การคัดเลือกไพรเมอร์และตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเทคนิคพีซีอาร์
Screening and Testing Primers for Use in Sex Identification of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) by PCR Technique

อรุโณทัย ซาววา[1/*] ศุภรัสมิ์ พูลพัฒนสุวรรณ[1/] ประสาน สืบสุข[1/]
Aroonothai Sawwa[1/] Suparat Phoonpatthanasuwan[1/] Prasarn Seubsuk[1/]

Received 25 July 2019 /Revised 24 Oct 2019/Accepted 29 Jan 2020

ABSTRACT

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is a dioecious plant with imperfect flower. The sex of plants can only be identified at the time of first flowering that takes approximately 3-7 years. This research aimed to screen primers for DNA markers of sex determination at the seedling stage by Polymerase chain reaction (PCR) technique. The thirty-nine primer pairs previously reported and newly designed were selected and validated with known sex of date palm (KL1 and Bahee varieties) through PCR method with reference primer. Results showed that newly designed primer pair, DpDOAmale5F and DpDOAmale4R could 100% identify male plants of KL1 and Bahee varieties. DNA fragment was presented only in male plant and had a length of approximately 450 bp. The comparison of DNA extraction between homogenization with the metal bead and CTAB methods showed no difference of the DNA content and purity. However, the homogenization with the metal bead method could extract faster.

Keywords : Date Palm, sex identication, DNA marker

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi, Pathumthani, 12110, Thailand

* Corresponding Author :aroonothai.s@doa.in.th

บทคัดย่อ

อินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) เป็นพืชไม่สมบูรณ์เพศ ชนิดดอกแยกเพศอยู่ต่างต้น (dioecious plant) การออกดอกต้องใช้ระยะเวลานาน 3-7 ปี จึงจะทราบเพศ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้าด้วยเทคนิคพีซีอาร์ Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ตามรายงานการวิจัยและออกแบบขึ้นมาใหม่ จำนวนรวมทั้งสิ้น 39 คู่ไพรเมอร์ นำมาคัดเลือกด้วยวิธีพีซีอาร์ และทดสอบกับต้นอินทผลัมพันธุ์ KL1 และพันธุ์บาฮี ที่ทราบเพศแล้ว ร่วมกับคู่ไพรเมอร์อ้างอิง PDK30sF/PDK30sR พบว่า คู่ไพรเมอร์ DpDOAmale5F และ DpDOAmale4R ที่ออกแบบขึ้นมาใหม่สามารถแยกต้นตัวผู้อินทผลัมพันธุ์ KL1 และพันธุ์บาฮีได้ 100% โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะในต้นตัวผู้ขนาดประมาณ 450 คู่เบส เมื่อนำใบอินทผลัมมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการใช้ลูกเหล็กเปรียบเทียบกับวิธีใช้ CTAB พบว่า มีปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน แต่วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยเม็ดลูกเหล็กสามารถสกัดได้รวดเร็วกว่า

คำสำคัญ: อินทผลัม, การจำแนกเพศ, เครื่องหมายดีเอ็นเอ

บทนำ

อินทผลัม (Date palm) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Phoenix dactylifera* L. อยู่ในตระกูล Arecaceae ซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับปาล์ม มีถิ่นกำเนิดในแถบตะวันออกกลาง อินทผลัมเป็นพืชที่มีความสำคัญทางสังคมและเศรษฐกิจในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันตกและอัฟริกา นิยมใช้เป็นผลไม้หรือพืชอาหารและมีความสำคัญต่อการพัฒนาด้านการเกษตรในพื้นที่แห้งแล้งทั่วโลก เพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในภูมิภาคที่มีอากาศร้อนและแห้งแล้งแบบทะเลทราย (Wellmann *et al*., 2007) ผลผลิตอินทผลัมทั่วโลกในปี 2560 มีจำนวน 8,619,588 ตัน ประเทศอียิปต์เป็นประเทศที่ปลูกอินทผลัมมากที่สุด ให้ผลผลิตถึง 1,694,813 ตัน รองลงมา ได้แก่ อิหร่าน แอลจีเรีย ซาอุดิอาระเบีย ให้ผลผลิตที่ 1,065,704 1,029,596 และ 964,536 ตัน ตามลำดับ (FAO, 2017) อินทผลัมมีการเพาะปลูกมาแล้วกว่า 7,000 ปี ลำต้นมีความสูงประมาณ 30 ม. และมีขนาดลำต้นประมาณ 30-50 ซม. มีใบติดอยู่บนต้นประมาณ 40-60 ก้าน ทางใบยาว 3-4 ม. (Wrigley, 1995) อินทผลัมเริ่มให้ผลผลิตได้เมื่อต้นมีอายุ 4-7 ปี ขึ้นไป ลักษณะลำต้นอินทผลัมเป็นต้นเดี่ยวและแตกหน่อทางด้านข้าง มีช่อดอกแบบไม่สมบรูณ์เพศมีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=36 ดอกตัวผู้และตัวเมียแยกกันอยู่คนละต้น (จารุฉัตร, 2558) การขยายพันธุ์ทำได้ 3 วิธี คือ เพาะจากเมล็ด แยกหน่อจากต้นแม่ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์จากการเพาะเมล็ดมีข้อดี คือ ขยายพันธุ์ได้ปริมาณมากอย่างรวดเร็ว มีต้นทุนต่ำกว่าวิธีอื่น แต่มีโอกาสที่จะเป็นต้นตัวผู้และต้นตัวเมียมีอย่างละครึ่ง และไม่สามารถทราบเพศในระยะต้นกล้าได้ ต้องรอจนกว่าจะออกดอกจึงจะทราบเพศ

การแยกเพศอินทผลัมมีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เช่น เทคนิค PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) SSR (Simple Sequence Repeat) และ SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) เป็นต้น Cherif *et. al*., (2012) ได้รายงานการใช้เครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์กับโครโมโซม Y หรือต้นตัวผู้ จากการทดสอบกับต้นตัวผู้ 52 ต้น และต้นตัวเมีย 55 ต้น พบว่า มีความจำเพาะต่อเพศผู้ 100% นอกจากนี้ มีรายงานการทดสอบเครื่องหมาย SSR ด้วยไพรเมอร์ mPdCIR048 กับอินทผลัม 129 ตัวอย่าง จาก 34 สายพันธุ์ พบว่า สามารถแยกต้นตัวผู้ออกจากต้นตัวเมีย และได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบเฮเทอโรไซกัสขนาด 160/190 คู่เบส (Elmeer and Mattat, 2012) สำหรับการใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการหาความแตกต่างของเพศอินทผลัม ให้ความรวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการแยกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ต้องใช้เครื่องมือแยกขนาดชิ้นส่วนพีซีอาร์ (Al-Mahmoud *et al*., 2012) ดังนั้น การทดลองนี้

จึงได้ศึกษาหาคู่ไพรเมอร์สำหรับใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกและตรวจสอบเพศต้นกล้าอินทผลัมด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อลดระยะเวลาในการทราบเพศ และลดค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาต้นอินทผลัม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ ในการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1.1 ไพรเมอร์และตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง

ทำการทดสอบไพรเมอร์ตามที่มีรายงานสำหรับการแยกเพศอินทผลัมและทำการออกแบบไพรเมอร์ขึ้นมาใหม่ จำนวนทั้งสิ้น 39 คู่ ได้แก่

- ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จากรายงานของ Billotte *et. al*., (2004) จำนวน 16 คู่
- ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จากรายงานของ Elmeer and Mattat (2012) จำนวน 14 คู่
- ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จากรายงานของ Cherif *et. al*., (2012) จำนวน 1 คู่
- ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR จากรายงานของ Dhawan *et. al*., (2013) จำนวน 1 คู่
- ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบขึ้นมาใหม่จากตำแหน่ง SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ที่เกี่ยวข้องกับเพศผู้และเพศเมียตามรายงานของ Al-Mahmoud *et. al*., (2012) จำนวน 7 คู่ (Table 1)

นำไพรเมอร์ทั้งหมดมาทดสอบกับตัวอย่างอินทผลัมพันธุ์ KL1 ที่ทราบเพศแล้ว จำนวน 10 ตัวอย่าง แบ่งเป็นต้นตัวผู้ 5 ตัวอย่าง และต้นตัวเมีย 5 ตัวอย่าง

