การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วง โดยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด เอส เอส อาร์

อุบลวรรณ หงษ์อินทร์

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2561

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วง โดยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด เอส เอส อาร์

อุบลวรรณ หงษ์อินทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วง
โดยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด เอส เอส อาร์

อุบลวรรณ หงษ์อินทร์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชสวน

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(อาจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

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

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริวัฒน์ สาครวาสี)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

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

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วงโดยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด เอส เอส อาร์
ชื่อผู้เขียน นางสาวอุบลวรรณ หงษ์อินทร์
ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายโมเลกุลสามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ ในการศึกษานี้ได้นำเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ ชนิด SSR มาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์มะม่วง 20 พันธุ์ ที่ปลูกรวบรวมในฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ผลการศึกษา พบว่า เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกพันธุ์มะม่วงออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มแก้ว 2) กลุ่มน้ำดอกไม้ 3) กลุ่มหนังกลางวัน 4) กลุ่มอกร่อง และ 5) กลุ่มผลกลม ซึ่งพบว่าลักษณะผลของกลุ่มน้ำดอกไม้ และกลุ่มอกร่อง มีลักษณะผลเชิงคุณภาพที่ดีได้แก่ จินหวง2 มีน้ำหนักผลเท่ากับ 736.64 กรัม ความยาวผลเท่ากับ 201.85 เซนติเมตร และโชคอนันต์มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดเท่ากับ 18.60 องศาบริกซ์ ส่วนน้ำดอกไม้สีทอง2 มีปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ต่ำสุดเท่ากับ 0.24 มิลลิลิตร และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดต่อปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้สูงสุดเท่ากับ 74.64 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น LSD = 0.05 และเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ ชนิด เอส เอส อาร์ (SSR) สามารถจำแนกกลุ่มมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ ออกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์จินหวง1 สามฤดูมัน เขียวใหญ่ มหาโชค จินหวง2 R2E2 และคาราบาว กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์มหาชนก1 มหาชนก2 มันเดือนเก้า และตลับนาค กลุ่มที่ 3 ได้แก่ น้ำดอกไม้สีทอง1 น้ำดอกไม้สีทอง2 น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 และโชคอนันต์ และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ พันธุ์ตึก สามปี แก้วลืมลัง และแก้ว จากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม พบว่ามะม่วงทั้ง 20 พันธุ์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.52 ถึง 0.94 โดยที่พันธุ์แก้วลืมลังและพันธุ์แก้ว มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ 0.94 เมื่อแสดงผลในรูปแผนภูมิความสัมพันธ์ ผลจากการจำแนกกลุ่มสามารถจำแนกสายพันธุ์ของมะม่วงที่มีความคล้ายคลึงกันได้อย่างชัดเจน ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการจัดกลุ่มและคัดเลือกสายพันธุ์มะม่วง สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : มะม่วง, พันธุ์, สัณฐานวิทยา, เอส เอส อาร์

Title STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF MANGO CULTIVARS BY SSR MARKERS TECHNIQUE

Author Miss Ubonwan Hong-in

Degree Master of Science in Horticulture

Advisory Committee Chairperson Dr. Orapin Saritnum

ABSTRACT

Genetic diversity of a mongo cultivars were studied using morphological and molecular markers for breeding program. This study used morphological markers to identify the differences between 20 mango cultivars grown at Maejo University Farm, Chiang Mai. In the result, it was found that morphological characters can be classified into 5 groups 1) Kaeo 2) Namdokmai 3) Nangklangwan 4) Okrong and 5) Round fruit group. Namdokmai group and Okrong group were to good quality and fruit such as Jin Huang2 has the highest weight, 736.64 g. and fruit length, 201.85 cm. Chok Anan has the highest total soluble solids at 18.60°Brix. Namdokmai Sithong2 has the lowest total titratable acidity at 0.24 ml. and the highest total soluble solids/total titratable acidity at 74.64. There are significantly differences at LSD=0.05 level. SSR can identify the mango group of 20 mango cultivars into 4 groups: Group 1 are Jin Huang1, Jin Huang2, R2E2 and Carabao. Group 2 are Mahachanok1, Mahachanok2, Mandueankao and Talapnak. Group 3, Namdokmai Sithong1, Namdokmai Sithong 2, Namdokmai No.4-1, Namdokmai No.4-2 and Chok Anan. And group 4 are Tuek, Sampi, Kaeo and Kaeo Luemrang. Calculation coefficient as genetic (similarity coefficient) found that all 20 mango cultivars of the coefficient of genetic had similarity at between 0.52 to 0.94. The highest genetic similarity coefficient was 0.94 when presented in the dendrogram. The result of the classification can clearly be classified as mango cultivars. This data will be useful for further classifying and selecting mango cultivars in breeding program.

Keyword : Mango; Cultivars; Morphological; SSR

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณได้ ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.วินัย วิริยะอลงกรณ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริวัฒน์ สาครวาสี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางในการศึกษา ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้ (สาขาไม้ผล) คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสวนดุษณี อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และให้คำแนะนำในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานต่างๆ ทุกท่าน

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว พี่น้อง และเพื่อนร่วมงานที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจเสมอมา สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ แนะนำ ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือดูแล และให้กำลังใจเสมอมา จนจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จ

อุบลวรรณ หงษ์อินทร์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญภาพ ..... ญ

สารบัญตาราง ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

ขอบเขตของการศึกษา 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร 3

ลักษณะทั่วไปของมะม่วง 3

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 4

ความสำคัญทางเศรษฐกิจ 5

การจัดจำแนกกลุ่มพันธุ์มะม่วง 5

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วง 13

เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker techniques) 14

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Mean) 22

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22

บทที่ 3 วิธีการวิจัย 27
1. สถานที่ทำการทดลอง 27
2. พันธุ์ 27
3. วิธีการทดลอง 28
บทที่ 4 30
ผลการวิจัยและวิจารณ์ 30
การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ 30
การทดลองที่ 2 การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วงโดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SSR 36
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 43
สรุปผลการทดลอง 43
ข้อเสนอแนะ 44
บรรณานุกรม 45
ภาคผนวก ก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ 50
ภาคผนวก ข เครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR 61
ประวัติผู้วิจัย 79

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มแก้ว 6

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มเขียวเสวย 7

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มน้ำดอกไม้..... 8

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มหนังกลางวัน 9

ภาพที่ 5 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มอกร่อง 10

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มพราหมณ์ 11

ภาพที่ 7 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มผลกลม 12

ภาพที่ 8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับไพรเมอร์ SSR19 36

ภาพที่ 9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับไพรเมอร์ LMMA5 37

ภาพที่ 10 แผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA 41

ภาพที่ 11 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ จาก 33 ไพรเมอร์ที่ได้จากเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR 42

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและผลมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ 31

ตารางที่ 2 ลักษณะเชิงคุณภาพของผลมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ 34

ตารางที่ 3 จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์แถบที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแต่ละไพรเมอร์ 38

