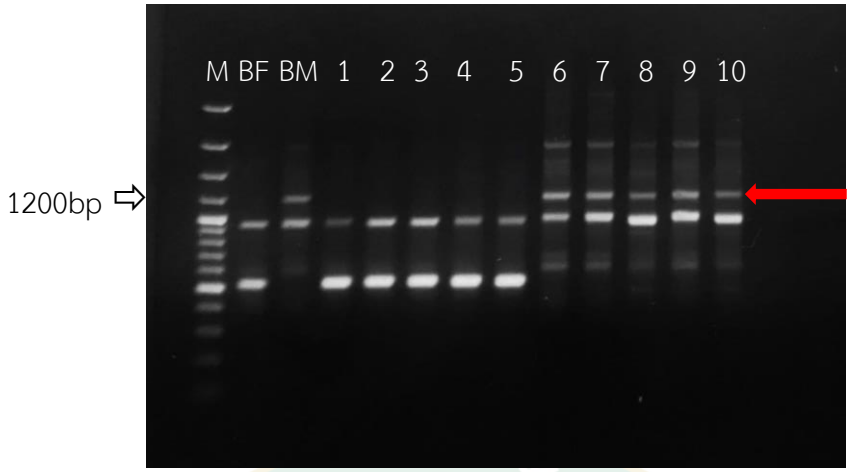
หมายเหตุ Lane M = 1 Kb Plus DNA ladder

Lane BF = ดีเอ็นเอกลุ่มเพศเมีย

Lane BM = ดีเอ็นเอกลุ่มเพศผู้

Lane 1-10 = ดีเอ็นเอรายต้นของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 เพศเมีย

Lane 10-20 = ดีเอ็นเอรายต้นของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 เพศผู้

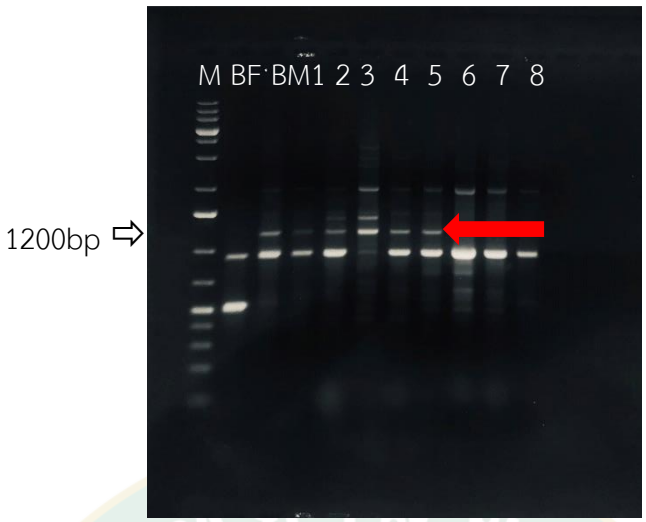


ภาพที่ 5 การยืนยันเครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศรายต้นเพศผู้และรายต้นเพศเมียที่สุ่มตัวอย่างใหม่จากต้นที่ทราบเพศ จากสวนโกหลัก อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ไพรเมอร์หมายเลข OPP03 (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1200 bps)

หมายเหตุ Lane M = 100 bp Plus DNA ladder
Lane BF = ดีเอ็นเอกลุ่มเพศเมีย
Lane BM = ดีเอ็นเอกลุ่มเพศผู้
Lane 1-5 = ดีเอ็นเอรายต้นของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 เพศเมีย
Lane 6-10 = ดีเอ็นเอรายต้นของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 เพศผู้

การตรวจสอบการระบุเพศอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ได้นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 จำนวน 8 เมล็ด โดยใช้การสกัดดีเอ็นเอจากแคลลัส แล้วนำมาทดสอบการระบุเพศโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอหมายเลข OPP03 พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพศตัวผู้จำนวน 5 ตัวอย่าง และมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตรงกับเพศเมียจำนวน 3 ตัวอย่าง การตรวจสอบการระบุเพศอินทผาลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้36 ที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายเลข OPP03 (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1200 bps)