Table 1 The new designed primers for sex identification of date palm

No.	Primer name	Forward (5'-3')	Tm (0C)	Primer name	Reverse (5'-3')	Tm (0C)
1.	DpDOAfem1F	AGG CAT TAG CAC CAT AGT AAA TTG TCT	55.2	DpDOAfem1R	GTC CCA ATC AGA GTG CAC TCA ATA	55.7
2.	DpDOAmale2F	GGC AAT AGC ACC ATA GTA AAT TGC CT	56.4	DpDOAfem2R	AGG GCT AAC TCG GTG TGC G	55.4
3.	DpDOAmale3F	TGA TGC ATA CTA GTT GTA TTG CGG C	56	DpDOAfem3R	CTC GGT GTG CGG ATC TCC AA	55.9
4.	DpDOAmale4F	TGC ATA CTA GTT GTA TTG CGG GAA	58	DpDOAmale4R	CAT ACT TGG TGC ACG GAT CTC TAA	55.7
5.	DpDOAmale5F	TGC ATA CTA GTT GTA TTG CGG CAA TA	54.8	DpDOAmale5R	CCC AAT CGG AGT GCA CTC AGT A	56.7
6.	DpDOAfem6F	ATG CAT ACT AGT TGT ATT GAG GGA T	57.35	DpDOAmale6R	GAG GGC TAA CTT GGT GCA CG	55.9
7.	DpDOAmele7F	CAA TAG CAC CAT AGT AAA TTG CAT A	57.53	DpDOAmele7R	TGA GGG CTA ACT TGG GGC	57.84

Remark: SNP position is underline

1.2 การสกัดดีเอ็นเอของใบอินทผลัม

พัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วโดยการตีด้วยเม็ดลูกเหล็ก เปรียบเทียบกับวิธี CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลว ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.2.1 <u>การสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วโดยการใช้เม็ดลูกเหล็ก</u>

เตรียมสารละลายสำหรับการสกัดดีเอ็นเอดังนี้

สารละลายที่ 1: 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.2 M Sucrose และ 10 mM EDTA

สารละลายที่ 2: 400 mM Tris-HCl pH 9.2, 250 mM EDTA และ 2.5% SDS

สารละลายที่ 3: เตรียมปริมาตร 400 มล. มีส่วนผสม ดังนี้ 5M KOAC ปริมาตร 240 มล. 96% Acetic acid ปริมาตร 46 มล. และ ddH_2O ปริมาตร 114 มล.

ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยตัดใบอินทผลัมด้วยใบมีดผ่าตัดให้ได้ปริมาณ 0.05 ก. ใส่ในหลอดขนาด 2 มล. ที่มีลูกเหล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 ซม. จำนวน 2 ลูก เติมสารละลายที่ 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วตีด้วยเครื่อง Precellys Evolution ยี่ห้อ Bertin technologies ที่ความเร็ว 4,500 รอบ/นาที แล้วเติมสารละลายที่ 2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 55°ซ. นาน 15 นาที จากนั้น เติมสารละลายที่ 3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้น ดูดส่วนใส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มล. เติม Iso-propanol ที่แช่เย็นจัดปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำหลอดไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ. นาน 30 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จำนวน 2 รอบ ทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งแล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าความเข้มข้น (Optical Density) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น A260/A280

1.2.2 <u>การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลว</u>

เตรียมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ [ประกอบด้วย 20 mM sodium EDTA, และ 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2% (W/V) และ CTAB] เติม 0.2% β-mercaptoethanol นำบัฟเฟอร์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°ซ. ก่อนการใช้งาน จากนั้น ชั่งใบอินทผลัม 0.5 ก. นำใบอินทผลัมบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้งใส่หลอดขนาด 15 มล. เติม Extraction buffer ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำหลอดบ่มที่ 60°ซ. นาน 1 ชม. (เขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำหลอดออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติม Choroform: Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 5 มล. ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 10 นาที นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ.ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มล. เติม Choroform: Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มล. เติม 3M NaOAC ปริมาตร 0.1 เท่า และ Isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20°ซ. นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°ซ. ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มก./มล.) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ. นาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าความเข้มข้น (Optical Density) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น A260/A280

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้น้ำยา Green Gotaq® Flexi ยี่ห้อ Promega ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ 5X Green Gotaq® Flexi ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 2mM dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward (5uM) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ reverse (5uM) ปริมาตร1 ไมโครลิตร GotaqDNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Thermal cycling conditions for PCR amplication

Step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Initial denaturation	94	3 min	1
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	52-60	30 sec	35
Extension	72	30 sec	
Final extension	72	7 min	1

1.4 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

ทำการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บนเจลอะกาโรส 1% ในบัฟเฟอร์ 1xTBE ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วบันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators ยี่ห้อ BIORAD และทำการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

2. การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อเพศอินทผลัมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำต้นอินทผลัมที่ทราบเพศแล้วทั้งจากพันธุ์ KL1 และพันธุ์บาฮี จำนวนรวม 120 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นต้นตัวเมีย 60 ตัวอย่าง และต้นตัวผู้ 60 ตัวอย่าง นำตัวอย่างใบมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการข้อที่ 1.2.2 จากนั้น เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์แบบรวมไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่

คู่ที่ 1 ใช้สำหรับเป็นเครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงต่ออินทผลัมเพศผู้

- DpDOAmale5F: 5'-TGCA TACTAGTTGTATTGCGGCAATA- 3'

- DpDOAmale4R: 5'- CAT ACTTGGTGCACGGATCTCTAA- 3'

คู่ที่ 2 ใช้สำหรับเป็นแถบดีเอ็นเออ้างอิง ทำการออกแบบมาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ของโครโมโซมอินทผลัมสายพันธุ์คาลาส PDK__30s944511c003 หมายเลข GenBank: ACYX02072276.1 ที่มีความยาว 11,556 คู่เบส โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเออ้างอิงมีความยาว 693 คู่เบส คร่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงต่ออินทผลัมเพศผู้ (Figure 1)

- PDK30sF: 5'-ACTTCTGC TACCTCTACTTGCATGT- 3'

- PDK30sR: 5'-CAAACCACC TCACAACAAGAAGGAA- 3'

โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามวิธีการข้อ 1.3 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 (Table 3) แล้วตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ตามวิธีการข้อที่ 1.4

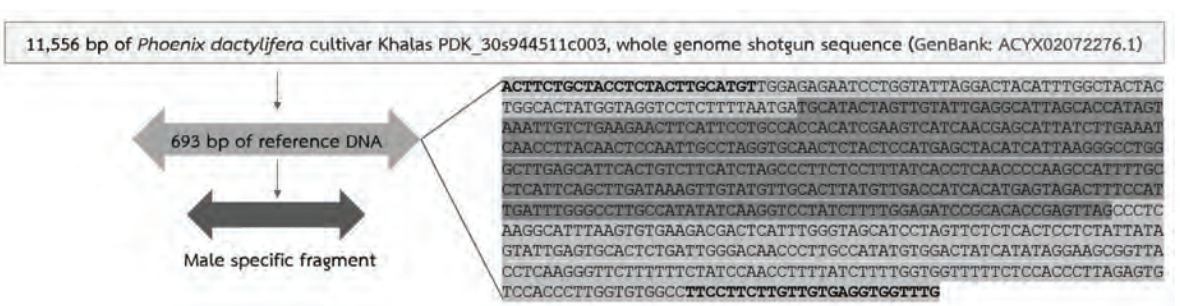

Figure 1 Schematic diagram of reference DNA primer designing

Table 3 Thermal cycling conditions for PCR amplication

Step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Initial denaturation	94	3 min	1
Denaturation	94	30 sec	35
Annealing	57	30 sec	
Extension	72	30 sec	
Final extension	72	1 min	1

3. การศึกษาอัตราส่วนของเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้า

ศึกษาอัตราส่วนของเพศอินทผลัมโดยสุ่มเก็บใบต้นกล้าอินทผลัมที่ยังไม่ทราบเพศจากพันธุ์ KL1 และพันธุ์บาฮี อายุ 4-12 เดือน ในพื้นที่ 5 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ กาญจนบุรี นครปฐม นนทบุรี และสุพรรณบุรี จำนวนรวมทั้งสิ้น 483 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วด้วยวิธีการตีลูกเหล็กตามวิธีการข้อที่ 1.2.1 แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์แบบรวมไพเมอร์ จากนั้น ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อที่ 1.4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจอินทผลัมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจเพศอินทผลัมด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากการทดสอบไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR และ SCAR ตามรายงาน และไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบขึ้นมาใหม่จากตำแหน่ง SNP จำนวนทั้งสิ้น 39 คู่ไพรเมอร์ กับต้นอินทผลัมพันธุ์ KL1 ที่ทราบเพศแล้ว พบว่า ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR และ SCAR จากรายงานของ Billotte *et al*., 2004; Elmeer and Mattat, 2012; Cherif *et al*., 2013; Dhawan *et al*., 2013 ไม่สามารถแยกเพศตัวอย่างอินทผลัมพันธุ์ KL1 ได้ ซึ่งนพรัตน์และคณะ (2558) ได้รายงานว่า ไพรเมอร์ SCAR ของ Dhawan *et al*., 2013 ไม่สามารถแยกเพศอินทผลัมสายพันธุ์ไทย KL1 หรือ แม่โจ้ 36 ได้เช่นกัน สำหรับการออกแบบไพรเมอร์จากตำแหน่ง SNP จากรายงานของ Al-Mahmoud *et al*., 2012 จำนวน 7 คู่ไพรเมอร์ พบไพรเมอร์ DpDOAmale5F และ DpDOAmale4R สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอประมาณ 450 คู่เบส เฉพาะอินทผลัมเพศผู้ และเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบรวมไพรเมอร์ร่วมกับไพรเมอร์ PDK30sF และ PDK30sR ที่ให้แถบดีเอ็นเอประมาณ 700 คู่เบส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ในต้นอินทผลัมเพศผู้ และปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ในต้นอินทผลัมเพศเมีย (Figure 2)