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน มีโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (Diploid) คือ 2n = 2x = 40 (Sennhenn *et al.,* 2014) เนื่องจากมะม่วงเป็นพืชที่มีการผสมข้ามสูง จึงทำให้มีจำนวนชนิดพันธุ์ที่หลากหลาย (เกศิณี, 2528) มะม่วงบางพันธุ์มีลักษณะรูปร่างผล สีผล รสชาติ และกลิ่นที่คล้ายกัน เพียงแต่ปลูกในพื้นที่ต่างกัน จึงมีชื่อพันธุ์แตกต่างกันไปทำให้เกิดความสับสนในการเรียกชื่อมะม่วงแต่ละพันธุ์นั้นๆ นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการอธิบายความหลากหลายของสายพันธุ์แล้ว เทคนิคการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอได้มีการใช้เพิ่มมากขึ้น กลุ่มนักวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาความแปรปรวนระหว่างสายพันธุ์มะม่วง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่แตกต่างกันทั่วทุกมุมโลก (Begum *et al.,* 2014) การศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายโมเลกุลสามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ได้ (Kumar *et al.,* 2013) ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่สร้างขึ้นโดยอาศัยหลักการ PCR ซึ่งมีความรวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือได้ถูกนำมาใช้เพื่อระบุลักษณะจีโนไทป์ของมะม่วงจากรูปแบบของอัลลีลที่แตกต่างกัน (Kheshin *et al.,* 2016) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและผลมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ ที่ปลูกรวบรวมไว้ ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้ (สาขาไม้ผล) ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ และประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วงโดยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR เพื่อจัดจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วงแต่ละพันธุ์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะถูกเก็บรักษาไว้ในฐานข้อมูลพันธุกรรมมะม่วงเพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการตรวจสอบสายพันธุ์ตลอดจนการคัดเลือกสายพันธุ์มะม่วงในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1) เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของมะม่วง ได้แก่ ลักษณะใบและลักษณะผลของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ

2) เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วง โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์

ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและผล และประเมินค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วง จำนวน 20 พันธุ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบสายพันธุ์ ตลอดจนการคัดเลือกสายพันธุ์มะม่วงเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของมะม่วง

มะม่วง เป็นไม้ผลยืนต้น จัดอยู่ในสกุล *Mangifera* อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Mangifera indica* L. ซึ่งจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด ในวงศ์ Anacardiaceae มะม่วงมีต้นกำเนิดในเอเชียเขตร้อน แถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ภาคตะวันตกของพม่า และบังคลาเทศ (Tsai *et al.,* 2013) มะม่วงเป็นหนึ่งในผลไม้ที่ดีในด้านของการนำมารับประทานทั้งผลดิบและผลสุก เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลักงการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา, 2556) และมีความสำคัญในภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนของโลก

มะม่วง มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (Diploid) คือ 2n = 2x = 40 (Tsai *et al.,* 2013) เนื่องจากมะม่วงเป็นพืชที่มีการผสมข้ามสูงจึงทำให้มีจำนวนชนิดพันธุ์ที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามมะม่วงแต่ละพันธุ์จัดเป็นกลุ่มของพืชที่มีส่วนประกอบทางพันธุกรรมที่แน่นอน และสามารถสืบทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ ซึ่งลักษณะประจำพันธุ์จะไม่เหมือนกับพันธุ์อื่น (เกศิณี, 2528) พันธุ์มะม่วงในเขตร้อนจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ตัวอ่อนของเมล็ด (Dillon *et al.,* 2013) ได้แก่

1) กลุ่มอินเดีย monoembryonic คือ เมื่อเพาะเมล็ดหนึ่งเมล็ดแล้วจะได้ต้นกล้าเพียงต้นเดียว ต้นกล้านี้เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างต้นพ่อกับต้นแม่ มีชื่อเรียกตามลักษณะการเกิดว่า zygotic seedling ส่วนใหญ่อยู่ในเขตกึ่งร้อนแถบเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ของอินเดีย (Ahmad *et al.,* 2008) เปลือกผลจะมีสีเข้มมาก มีการผสมของสีแดง สีม่วง และสีเหลือง (Luo *et al.,* 2011) รูปร่างผลค่อนข้างกลมหรือกลมแบน เนื้อมีรสหวานและกลิ่นแรง มีเสี้ยนหรือไม่มี

2) กลุ่มอินโดจีน polyembryonic คือ เมื่อเพาะเมล็ดเพียงเมล็ดเดียวจะได้ต้นกล้าจำนวน 2-6 ต้น ต้นกล้าเหล่านี้มีเพียงต้นเดียวที่เกิดจากการผสมพันธุ์ ส่วนต้นกล้าที่เหลือเกิดมาจากเยื่อหุ้มไข่ มีชื่อเรียกตามลักษณะการเกิดว่า nucellar seedling ส่วนใหญ่อยู่ในเขตร้อน แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พม่า ไทย มาเลเซีย จีน และอินโดนีเซีย (Ahmad *et al.,* 2008) เปลือกผลมีสี ไม่เข้มมาก สีเขียวกลายเป็นสีเขียวสว่าง ไปจนถึงสีเหลือง (Luo *et al.,* 2011) รูปร่างผลยาวแบน รสชาติและกลิ่นหอมนุ่มนวล ไม่มีเสี้ยน

มะม่วง เป็นไม้ผลที่ได้รับความนิยมมากในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน จึงมักจะถูกเรียกว่าเป็นราชาแห่งผลไม้ ในเขตร้อนของโลก (Rymbai *et al.,* 2014) ปัจจุบันมีการปลูกกระจายหลายประเทศทั่วโลกและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก ในประเทศไทยมีการปลูกมะม่วงมาเป็นเวลานาน

เป็นไม้ผลที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายสามารถปลูกได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ จนปัจจุบันกลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากชนิดหนึ่งของประเทศไทย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ราก มะม่วงเป็นไม้ยืนต้นจึงมีระบบรากเป็นรากแก้ว รากสามารถหยั่งลึกลงสู่ดินได้ลึกพอสมควร สำหรับรากดูดอาหารจะอยู่หนาแน่นที่บริเวณผิวดินและจะแผ่กว้างออกเป็นรัศมีโดยรอบต้น (ประเสริฐ, 2548)

ลำต้น ลักษณะลำต้นตรง สูงประมาณ 10-14 เมตร มีสีน้ำตาลเทาหรือเกือบดำ ขนาดของลำต้นขึ้นอยู่กับพันธุ์และอายุของต้นมะม่วง เปลือกของลำต้นจะแข็ง มีลักษณะขรุขระและมีเกล็ดมาก เปลือกอ่อนสีเขียว แต่เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เนื้อไม้เมื่อมีอายุน้อยจะมีสีเขียวเมื่อแก่มีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแกมแดง มีกิ่งก้านสาขาใหญ่และแข็งแรง ลักษณะทรงพุ่มเป็นรูปครึ่งวงกลมหรือรูปไข่ค่อนข้างยาว (ประเสริฐ, 2548)

ใบ ใบมะม่วงเป็นใบเดี่ยวเรียงตัวสลับกัน ทำให้มีลักษณะใบเรียงตัวเป็นเกลียว ที่บริเวณปลายกิ่งมักจะมีใบเกิดถี่ ใบไม่มีขน ไม่มีหูใบ ผลิใบออกมาเป็นระยะๆ ใบอ่อนมักมีสีออกแดงเมื่อใบแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ผิวใบเป็นมัน ก้านใบยาวประมาณ 1-10 เซนติเมตร หรือบางมากกว่านั้น แผ่นใบยาวประมาณ 8-40 เซนติเมตร หรือมากกว่านั้น ใบมีรูปร่างแบบรูปโล่ รูปหอก รูปไข่ และเรียวยาว ฐานใบแคบและค่อยๆ กว้างออกเป็นรูปลิ่มแหลม ปลายใบแหลม ขอบใบมักจะเป็นคลื่น เส้นกลางใบเด่นชัดและมีเส้นใบย่อยจำนวนมาก (ประเสริฐ, 2548)