หมายเหตุ Lane M = 1 Kb Plus DNA ladder

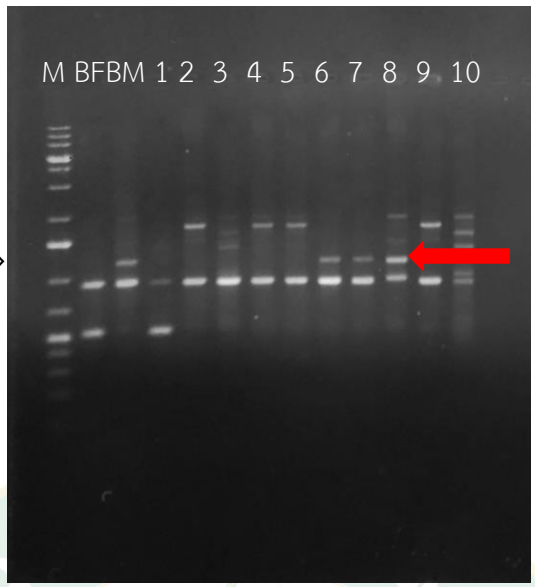
Lane BF = กลุ่มดีเอ็นเอเพศเมีย

Lane BM = กลุ่มดีเอ็นเอเพศผู้

Lane 1-8 = ตัวอย่างดีเอ็นเอจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 8 เมล็ด

การระบุเพศของอินทผลัมในพันธุ์อื่น

ได้มีการนำดีเอ็นเอตัวอย่างของพันธุ์เดคเลตนัวร์เพศผู้ จำนวน 5 ต้น และเพศเมีย จำนวน 5 ต้น มาตรวจสอบการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้ไพร์เมอร์หมายเลข OPP03 พบว่าใน OPP03 สามารถระบุรายต้นเพศเมียของพันธุ์เดคเลตนัวร์มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกันกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอกลุ่มเพศเมียพันธุ์แม่โจ้ 36 จำนวน 5 ตัวอย่าง แต่ในรายต้นเพศผู้มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกันกับกลุ่มเพศผู้ จำนวน 3 ตัวอย่าง ของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 ดังแสดงในภาพที่ 7 และการนำไพรเมอร์หมายเลข OPP03 มาใช้ทดสอบการระบุเพศในอินทผลัมพันธุ์บาร์ฮี รายต้นเพศผู้ 5 ต้น และเพศเมีย 5 ต้น พบว่าใน OPP03 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกันกับกลุ่มเพศเมียของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 จำนวน 9 ตัวอย่าง สำหรับเพศผู้มีลายพิมพ์ดีเอ็นเที่ตรงกับกลุ่มดีเอ็นเอเพศผู้ จำนวน 1 จากตัวอย่างที่มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1200 bps ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 7 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศอินทผาลัมพันธุ์เดตเลตนัวส์ หมายเลข OPP03

(ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1200 bps)

หมายเหตุ Lane M = 1 Kb Plus DNA Ladder

Lane BF = กลุ่มดีเอ็นเอเพศเมีย

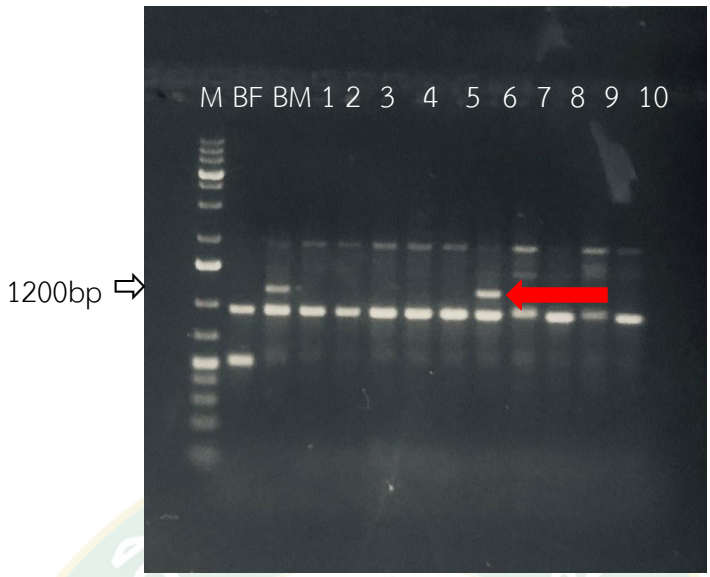
Lane BM = กลุ่มดีเอ็นเอเพศผู้

Lane 1-5 = ดีเอ็นเอรายต้นของเพศเมียพันธุ์เดคเลตนัวร์

Lane 6-10 = ดีเอ็นเอรายต้นของเพศผู้พันธุ์เดคเลตนัวร์

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ระบุเพศอินทผาลัม

ได้นำผลผลิตพีซีอาร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอหมายเลข OPP03 ไปหาลำดับเบสในตำแหน่ง 1200 bp พบว่ามีลำดับเบส (ภาพที่ 9) และได้ออกแบบไพร์เมอร์ เพื่อนำมาตรวจจับตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง ในการระบุเพศโดยมีลำดับของไพร์เมอร์ดังตารางที่ 5 หลังจากนั้นจะนำมาใช้ยืนยันการระบุเพศอีกครั้ง ในต้นกล้าอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 อีกครั้ง