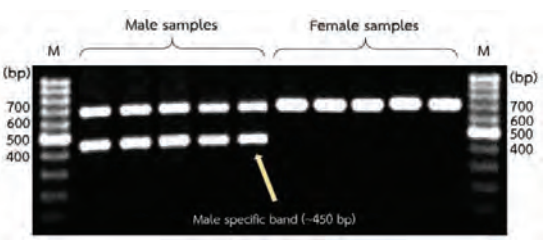

Figure 2 Agarose gel electrophoresis shows 450 bp male specific band amplified by DpDOAmale5F and DpDOAmale4R primers. 700 bp of the reference DNA band amplified by PDK30sF and PDK30sR using KL1 variety as DNA template. The letter M is 100 bp DNA ladder

การเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลว และการสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วด้วยการใช้เม็ดลูกเหล็กกับตัวอย่างใบอินทผลัม จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า

การสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วด้วยการใช้เม็ดลูกเหล็กได้ปริมาณดีเอ็นเอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 318 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลวมีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ยเท่ากับ 499 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างกัน (Table 4) อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วด้วยการใช้เม็ดลูกเหล็กนั้น มีขั้นตอนการสกัดที่ใช้ระยะเวลาน้อยกว่า จึงสามารถสกัดจำนวนตัวอย่างต่อวันได้มากกว่า ดังนั้น สามารถนำวิธีการดังกล่าวมาใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบอินทผลัมเพื่อการตรวจสอบเพศอินทผลัมให้รวดเร็วยิ่งขึ้น และใช้สารเคมีน้อยลง ทำให้ประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการสกัดดีเอ็นเอได้

Table 4 Comparison of DNA concentration and purity by two extraction methods

No.	Metal beads with homogenizer		CTAB and ground with liquid nitrogen	
	DNA concentration (ng/ul)	Purity (A260/A280)	DNA concentration (ng/ul)	Purity (A260/A280)
1	200	1.921	237	1.814
2	451	1.866	316	2.014
3	218	1.822	357	1.775
4	478	1.978	449	1.817
5	336	1.926	626	1.914
6	103	1.811	561	1.794
7	386	1.886	561	1.934
8	285	1.964	556	1.883
9	367	1.881	684	1.947
10	353	1.803	644	1.786
Mean	**318**	**1.886**	**499**	**1.868**

2. การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อเพศอินทผลัมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นมาใหม่จากตำแหน่ง SNP ต่อเพศอินทผลัมด้วยวิธีพีซีอาร์แบบรวมไพรเมอร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DpDOAmale5F/DpDOAmale4R และ PDK30sF/PDK30sR กับต้นอินทผลัมพันธุ์ KL1 และพันธ์บาฮี ที่ทราบเพศแล้ว จำนวน 120 ตัวอย่าง พบว่า เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่นี้ร่วมกันในปฏิกิริยา PCR สามารถแยกเพศอินทผลัมได้ 100% โดยคู่ไพรเมอร์ PDK30sF และPDK30sR สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส ได้ทั้งอินทผลัมต้นตัวผู้และตัวเมีย ขณะที่คู่ไพรเมอร์ DpDOAmale5F และ DpDOAmale4R สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส ได้เฉพาะต้นตัวผู้ ซึ่งจะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ เฉพาะต้นตัวผู้ (Figure 3) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า คู่ไพรเมอร์ DpDOAmale5F และ DpDOAmale4R สามารถแยกต้นอินทผลัมเพศผู้ได้ ดังนั้น จึงสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกต้นตัวผู้และต้นตัวเมียในการแยกเพศของอินทผลัมต่อไป