ช่อดอกและดอก มะม่วงเป็นไม้ผลที่มีช่อดอกขนาดใหญ่ ช่อดอกเป็นแบบ panicle ในช่อหนึ่งมีดอกย่อยตั้งแต่ 300-7,000 ดอก มะม่วงจะออกดอกบริเวณยอด ในยอดหนึ่งๆ อาจประกอบด้วยก้านช่อหลายกิ่ง (วิจิตร, 2529) ช่อดอกยาวประมาณ 10-16 เซนติเมตร ก้านช่อดอกมักเจือสีแดงและมักมีขน ในแต่ละช่อดอกประกอบด้วย ดอกสมบูรณ์เพศหรือดอกกะเทย และดอกตัวผู้ (ประเสริฐ, 2548)

ดอกมะม่วงมีการเรียงตัวเป็นช่อดอกแบบ cyme ก้านดอกสั้นมาก ดอกมีกลิ่นหอม ดอกมีหลายสีแตกต่างกัน เช่น สีแดง ชมพู หรือขาว กลีบเลี้ยงมักมี 5 กลีบแยกกัน มีลักษณะโค้งนูน สีเขียวอมเหลือง มีขนแข็งยาวๆ ปกคลุมอยู่ กลีบดอกมักมี 5 กลีบ จะยาวเป็น 2 เท่า ของกลีบเลี้ยง มีสีเหลืองและมีร่องสีเหลืองเข้มด้านใน เมื่อแก่กลีบดอกจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู (ประเสริฐ, 2548)

ผล มะม่วงเป็นผลประเภทผลเดี่ยว (simple fruit) เป็นผลที่มีเนื้อสด (fleshy fruit) (เกศิณี, 2528) ผลมีเมล็ดเดียวแข็ง (drupe) ผลมะม่วงมีความแตกต่างกันมากในเรื่องของขนาด รูปร่าง สี ปริมาณเสี้ยน รสชาติ และกลิ่น แต่ผลมะม่วงจะมีผิวเรียบ รูปร่างของผลมีตั้งแต่กลมไปจนถึงรูปไข่

ค่อนข้างยาว สีของผลประกอบด้วยส่วนผสมของสีต่างๆ เช่น สีเขียว เหลือง และแดง รสชาติมีตั้งแต่หวานและฉ่ำน้ำมากไปจนถึงเปรี้ยว กลิ่นมีตั้งแต่กลิ่นอ่อนไปจนถึงกลิ่นรุนแรง (ประเสริฐ, 2548)

ผลมะม่วงมีเปลือก 3 ชั้น คือ เปลือกชั้นนอกจะหนา และมีต่อมเกิดเป็นจุดๆ เปลือกชั้นกลาง คือส่วนที่เป็นเนื้อรับประทานได้ ความหนาของเนื้อมากน้อยขึ้นอยู่กับพันธุ์ และเปลือกชั้นใน คือส่วนที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ด มีลักษณะเป็นเสี้ยนและแข็งคล้ายไม้ (ประเสริฐ, 2548)

เมล็ด เมล็ดอยู่ถัดจากเปลือกชั้นในเข้าไปมีขนาดแตกต่างกันไปตั้งแต่ใหญ่ไปจนถึงเกือบไม่มีเมล็ดหรือเมล็ดลีบ (ประเสริฐ, 2548) เปลือกหุ้มเมล็ดมีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือชั้นนอก (testa) และชั้นใน (tegmen) (เกศิณี, 2528)

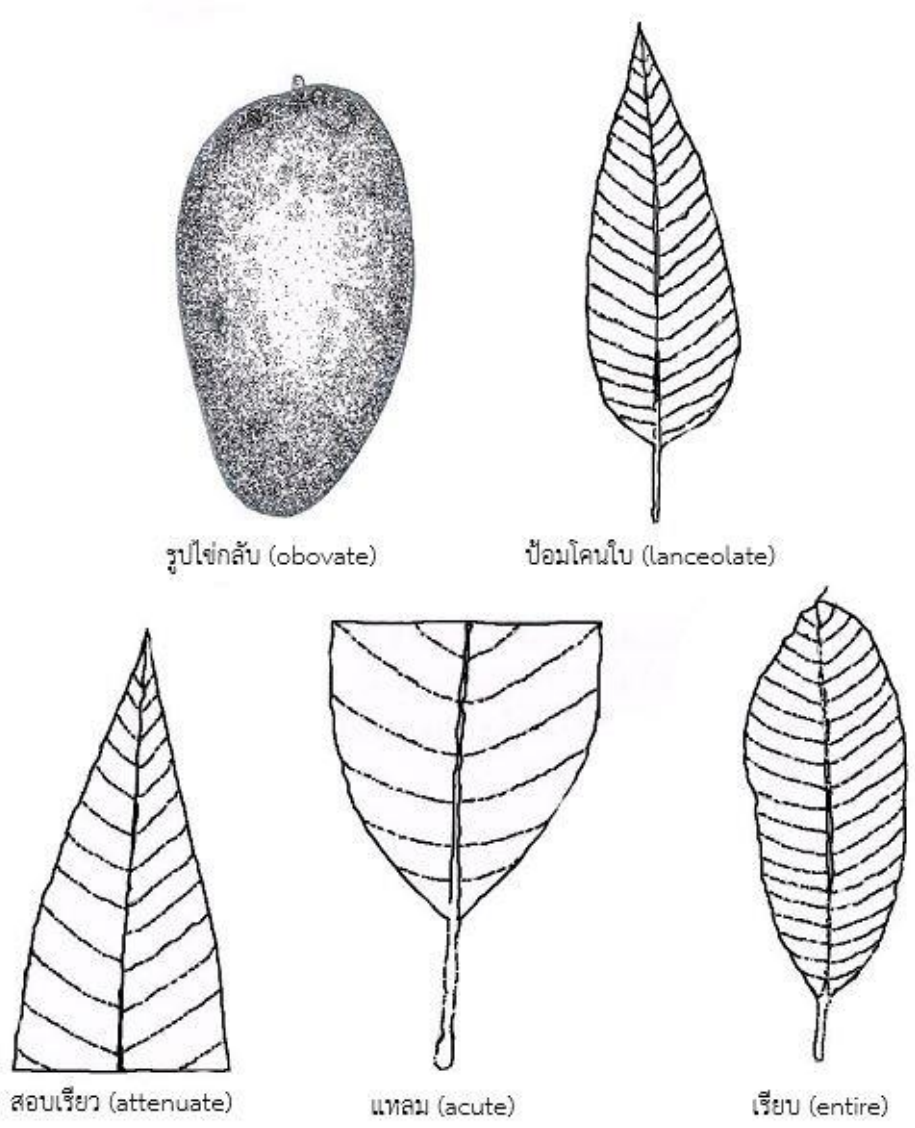
ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