ภาพที่ 8 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเพศอินทผลัมพันธุ์บาร์ฮี OPP03
(ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1200 bps)

หมายเหตุ Lane M = 1 Kb Plus DNA Ladder
Lane BF = กลุ่มดีเอ็นเอเพศเมีย
Lane BM = กลุ่มดีเอ็นเอเพศผู้
Lane 1-5 = ดีเอ็นเอรายต้นของเพศเมียพันธุ์บาร์ฮี
Lane 1-6 = ดีเอ็นเอรายต้นของเพศผู้พันธุ์บาร์ฮี

>M2_OPP03

NNNNNNTNNNNNNNACATTTTGAGTTATCATAAGGCTAGGCCGCCCCACATAAATAACCAGCAGCAAGTAT
ACATTTTGATGTTGAACATGCAATCATGCGACATTTACTTGTGATTCCAGGCTGATGTTGGTGGGGTTCTCTTG
ATACTGATCCGATCAACTAGATCTGAGTTGAGCTCAAAACAGGTCCAACGCCTTACGTCTATGTCAGATAAATC
TGACCCTACTACTACAGATGATGTCTTCATTTCAATGTTAGTCCAGATAAAATCCAAATCATCCAACACCATCTA
TTTAGGCATTCAATATGTGCTTATAGTCAACTTTGACAATTATTTATAGTTCTAGTCATTAGTAAATGCAGGGAA
AGCTAAAGCCAACAAATAAAATCAAATATCCAAGTTCTCTTGTAGTCAAATTTTTGACTTGTTGTTTTGTCTTTA
TTACATTGCTAATCATCTACAATGTTTGTTTCTAATGCGCTTCCTGGCTAGGCCGTTTTGGGATTTTCTCCATCTC
TTATTTACTCTTTCCTCCGATGATTTCGGTTTTAGCACTGTTTTTCTTTTTGTTTCCAGAAAAAATGTGATGTTTAT
TTCATAAATTTTCTGATGTGTTCATCCTGACCCTAGGAAAGCATATATGCAGTATTCTTTTTGTTGTTTGAAGAG
AAGGGTAAAGTATCCATCGAATATATTGAAACACAACCAGCTAGCATTTCAAGATTAAAGGAAAGAGAAGAAA
AAAGGAAGGGACTGCAAAATACAAGAAGAGATGCAGAGGGAAAGTACAAGGAGAGGAGAGTACATATGCC
ATATGTTAATTTATCATTGTTTAGCTCTATGGCTGTTTCCTTCCTTTCTTTCTTTCTTCCTCTCTTCTTCCTTTCTCC
TTTTCTTTTTTNAAAGCGGGGCTNANCAGANTATTTTTNNCNNACACATCAGCGTATCTANTGTTATGCCATTA
ACTTTTGATTTCTTTCCAATTTATCCTTACACTTCAACGCATCTACAACTACGCCTTTATCTTTTCATTCCTTCCAA
ATTTACCCCTCATACCAATTTTAAAGGACTATTCCATCCTTTTTTTAATAAAAAAAAATTTTCGGGGGTTATTAC
AANNNCCCACTTGAAAATCCGTCTCCCAAANTTTCTTTCCCGGGGGNTN

ภาพที่ 9 ลำดับเบสของไพร์เมอร์ OPP03 ที่ตำแหน่ง 1200 bp

ตารางที่ 3 การออกแบบไพร์เมอร์ที่ตำแหน่งเฉพาะเจาะจง

Primers	Sequences ˙5-3’
M2-OPP03-F	CTGATGTTGGTGGGGTTCTCTT
M2-OPP03-R	TCTTCTTGTATTTTGCAGTCCCTTC

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ระบุเพศอินทผาลัม

ได้นำผลผลิตพีซีอาร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอหมายเลข OPP03 ไปหาลำดับเบสในตำแหน่ง 1200 bp และได้ออกแบบไพร์เมอร์ เพื่อนำมาตรวจจับตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง ในการระบุเพศ หลังจากนั้นจะนำมาใช้ยืนยันการระบุเพศอีกครั้งในต้นกล้าอินทผาลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 หรือพันธุ์อื่น ๆ อีกครั้ง

การตรวจเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการสำรวจความแตกต่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Random Ampilified Polymorphic DNA (RAPD) ที่อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยพีซีอาร์ (พรพันธ์ ,2538) Al-Qurainy *et al.*, (2018) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเพศอินทผลัม ใช้ไพร์เมอร์จำนวน 300 หมายเลขในการสำรวจอินทผลัมทั้งหมด 21 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียงOPC06 ที่สามารถระบุเพศในอินทผลัม Seif EI-Yazal *et al*.,(2017) ศึกษาต้นกล้าอินทผลัมในประเทศอิยิปต์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ RAPD ในการจำแนกลักษณะเพศผู้เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ Malabika and Riyad (2008) ใช้เครื่องหมายแบบ RAPD ในการระบุเพศอินทผลัมในประเทศบาร์เรน สามารถระบุความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมียโดยไพรเมอร์หมายเลข OPA08 OPA09 และ OPA12 สามารถระบุได้อย่างชัดเจน Al-Moshileh *et al.*,(2004) ศึกษาการใช้เครื่องหมายแบบ RAPD ในการตรวจสอบเพศอินทผลัมในประเทศซาอุดิอาราเบีย นพรัตน์ และพีระศักดิ์ (2018) ที่ศึกษาการระบุเพศในอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 โดยใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการระบุเพศของอินทผลัมในระยะต้นกล้า และเมื่อทำการยืนยันผลพบว่าสามารถระบุความแตกต่างของอินทผลัมเพศผู้และเพศเมีย และในต้นกล้าของอินทผลัม รวมทั้งยังสามารถนำไปใช้กับอินทผลัมสายพันธุ์อื่น เช่น อินทผลัมพันธุ์เดคเลทนัว และอินทผลัมพันธุ์บาร์ฮี อรุโณทัย และคณะ (2560) ทดสอบการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการระบุเพศอินทผลัมจำนวน 39 คู่ ในอินทผลัมที่ทราบเพศ และที่ได้รับการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด ซึ่งอินทผลัมที่ใช้ในการทดสอบคืออินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 โดยได้ไพร์เมอร์ หมายเลข DpDoAF และ DpDoAR สามารถระบุเพศของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับนพรัตน์ และคณะ (2558) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างอินทผลัมเพศผู้และเพศเมีย โดยที่เพศผู้จะแสดงแถบดีเอ็นเอสองแถบ และเพศเมียจะแสดงแถบดีเอ็นเอเพียงหนึ่งแถบ

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอ ที่จำเพาะต่ออินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 สามารถออกแบบ SCAR ไพรเมอร์ได้ 1 คู่ Dhawan *et al.*, (2013) พัฒนาเครื่องหมายแบบ SCAR ในการระบุเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้า ส่วนในรายงานของนพรัตน์ และคณะ (2558) พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SCAR ที่เฉพาะเจาะจงในลักษณะเพศผู้ ร่วมกับไพร์เมอร์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำพีซีอาร์แบบรวม (multiplex PCR) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอสองแถบในต้นเพศผู้ และปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงหนึ่งแถบในต้นเพศเมียซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอรุโณทัย และคณะ (2560) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอสองแถบในต้นเพศผู้และปรากฏหนึ่งแถบในต้นเพศเมีย และรายงานของ Al-Mahmoud *et al*., (2012) ใช้เทคนิค PCR-RFLP จำนวนไพร์เมอร์ 5 หมายเลข เนื่องจากการตรวจสอบเพศโดยวิธีนี้มีความยุ่งยากหลายขั้นตอนต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์ หลังจากได้ชิ้นส่วนได้พัฒนาไพร์เมอร์แบบจำเพาะกับตำแหน่งแบบ SNPs ที่สัมพันธ์กับเพศ

จากการทดลองพบว่าการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นแบบ RAPD จาก 520 หมายเลข พบว่ามีเพียง 1 หมายเลข คือ OPP03 ที่สามารถระบุความแตกต่างของอินทผลัมเพศผู้ และเพศเมีย จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไพร์เมอร์ OPP03 ที่ตำแหน่ง 1200 คู่เบส ทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่ตำแหน่ง 1200 คู่เบส พบว่าไม่สามารถระบุความแตกต่างของอินทผลัมเพศผู้ และเพศเมีย

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

การทดลองที่ 1 การศึกษาการสกัดดีเอ็นเออินทผลัม

การสกัดดีเอ็นเออินทผาลัมโดยใช้วิธีดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1987) และ Agrawal *et al*.(1992) โดยใช้ 2 ชนิด ได้แก่ CTAB buffer [(100mM Tris HCl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0,1.4M NaCl, Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (2% CTAB)] และชนิดที่สอง [(100mM Tris Cl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0,1.4M NaCl, Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (2% CTAB) และ PVP-400 (1%)] ซึ่งจากการศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบการใช้สารละลาย 2x CTAB พบว่าแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สารละลาย CTAB ชนิดที่ 1 มีส่วนประกอบของ Tris-HCl พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอมีคุณภาพดี มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 60-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เหมาะสมที่นำมาใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์