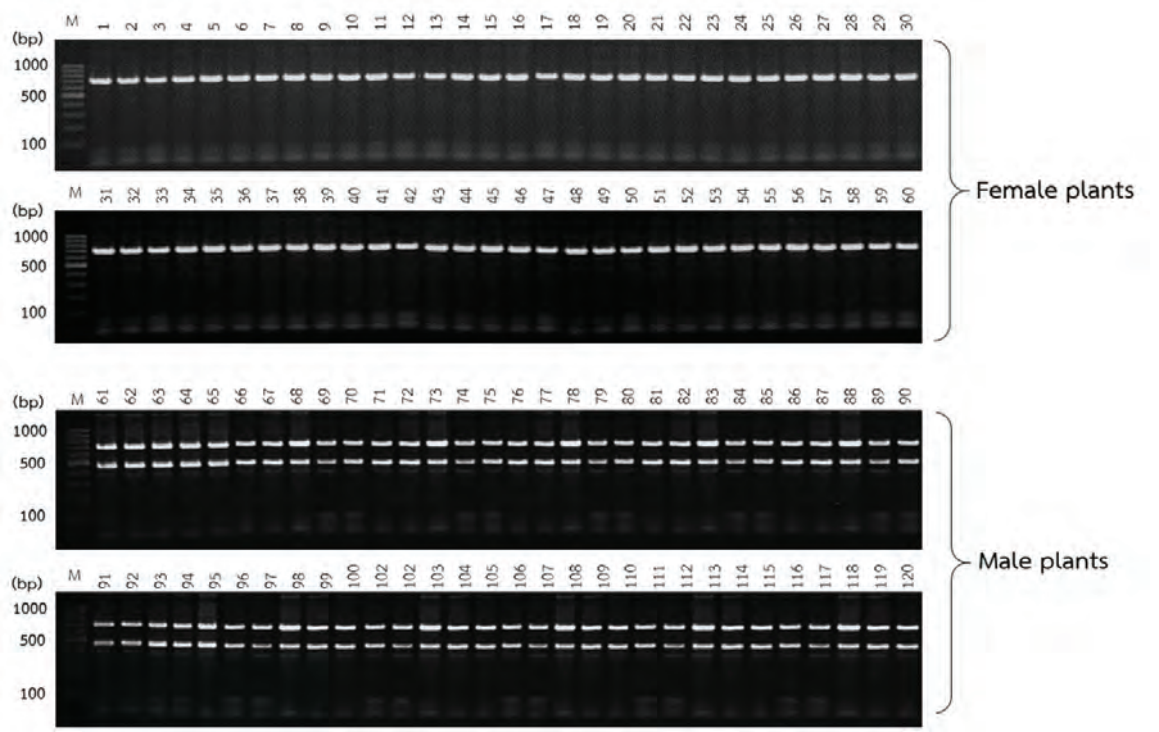

Figure 3 Agarose gel electrophoresis shows DNA pattern between male and female Date palm (KL1 and Bahee varieties) using male selective primers (DpDOAmale5F/ DpDOAmale5R) and reference primers (PDK30sF/PDK30sR). The number, 1-60 are individual female plants, and 61-120 are individual male plants. The letter M is 100 bp DNA ladder

3. อัตราส่วนของเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้า

ผลจากการทดสอบการสกัดดีเอ็นเอจำนวนรวม 483 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการใช้ลูกเหล็ก และตรวจสอบเพศด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DpDOAmale5F/DpDOAmale4R และ PDK30sF/PDK30sR พบว่า เป็นต้นเพศผู้ จำนวน 203 ตัวอย่าง และต้นเพศเมียจำนวน 280 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 42:58 (Table 5) ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอ (DNA band pattern) ต้นกล้าอินทผลัมจาก จ.สุพรรณบุรี จำนวน 15 ต้น ที่ตรวจสอบเพศด้วยคู่ไพรเมอร์ข้างต้น ผลการตรวจหารูปแบบของต้นตัวผู้และตัวเมียด้วยวิธีอากาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส ดังแสดงใน Figure 4 สำหรับการปลูกอินทผลัมต่อแปลงต้องการต้นตัวผู้สำหรับการผสมเกสร 8-10% (Dhawan *et al*., 2013) และ นพรัตน์ และคณะ (2558) รายงานว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแถวต้นตัวผู้ต่อตัวเมียอยู่ที่ 1:8 ดังนั้น หากเกษตรกรทราบเพศต้นอินทผลัมก่อน ก็จะช่วยให้สามารถวางแผนการปลูกได้อย่างเหมาะสม ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายลง จะเห็นได้ว่าถ้าเกษตรกรไม่ทราบเพศในระยะต้นกล้า ต้องปลูกต้นอินทผลัม และรอระยะเวลา 3-7 ปี จึงจะทราบเพศ ทำให้เกษตรกรต้องสูญเสียทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายมาก

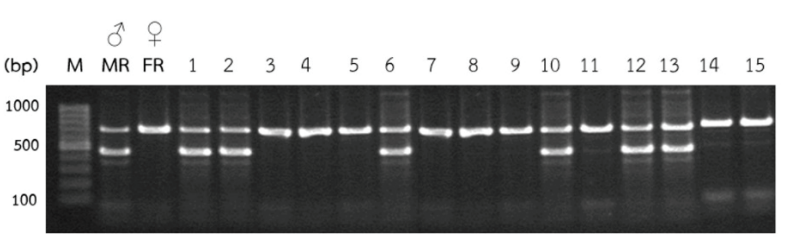

Figure 4 Sex determination of 15 date palm seedling samples from Suphanburi province using primers (DpDOAmale5F/DpDOAmale5R and PDK30sF/PDK30sR) M = 100 bp DNA ladder, MR = a male reference sample, and FR = a female reference sample

Table 5 Number of male and female trees of date palm and percentage of sex ratio when using male selective primer pairs (DpDOAmale5F/DpDOAmale4R) for separation

Sample collection area (province)	No. of tested seedling	Male plant	Female plant
Chaingmai	277	125	152
Kanchanaburi	110	37	73
Nakhonpathom	47	23	24
Nonthaburi	34	12	22
Suphanburi	15	6	9
Total	483	203	280
Sex ratio (%)	-	42	58

สรุปการทดลอง

ได้พัฒนาการสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วด้วยการใช้เม็ดลูกเหล็กกับตัวอย่างใบอินทผลัม ทำให้มีการใช้สารเคมีน้อยลง และได้คู่ไพรเมอร์ DpDOAmale5F และ DpDOAmale4R ที่สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกต้นตัวผู้อินทผลัมพันธุ์ KL1 และพันธุ์บาฮี ออกจากต้นตัวเมียได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า โดยใช้ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ PDK30sF และ PDK30sR ในปฏิกริยา PCR วิธีการนี้สามารถแยกเพศของอินทผลัมได้อย่างชัดเจนตั้งแต่ระยะกล้าช่วยให้เกษตรสามารถวางแผนผังแปลงปลูก ลดระยะเวลาในการทราบเพศ และลดค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาต้นอินทผลัมในระหว่างรอการออกดอกเพื่อทราบเพศ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และขอขอบคุณ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ผู้เชี่ยวชาญขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม นางสุรภี กีรติยะอังกูร ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตร คุณอนุรักษ์ บุญลือ ดร.ศักดิ์ ลำจวน คุณจุฑาพล คงขลิ ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในการทดลอง และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างดีเอ็นเอและใบอินทผลัมสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

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

นพรัตน์ อินถา, กวี สุจิปุลิ, ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์ และ พีระศักดิ์ ฉายประสาท. 2558. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการจำแนกเพศอินทผลัมไทย (แม่โจ้ 36). หน้า 68-73. *ใน:* การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 14 “พืชสวนไทยไร้พรมแดน”. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 33 ฉบับพิเศษ 1:

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. *Am. J. Bot*. 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. *Mol. Ecol. 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 Phytol*. 197: 409-415.

Dhawan, C., P. Kharb, R. Sharma, S. Uppal and R.K. Aggarwal. 2013. Development of Male-Specific Scar Marker in Date Palm (Phoenix Dactylifera L.). *TREE GENET. GENOMES.* 9(5): 1143-1150.

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. Available at : http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC Accessed: 15 Dec 2017

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*. pp. 399-403. *In*: Smartt J, Simmonds NW (eds), Evolution of crop plants, 2nd ed. Longman, London.