มะม่วง จัดเป็นไม้ผลเขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศ ในปี 2555 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกทั้งสิ้น 2,046,280 ไร่ แหล่งผลิต 5 อันดับแรก ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา สุพรรณบุรี ฉะเชิงเทรา อุดรธานี และอุทัยธานี ผลผลิตทั้งหมด 2,985,530 ตัน (1,459 กิโลกรัมต่อไร่) ผลผลิตมะม่วงที่ได้ส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศ ส่วนการส่งออกมีมูลค่ารวมกว่า 2,000 ล้านบาท (มะม่วงสด มะม่วงบรรจุภัณฑ์ชนิดอัดลม มะม่วงอบแห้ง และมะม่วงแช่แข็ง) โดยส่งออกในรูปมะม่วงสดประมาณ 44,450 ตัน คิดเป็นมูลค่า 935 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555) ประเทศคู่ค้าที่สำคัญ คือ ประเทศเวียดนาม ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ สหรัฐอเมริกา อังกฤษ จีน เยอรมัน และเบลเยี่ยม คู่แข่งที่สำคัญ คือ ฟิลิปปินส์และอินเดีย จะเห็นว่าการส่งออกในปัจจุบันมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับผลผลิตที่ได้ แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ มีโอกาสพัฒนาศักยภาพในการผลิตและการตลาดในการส่งออกสูง เนื่องจากผลมะม่วงมีคุณภาพดี มีคุณค่าทางโภชนาการ อร่อย หอม รสชาติหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย ซึ่งเป็นที่ชื่นชอบของชาวต่างชาติ

การจัดจำแนกกลุ่มพันธุ์มะม่วง

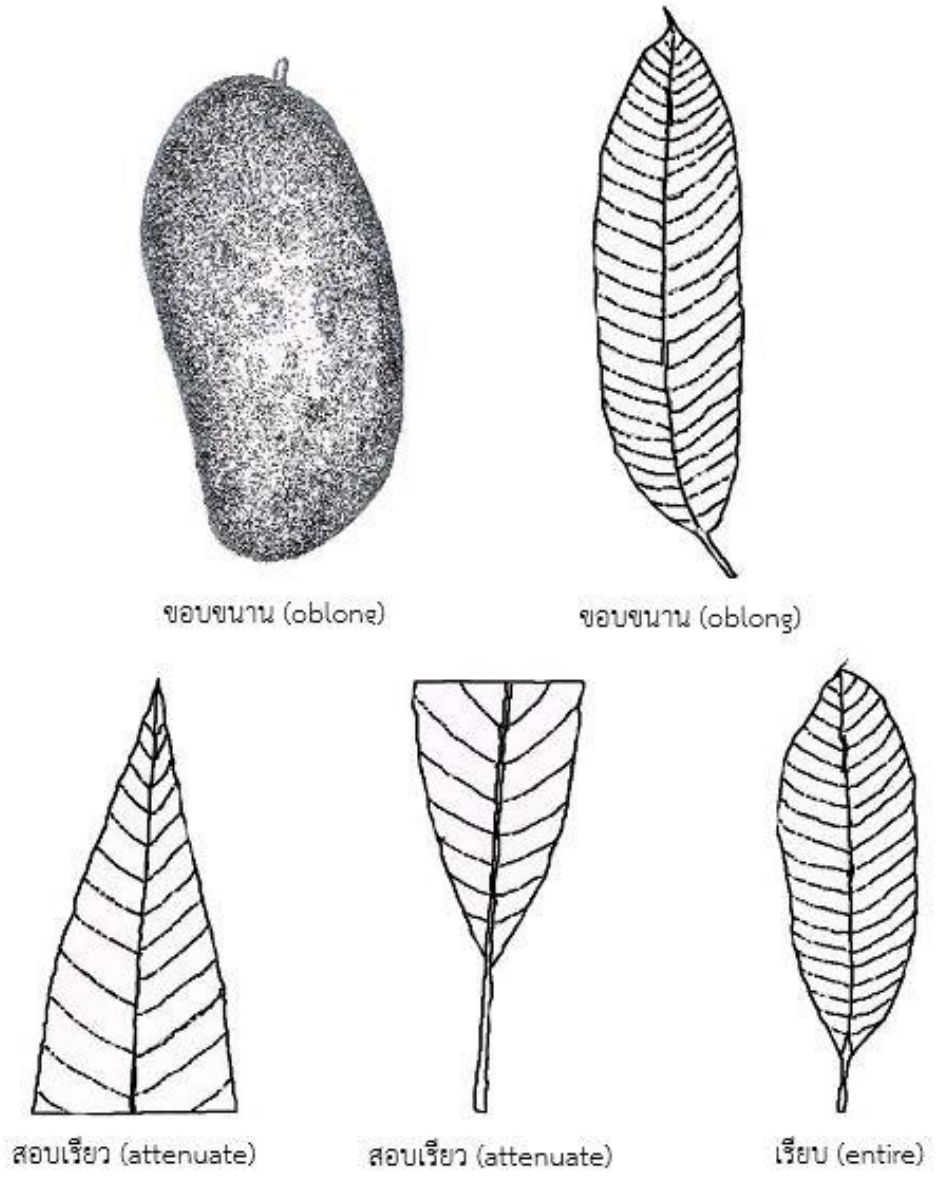
มะม่วงเป็นไม้ผลเขตร้อนที่สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย แต่เดิมมะม่วงขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเมล็ดจึงทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ และมีการกระจายของสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างไปจากต้นแม่ จึงทำให้มะม่วงมีลักษณะที่แตกต่างหรือเหมือนกันขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและการดูแลรักษา ดังนั้นจึงได้มีการจัดแบ่งกลุ่มพันธุ์มะม่วง โดยใช้ลักษณะใบและทรงผลเป็นหลัก (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) ซึ่งสามารถจัดจำแนกกลุ่มได้ ดังนี้

1. กลุ่มแก้ว ลักษณะทรงผล รูปไข่กลับ (obovate) ลักษณะทรงใบ รูปป้อมโคนใบหรือใบหอก (lanceolate) ลักษณะปลายใบ สอบเรียว (attenuate) ลักษณะฐานใบ แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ คลื่น (undulate)