การทดลองที่ 2 การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเพศอินทผลัม

การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มดีเอ็นเอเพศผู้ และกลุ่มดีเอ็นเอเพศเมียใช้เทคนิค Romdom Amplicflid Polymorphic DNA (RAPD) เพื่อค้นหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถใช้ระบุเพศจากไพร์เมอร์จำนวนทั้งหมด 520 หมายเลข พบว่ามีไพร์เมอร์ OPP03 สามารถระบุเพศได้และสามารถทำซ้ำโดยที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอในรูปแบบเดียวกัน มีการยืนยันลายพิมพ์ดีเอ็นเอรายต้นของกลุ่มเพศผู้และเพศเมีย และได้มีการนำมาใช้ระบุเพศอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 โดยสกัดดีเอ็นเอจากแคลลัสของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมล็ด พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกันกับกลุ่มเพศผู้และกลุ่มเพศเมีย

การระบุเพศของอินทผลัมในพันธุ์เดคเลตนัวร์โดยใช้ไพร์เมอร์หมายเลข OPP03 พบว่าในรายต้นเพศเมียของพันธุ์เดคเลตนัวร์มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกันกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอกลุ่มเพศเมียของอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 และการนำมาใช้ทดสอบการระบุเพศในอินทผลัมพันธุ์บาร์ฮี พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรงกันกับกลุ่มเพศเมียของอินทผาลัมพันธุ์แม่โจ้

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ระบุเพศอินทผลัม ได้นำผลผลิตพีซีอาร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอหมายเลข OPP03 ไปหาลำดับเบสในตำแหน่ง 1200 bps และได้ออกแบบไพร์เมอร์ เพื่อนำมาตรวจจับตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง ในการระบุเพศซึ่งจะนำมาใช้ยืนยันการระบุเพศ ในต้นกล้าอินทผลัมพันธุ์แม่โจ้ 36 และพันธุ์อื่นต่อไป

บรรณานุกรม

กองบรรณาธิการ. 2562. **อินทผลัมสีแดงโคไนซี่อร่อยด้วยประดับ**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.tonmailaesuan.com. สืบค้นวันที่ (4 ตุลาคม 2562).

กองบรรณาธิการเมืองไม้ผล. 2558. เมืองไม้ผลทุ่มผลิตอินทผลัม KL1 แม่โจ้ เพาะต้นพันธุ์ด้วยเมล็ด. **วารสารพลังเกษตร**. 1.กรุงเทพฯ.

กองบรรณาธิการเมืองไม้ผล. 2560. สายพันธุ์อินทผลัมที่เหมาะสมกับการปลูกเชิงการค้าในประเทศไทย **วารสารพลังเกษตร**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.Palangkaset.com. สืบค้นวันที่ (4 ตุลาคม 2562).

จิรพันธ์ ศรีทองกุล. 2545. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะตูม. ว**ารสารเกษตรนเรศวร**. 5(1) : 45-55.

จิรวรรณ โรจนพรทิพย์. 2558. **รายงานพิเศษอินทผลัมในเมืองไทยไปได้สวยหรือไม่**.มติชน:เทคโนโลยีชาวบ้าน.ฉบับที่ 602. 60-65 น. กรุงเทพฯ.

ชมนาถ เกิดคง และเนตรชนก นุ้ยรุ่งสี. 2561. การเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากใบโคลงเคลง (*Melastoma malabathricum* L.) **Agricultural Science**. 49 (2) : 653-656.

ธนกร วงษศา , อภินันท์ ลิ้มมงคล และอนุพันธ์ กงบังเกิด. 2551. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง. **Naresuan University Science Journal**. 5 : 165-175.

นพรัตน์ อินถา ,กวี สุจิปุลิ , ปิยรัตน์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์ และพีระศักดิ์ ฉายประสาท. 2558. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการกำหนดเพศอินทผลัมไทย (แม่โจ้ 36) **วารสารเกษตรพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**. ครั้งที่ 15 : 68-73.

นพรัตน์ อินถา และพีระศักดิ์ ฉายประสาท. 2561. Sex determination in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by PCR base marker analysis. **Scientia Horticulturae**. 251-255.

นิรนาม. 2549. อินทผลัมกินผลที่เชียงใหม่. **วารสารเคหการเกษตร**. 61: 67-68.