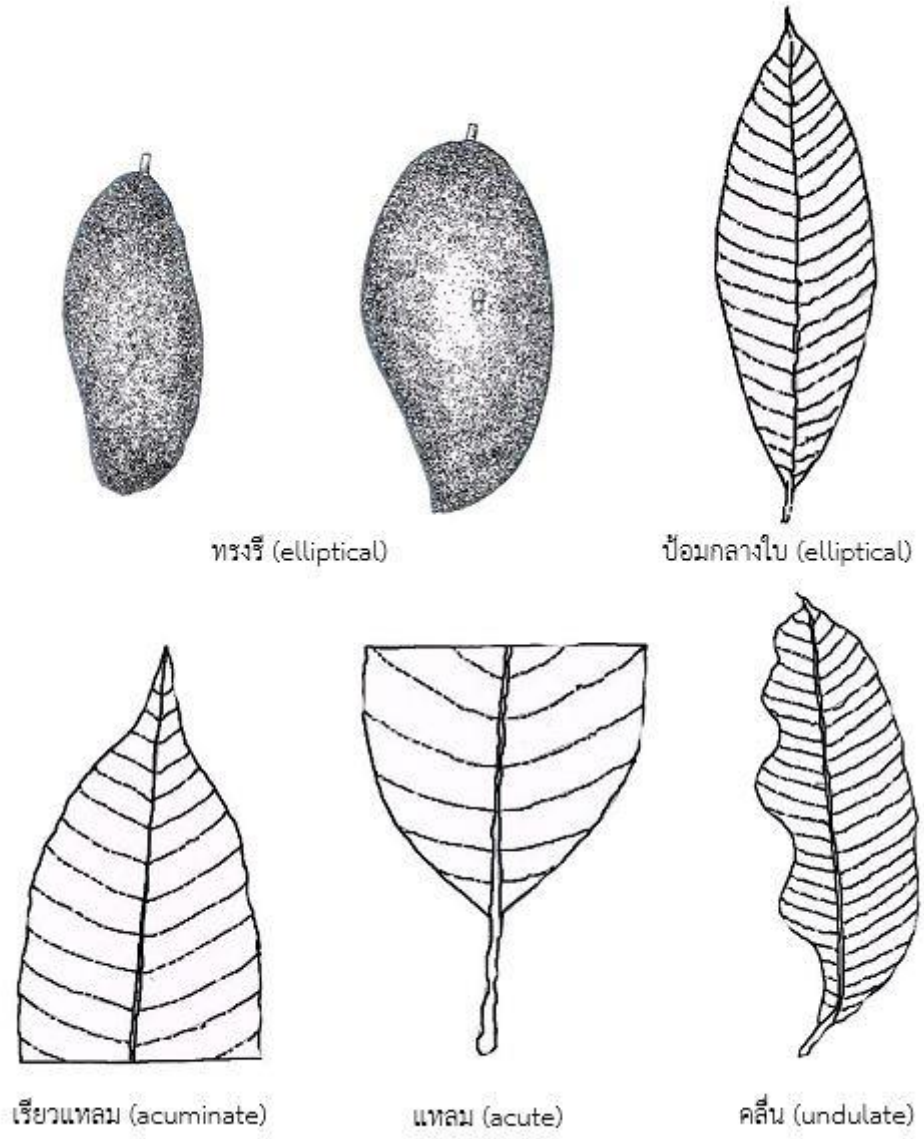
ภาพที่ 1 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มแก้ว
ที่มา : สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544

2. กลุ่มเขียวเสวย มีลักษณะทรงผล (fruit shape) รูปขอบขนาน (oblong) ลักษณะทรงใบ (leaf shape) ขอบขนาน (oblong) ลักษณะปลายใบ (leaf apex) สอบเรียว (attenuate) ลักษณะฐานใบ (leaf base) สอบเรียว (attenuate) ขอบใบ (leaf margin) เรียบ (entire)



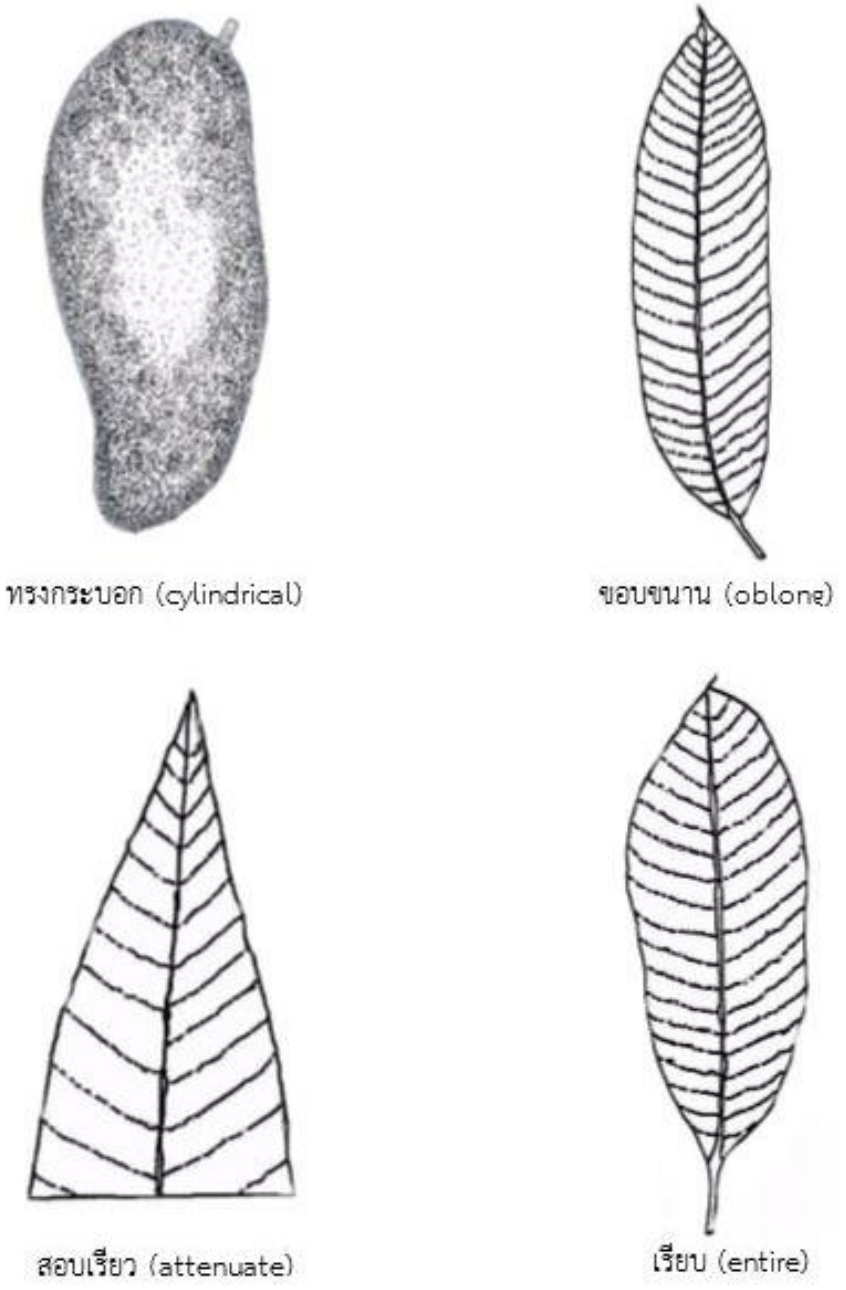
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มเขียวเสวย
ที่มา : สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544

3. กลุ่มน้ำดอกไม้ มีลักษณะทรงผล ทรงรี (elliptical) ลักษณะทรงใบ ป้อมกลางใบ (elliptical) ลักษณะปลายใบ เรียวแหลม (acuminate) ลักษณะฐานใบ แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ คลื่น (undulate)



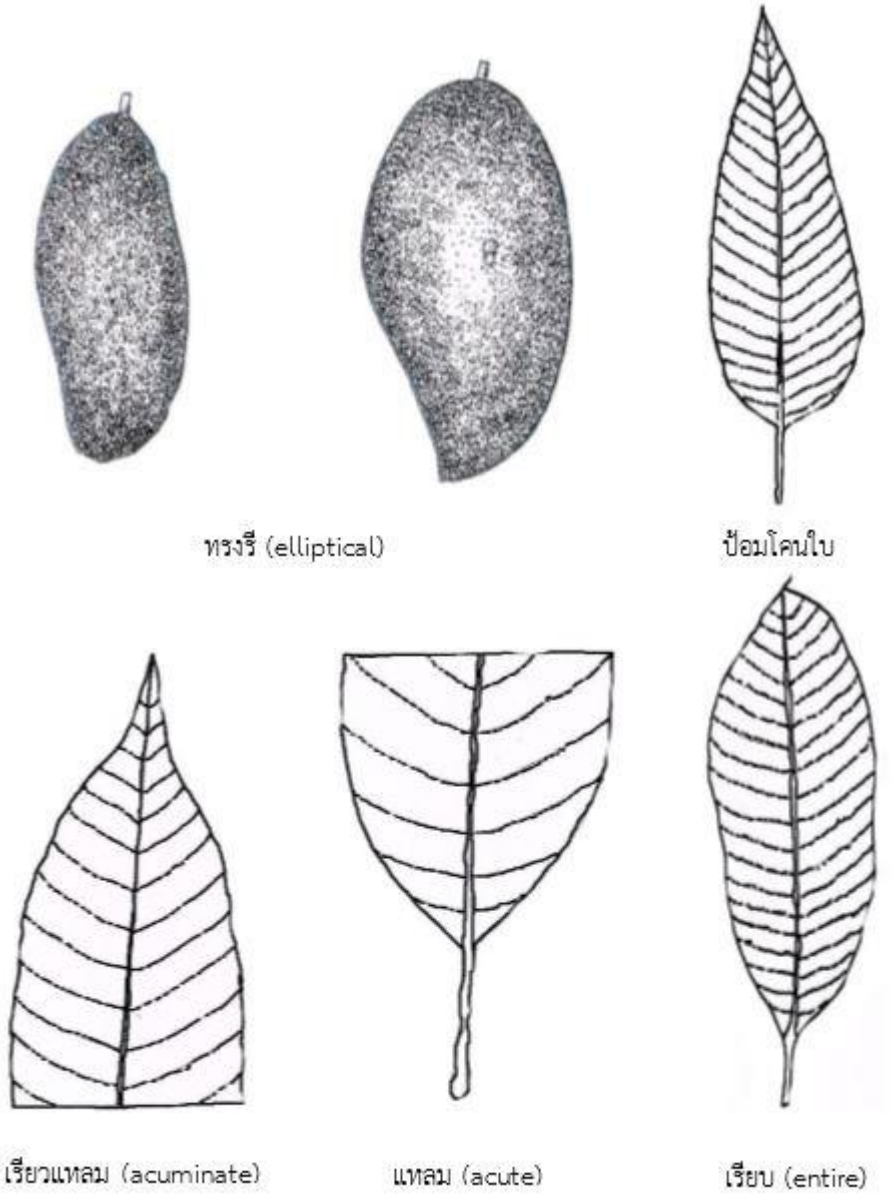
ภาพที่ 3 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มน้ำดอกไม้
ที่มา : สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544

4. กลุ่มหนังกลางวัน มีลักษณะทรงผล (fruit shape) ทรงกระบอก (cylindrical) ลักษณะทรงใบ (leaf shape) ขอบขนาน (oblong) ลักษณะปลายใบ (leaf apex) สอบเรียว (attenuate) ลักษณะขอบใบ (leaf margin) เรียบ (entire)



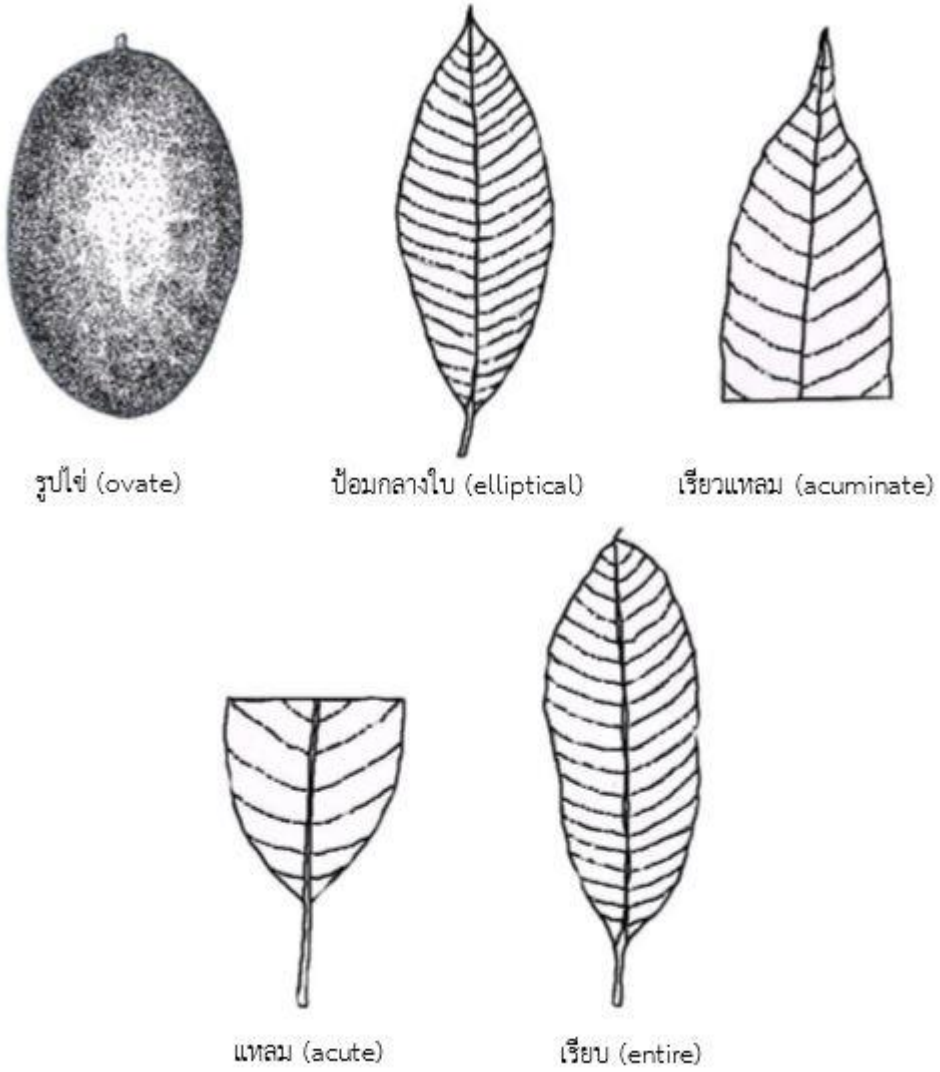
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มหนังกลางวัน
ที่มา : สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544

5. กลุ่มอกร่อง มีลักษณะทรงผล (fruit shape) ทรงรี (elliptical) ลักษณะทรงใบ (leaf shape) ป้อมกลางใบ (elliptical) ลักษณะปลายใบ (leaf apex) เรียวแหลม (acuminate) ลักษณะฐานใบ (leaf base) แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ (leaf margin) เรียบ (entire)