นิรนาม. 2549. อินทผลัมปลูกในเมืองไทยได้ผลดีหรือไม่. **เทคโนโลยีชาวบ้าน** : ปีที่ 18 ฉบับที่ 380

นิรนาม. 2559. **สายพันธุ์อินทผลัม**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.intapalumthai.com. สืบค้นวันที่ (4 ตุลาคม 2562)

เปรม ณ สงขลา. 2558. เรื่องของอินทผลัม. **วารสารเคหการเกษตร**. 39 (39).: 69-78 น.

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2538. **เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**. ในเอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการเรื่อง การตรวจแยกสายพันธุ์พืชโดยใช้ Isozyne pattern และRAPD ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม. 39-60 น.

มาลินี อัศวดิษฐเลิศ. 2552. **เทคนิคพีซีอาร์**. หน่วยบริการข้อมูลศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. [ระบบออนไลน์].แหล่งที่มา www.vcharkarn.com. สืบค้นวันที่ (11 ตุลาคม 2559). 8(1):6-10 น.

วรรณภา เสนาบดี. 2558. อินทผลัมพืชจากทะเลทรายสู่ไทยเมืองร้อนชื้น.**เคหการเกษตร** 9 (39) : 67-90 น. กรุงเทพฯ.

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์ และเจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2554. **เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจและการระบุเพศของสละหม้อจากจังหวัดจันทบุรีพืชสกุลระกำ** (*Salacca)*. วิทยาศาสตร์ มศว.27, 2 : 179-191 น.

วีรพันธ์ นิลวัตร. 2556. **การปลูกอินทผลัม สไตล์ไทยไทย.** ศูนย์บริการข้อมูลและสารสนเทศ สำนักงานเกษตรจังหวัดนราธิวาส [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.narathiwat.doag.go.th. สืบค้นวันที่ (11 ตุลาคม 2559)

สาวบางแค 22. 2562. ศูนย์รวบรวมพันธุ์อินทผลัมครบวงจร. **วารสารเทคโนโลยีชาวบ้าน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.techologychaoban.com. สืบค้นวันที่ (4 ตุลาคม 2562)

สุกรี มะดากะกุล. 2558. อินทผลัมไม้ผลแห่งความเชื่อพืชเศรษฐกิจแอฟริกาเหนือ และตะวันออกกลาง. **วารสารเทคโนโลยีชาวบ้าน**. 27 (602).

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล 2545. จี**โนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.116 น.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. **เครื่องหมายโมเลกุลในงานปรับปรุงพันธุ์พืช**. วารสารวิชาการ ม.อบ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.,5(37-58).

หทัยรัตน์ อุไรรงค์, อรรัตน์ วงศ์ศรี และนัยเนตร เจริญสันติทานากะ. 2017. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. **Thai Agricultural Research Journal**,35(2), 117-135.

หัทยา กาวีวงค์. 2548. **อณูพันธุศาสตร์**.ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 312 น.

อดิศักดิ์ นัดกระโทก. 2550. **การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธีกับพืช 4 ชนิด**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม. 27 น.

อภิชาติ ศรีสะอาด , เกรียงไกร ยอดชมพู และดนลยา อัมภาภรสิริ. 2556. **แนวทางและแบบอย่างการขยายพันธุ์และเพาะปลูก** พิมพ์ครั้งที่ **1** นาคาอินเตอร์มีเดีย จำกัด**.** กรุงเทพฯ.

อรดี สหวัชรินทร์ และทวีพงศ์ สุวรรณโร. 2530. **การขยายพันธุ์อินทผลัมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ.** ภาควิชาพืชสวน**,** คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**.** 15 **น**.

อรรัตน์ มงคลพร.2548. **เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน: นครปฐม.

อรุโณทัย ซาววา , นัยเนตร เจริญสันติ , จารุฉัตร เขนยทิพย์ และประสาน สืบสุข. 2560. การ**ตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล**. รายงานโครงการวิจัยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์พืช. 48-68 น.

เอกพจน์ บุญรักษา. 2546. ก**ารศึกษาการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ และชนิดของเนื้อเยื่อพืชเพื่อสกัดดีเอ็นเอจากพืชวงค์ขิง**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม. 38 น.

Agrawal, G. K., Pandey, R. N. และP., Agrawal V. 1992. Isolation of DNA from Chkerospondias asillaris. **BioLect.Biov .Lett**,2:19-24.

Al- Khalifah, NS and Askari, E. 2003. Molecular phylogeny of date palm *(Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia by DNA fingerprinting. **Theoretical and Applied Genetics**,107(7): 1266-1270.

Al-Mohmoud , M.E., Al-Dous , E.K., Al-Azwani,E.k. & Malek,J.A. 2012. DNA-based assays to distinguish date palm (Arecaceae) gender.**American Journal of Botany**. 7-10.