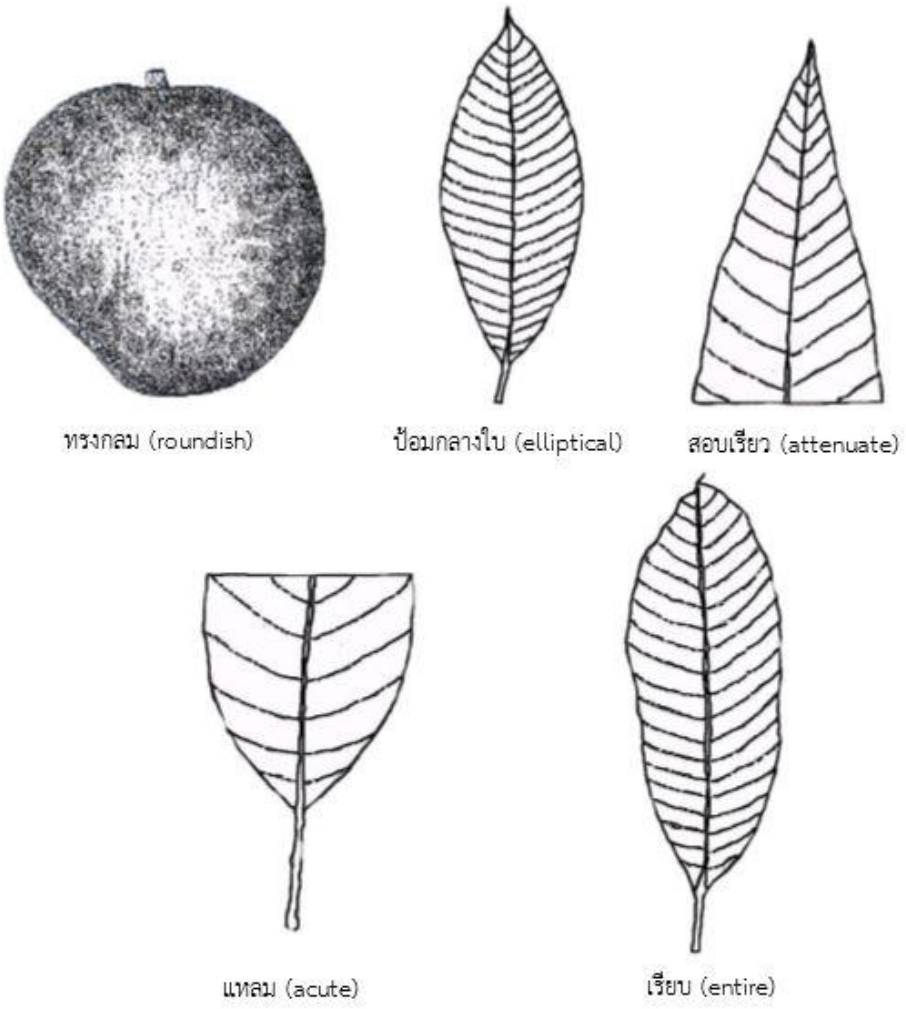
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มอกร่อง
ที่มา : สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544

6. กลุ่มพราหมณ์ มีลักษณะผล (fruit shape) รูปไข่ (ovate) มีลักษณะทรงใบ (leaf shape) ป้อมกลางใบ (elliptical) ลักษณะปลายใบ (leaf apex) เรียวแหลม (acuminate) ลักษณะฐานใบ (leaf base) แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ (leaf margin) เรียบ (entire)



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มพราหมณ์
ที่มา : สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544

7. กลุ่มผลกลม มีลักษณะทรงใบ (leaf shape) ป้อมกลางใบ (elliptical) ลักษณะปลายใบ (leaf apex) เรียวแหลม (acuminate) ลักษณะฐานใบ (leaf base) แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ (leaf margin) เรียบ (entire) ลักษณะทรงผล (fruit shape) ทรงกลม (roundish)



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะทรงผล ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบของมะม่วงกลุ่มผลกลม
ที่มา : สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544

8. กลุ่มเบ็ดเตล็ด มีลักษณะทรงผลหลายแบบไม่สามารถจัดในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง ส่วนลักษณะทรงใบ ลักษณะฐานใบ ลักษณะขอบใบ มีลักษณะไม่อยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง อาจมีลักษณะกลุ่มหนึ่งปนกับลักษณะอีกกลุ่มหนึ่ง (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วง

มะม่วงเป็นพืชที่มีการผสมข้ามสูงและพันธุ์ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นผ่านการคัดเลือกจากลักษณะที่ต้องการในหมู่ต้นกล้าที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ในบริเวณที่มีการปลูกมะม่วงที่หลากหลายโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์จะมีความคืบหน้าในการพัฒนาพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานโรคและมีประสิทธิผล การผสมข้ามที่เกิดขึ้นได้สูงและการรวมตัวกันของลักษณะเฉพาะในมะม่วงมีส่วนอย่างมากที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วง (Luo *et al.,* 2011) ระยะเวลาที่ยาวนานของการเพาะปลูกในธรรมชาติ การผสมข้าม การกลายพันธุ์ และการผสมข้ามสายเลือด มีส่วนในความหลากหลายทางพันธุกรรมในมะม่วงนอกจากการผสมเปิดระหว่างสายพันธุ์ (Krishnapillai and Wijeratnam, 2016) มะม่วงหลากหลายพันธุ์ได้รับการคัดเลือกจากต้นกล้าที่เกิดขึ้นจากการผสมเปิดตามธรรมชาติ และพันธุ์ที่ปลูกในเชิงพาณิชย์จะเกิดขึ้นจากการเลือกต้นกล้าที่มีลักษณะผลแตกต่างกัน เช่น สีผล รสชาติ กลิ่น ขนาด และลักษณะอื่นๆ ต่อมาสายพันธุ์เหล่านี้จะได้รับการขยายพันธุ์ให้เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และปลูกในพื้นที่กว้าง นอกจากนี้ ยังมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันหรือคำพ้อง ซึ่งได้ถูกนำมาใช้เป็นพันธุ์เดียวกันซึ่งยิ่งเพิ่มความยากลำบากในการระบุสายพันธุ์ที่แน่นอน (Luo *et al.,* 2010)

วิธีการทั่วไปของการระบุความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์มะม่วงจะขึ้นอยู่กับการอธิบายลักษณะของใบ ผล และผลที่มีเมล็ดแข็ง ก่อนหน้านี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของผลจะถูกนำมาใช้ในการระบุความแปรปรวนระหว่างสายพันธุ์ในมะม่วง (Kheshin *et al.,* 2016) ผลมะม่วงมีความแตกต่างกันมากในเรื่องของขนาด รูปร่าง สี ปริมาณเสี้ยน รสชาติ และกลิ่น มะม่วงหลากหลายสายพันธุ์มีลักษณะของเนื้อผล รสชาติ และกลิ่นหอมที่โดดเด่น ความสามารถในการให้ผลผลิตของต้นมะม่วงจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุต้น ขนาดของต้น เงื่อนไขตามฤดูกาลและประวัติการเพาะปลูกก่อนหน้านี้ (Krishnapillai and Wijeratnam, 2016)

ในกรณีส่วนใหญ่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะได้รับการประเมินจากสายตา และลักษณะทางพันธุกรรมจะได้รับการประเมินจากการศึกษาความแปรปรวนในหมู่ประชากรในพืชไม้ผล ในชนิดของไม้ผล ลักษณะเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพเป็นประโยชน์ในการระบุและการประเมินความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ และการเลือกรูปแบบที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตไม้ผลขนาดใหญ่ ลักษณะเหล่านี้ช่วยในการพัฒนาพันธุ์พืชในอนาคต ในมะม่วงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องหมายที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและเก่าแก่ที่สุด ซึ่งสำหรับบางกรณีอาจจะยังคงเหมาะสมที่สุดในการใช้ระบุความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ (Begum *et al.,* 2013)