Al-Moshileh , A. M., Motawei , M. I., Al-Wasel , A & Abdel-Letif , T. 2004. Identification of some date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars in Saudi Arabia Using RAPD fingerprint. **Agricultural and Marine Sciences**. 9 (1) : 1-3.

Alstrom-Rapaport, C, Lascoux, M, Wang, YC, Roberts, G and Tuskan, GA. 1998. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.). **Journal of Heredity**,89(1): 44-49.

Bautista, Rocío, Crespillo, Remedios, Cánovas, Francisco M and Claros, M Gonzalo. 2003. Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers. **Euphytica**,129(1): 33-41.

Botstein, David, White, Raymond L, Skolnick, Mark and Davis, Ronald W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**,32(3): 314.

Brown, Stuart M, Szewc-McFadden, AK and Kresovich, Stephen. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. **Methods of genome analysis in plants**,1:147-158.

Dellaporta ,S. L., Jonathan , W. & Jame , B. H. 1983. A plant DNA minipreparation:version II. **Plant molecular biology**. 1 (4) : 19-21.

Dhawan, Charu, Kharb, Pushpa, Sharma, Richa, Uppal, Sanjogta and Aggarwal, Ramesh K. 2013. Development of male-specific SCAR marker in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Tree genetics & genomes**,9(5): 1143-1150.

Doyle, Jeff J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**,19:11-15.

Elmeer, Khaled and Mattat, Imene. 2012. Marker-assisted sex differentiation in date palm using simple sequence repeats. **3 Biotech**,2(3): 241-247.

Kaundun, Shiv S, Zhyvoloup, Alexander and Park, Young-Goo. 2000. Evaluation of the genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. sinensis) accessions using RAPD markers. **Euphytica**,115(1): 7-16.

Kim, Chung-Sun, Lee, Gung-Pyo, Han, Dong-Hyeon, Ryu, Ki-Hyun and Lee, Chang-Hoo. 2000. SCARs markers derived from RAPD for cultivar identification in *Pyrus pyrifolia*. **HORTICULTURE ENVIRONMENT and BIOTECHNOLOGY**,41(2): 125-128.

Kochert, G. 1994. **RFLP technology. In DNA-based markers in plants. Phillips, R.L. and Vasil, I.K. (eds.).Dordrecht.**The Netherlands.:Kluwer Academic Publishers. .

Malabika , R. P. & Riyad , Y. H. 2008. RAPD analysis of date plam Cultivers of Bahrain. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**. 2 (1) : 9-11.

Mariniello, L., S., Maria Grazia, S., Angela, F, M., and Porta, R. 2002. Identification of Prunus armeniaca cultivars by RAPD and SCAR markers. **Biotechnology Letters**,24(10): 749-755.

McCouch, S. R and Tanksley, S. D. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. **Rice biotechnology**.109-133.

Michelmore, Richard W, Paran, I and Kesseli, RV. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the national academy of sciences**,88(21), 9828-9832.

Mirbahar, A.A, Markhand, G., S., Khan, S. and Abul-Soad, A., A. 2014. Molecular characterization of some Pakistani date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars by RAPD markers. **Pak. J. Bot**,46(2): 619-625.

Morgante, M. and Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The plant journal**,3(1): 175-182.

Paterson, A. H. 1996. Genome Mapping in Plant. **San Diego:Academic Press,Inc**330.

Powell, W., Machray, G., C and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**,1(7): 215-222.

Salem, A , Rhouma, S, Zehdi, S, Marrakchi, M and Trifi, M. 2007. Molecular characterization of Mauritanian date palm cultivars using plasmid-like DNAs markers. **Biologia plantarum**,51(1): 169-172.

Sedra, M. H., Lashermes, P., Trouslot, P. and Combes, M.C.. 1998. Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. **Euphytica**,103(1): 75-82.

Tanksley, S.D, Young, N.D, Paterson, A.H and Bonierbale, MW. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/technology**,7(3): 257.

Vos, Pieter, Hogers, Rene, Bleeker, Marjo, Reijans, Martin, Lee, Theo van de, Hornes, Miranda, Friters, Adrie, Pot, Jerina, Paleman, Johan and Kuiper, Martin. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**,23(21) : 4407-4414.

Wang, Zhi-gang, Zhang, Zhi-hong, Li, He, Gao, Xiu-yan, Du, Guo-dong and Tan, Chang-hua. 2007. Identification of strawberry cultivars by RAPD and SCAR markers. **Acta Horticulturae Sinica**,34(3): 591.

Welsh, John and McClelland, Michael. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic acids research**,18(24): 7213-7218.

Williams, John GK, Kubelik, Anne R, Livak, Kenneth J, Rafalski, J Antoni and Tingey, Scott V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**,18(22): 6531-6535.

ภาคผนวก

สารเคมีในการทดลอง

1. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)
2. Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)
3. 75 % Ethanol + 10mM ammonium acetate
4. Isopropanol
5. Ethylene diamne tetraacetic acid (EDTA)
6. primer
7. *Taq* DNA polymerase
8. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)
9. 10X PCR buffer
10. Magnesium chloride ($MgCl_2$)
11. Ethidium bromide
12. 1 Kb Plus DNA Ladder
13. 100 bp Plus DNA Ladder
14. 75 % Ethanol และ 90 % Ethanol
15. TE buffer pH 8.0
16. dH_2O
17. TE dye

อุปกรณ์ในการทดลอง

1. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
2. เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาให้ความร้อน (hotplate and magnctic stirrer)
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์ขนาดเล็ก (mini centrifuge)
8. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine)
9. pH Meter
10. micropipette และ micropipette tips
11. microtube และ microtube racks
12. เครื่องอิเล็กโตโฟรีซิส (electrophoresis) ชนิดแนวนอน
13. เครื่อง UV transilluminator และ Gel documentation
14. โกร่งบดตัวอย่างและกระดาษฟรอยด์
15. เตาไมโครเวฟ
16. เครื่องแก้ว
17. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 2X CTAB 100 มิลลิลิตร

2M Tris-HCl (pH 8.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แต่ถ้า 1M Tris-Clปริมาตร 10 มิลลิลิตร

0.5M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

NaCl (ผง) 8.182 กรัม

เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ควรละลาย CTAB ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ) แล้วเติม 2-Mercaptoethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตรก่อนนำไปใช้

2. การเตรียม TE buffer (1M Tris-Cl) 100 มิลลิลิตร

1M Tris-Cl ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

0.5M EDTA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้นึ่งฆ่าเชื้อ

3. การเตรียม TE buffer (2M Tris-Cl) 1000 มิลลิลิตร

2M Tris-Cl (pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

0.5M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

น้ำกลั่นปริมาตร 999.3 มิลลิลิตร

4. การเตรียม 75 % Ethanol ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Ethanol ปริมาตร 750 มิลลิลิตร

น้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร

5. การเตรียม 75 % Ethanol + 10mM ammonium acetate ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

75 % Ethanol ปริมาตร 450 มิลลิลิตร

75 % Ethanol + 10mM ammonium acetate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

6. การเตรียม 2M Tris-Cl (pH 8.0) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1M Tris-Cl 242.28 กรัม (ข้างขวด 1M Tris-Cl 121.14 กรัม)

เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปั่นหมุนให้ละลายเติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตรแล้วปรับให้ได้ pH 8.0 โดยใช้ NaOH pellets เติมน้ำกลั้นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

7. การเตรียม 0.5M EDTA 1000 มิลลิลิตร

1 M EDTA 186.12 กรัม ใส่บีกเกอร์เติมน้ำกลั้นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปั่นละลายจนใสปรับ pH 8.0 โดยใช้ NaOH pellets เติมน้ำกลั้นเพื่อปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

8. การเตรียม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)

Chloroform ปริมาตร 240 มิลลิลิตร

Iso-Amyl alcohol purified ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

9. การเตรียม 50X TAE

1M Tris-Cl 242.28 กรัม (ข้างขวด 1M Tris - Cl 121.14 กรัม)

Acetic acid ปริมาตร 57.1 มิลลิลิตร (ตวง Acetic acid ปริมาตร 57 มิลลิลิตร แล้วใช้ Micropipette ดูดมาเพิ่มอีก 100 ไมโครลิตร)

10. การคำนวณ 0.5X TAE 3000 มิลลิลิตร

50X TAE จาก Stock เตรียม 0.5X TAE ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

50X TAE ปริมาตร 60 มิลลิลิตร

ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 3000 มิลลิลิตร

11. การเจือจาง (Dilute) primer 2 ไมโครโมลาร์ จาก stock 100 ไมโครโมลาร์

เติมน้ำกลั้น ปริมาตร 98 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

12. การเจือจาง (Dilute) primer 2 ไมโครโมลาร์ จาก stock 10 ไมโครโมลาร์

เติมน้ำกลั้น ปริมาตร 80 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาว สายชล โนสุวรรณ

เกิดเมื่อ 16 พฤศจิกายน พ.ศ. 2535

ประวัติการศึกษา พ.ศ.2553 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ.2558 วิทยาศาตรบัณฑิต (วท.บ.) พืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ประวัติการทำงาน -