นอกเหนือจากความแตกต่างของลักษณะผลของมะม่วงที่มีความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ที่แตกต่างกันแล้ว ในมะม่วง (Rymbai *et al.,* 2014) ตั้งข้อสังเกตการเปลี่ยนแปลงในความหนาแน่น

ของใบ รูปร่างของแผ่นใบ ลักษณะใบ ปลายใบ สีของใบใหม่ และใบแก่ และการจัดเรียงของเส้นกลางใบ ซึ่งจะสามารถทำให้เกิดความแตกต่างในพันธุ์เหล่านั้น

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ผล ลำต้น และส่วนต่างๆ ของพืชได้ถูกนำมาใช้ประเมินความแตกต่างกันสำหรับไม้ผล เช่น มะม่วง (Kheshin *et al.,* 2016) กล้วย (Gibert *et al.,* 2009) และส้ม (Domingues *et al.,* 1999) การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาเป็นวิธีการที่ง่ายที่สุดของการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นขั้นตอนแรกที่ควรจะทำก่อนที่จะศึกษาในระดับโมเลกุล เมื่อเร็วๆ นี้ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นโดยวิธี PCR ที่มีความรวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือได้ถูกนำมาใช้เพื่อระบุพันธุ์มะม่วง โดยคำนึงถึงการระบุลักษณะจีโนไทป์ของแต่ละพันธุ์นั้นๆ และการอธิบายลักษณะที่สำคัญของท้องถิ่นสำหรับประชากรที่ไม่ถูกต้อง ดังนั้นการใช้ทรัพยากรทางพันธุกรรมที่มีอยู่จึงมีความสำคัญ (Kheshin *et al.,* 2016)

นอกเหนือจากการใช้อธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิคการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลมีการใช้มากขึ้นสำหรับลักษณะของความแปรปรวนระหว่างสายพันธุ์ของมะม่วง ในมะม่วงลักษณะของความแปรปรวนระหว่างสายพันธุ์ได้รับการดำเนินการโดยกลุ่มนักวิจัยจำนวนมากที่มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่แตกต่างกันทั่วทุกมุมโลก (Begum *et al.,* 2014) ความแตกต่างของยีนระหว่างประชากรสามารถเกิดขึ้นผ่านกลไกที่แตกต่างกันมากมาย ซึ่งรวมถึงการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง การลดลงและการแทรก และนอกเหนือสิ่งอื่น ผ่านจำนวนการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ซ้ำกัน

เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker techniques)

1. ความหมายของเครื่องหมายโมเลกุล

ความหมายทั่วไปของคำว่า “เครื่องหมาย” คือสิ่งที่ใช้บอกความแตกต่างระหว่าง 2 สิ่ง ซึ่งสามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลเป็นสิ่งที่บอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (อรรัตน์, 2548)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เป็นที่มาของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ที่ระดับทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) ระดับชีวเคมี (biochemical marker) และระดับโมเลกุล (molecular marker หรือ DNA marker) ดังนั้นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) จึงมี 3 ประเภท คือ

1.1 Morphological marker เป็นเครื่องหมายที่สามารถมองเห็นได้ทันที ซึ่งก็คือลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะสีตาหรือสีผมในมนุษย์ ลักษณะสีกลีบดอกของ

กุหลาบหรือดอกกล้วยไม้ เป็นต้น เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ชนิดนี้จัดว่าเป็นเครื่องหมายที่ความต้องการมากในวงการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะถ้าเป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ผลผลิตสูง หรือต้านทานต่อโรคแมลง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ และข้อได้เปรียบของเครื่องหมายชนิดนี้คือไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการใดมาตรวจสอบ เพราะสามารถมองเห็นได้ด้วยตา หากแต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดมากเช่นกัน เนื่องจากมีอยู่จำนวนจำกัด และที่สำคัญคือการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยา มักได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่น ความสูงต้น ผลผลิต หรือสีดอกได้รับผลกระทบโดยตรงจากความอุดมสมบูรณ์ของดินหรือปุ๋ย รวมทั้งลักษณะบางลักษณะมีการแสดงออกที่บางระยะการเจริญเติบโตเท่านั้น เช่น ลักษณะสีดอก มีการแสดงออกที่ระยะที่ต้นพืชมีดอก (อรรัตน์, 2548)

1.2 Biochemical marker เป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ วิธีการศึกษาเอนไซม์ค่อนข้างง่าย และถือว่าไม่แพง แต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดที่การแสดงออกของเอนไซม์ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงและระยะการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกันกับ morphological marker นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะเจาะจงต่ำ กล่าวคือ ถ้ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเล็กน้อย ซึ่งอาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียงเล็กน้อยนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้ (อรรัตน์, 2548)

1.3 Molecular marker เป็นเครื่องหมายที่สร้างมาจากชิ้นส่วน DNA ดังนั้นในความหมายเดียวกัน เครื่องหมายชนิดนี้จึงถูกเรียกว่า DNA marker ในทางตรงกันข้ามเครื่องหมายที่กล่าวมาแล้วทั้ง 2 ชนิด molecular marker มีข้อได้เปรียบกว่าตรงที่มีจำนวนมากมายมหาศาล ดังที่ทราบกันว่าขนาดจีโนมของพืชมีประมาณ 10^{-8}-10^{-9} nucleotides ในบางจีโนมพืช พบว่ามีการเกิด single nucleotide mutation ทุกๆ 1 kb สภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายชนิดนี้ จากจุดเด่นของ molecular marker นี้ จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมายในการศึกษาจีโนมและในวงการเกษตร ได้แก่ การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตและการศึกษาความหลากหมายของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น (อรรัตน์, 2548)

Molecular marker หรือ DNA marker สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1) Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค hybridization ตัวอย่าง ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (สรีพร, 2546)

2) PCR-based marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่สนใจ โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่การจำลองตัวของดีเอ็นเอ หรือเทคนิค PCR

(Polymerase chain reaction technique) อาจเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวหรือพร้อมกันหลายตำแหน่งก็ได้ เช่น RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) SSR (Simple Sequence Repeat) เป็นต้น (วงศมน, 2550)

2. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (Marker Assisted Selections; MAS)

ความก้าวหน้าด้านเทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอทำให้เกิดการปฏิวัติแนวทางการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้หลายรูปแบบเรียกวิธีเหล่านี้ว่า Marker Assisted Selections; MAS ซึ่ง MAS เป็นการอ้างถึงเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ (tightly-linked) กับพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะเป้าหมาย (target loci) ซึ่งใช้ในการช่วยคัดเลือกแทนการประเมินการแสดงออกของลักษณะนั้น วิธีการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นอาจจะทำได้โดยการวิเคราะห์ QTL (quantitative traits) หรือการวิเคราะห์รวมกลุ่ม (bulk segregant analysis) เป็นต้น (ธานี, 2555)

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ใน MAS

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (Marker Assisted Selections; MAS) เพื่อเลือกต้นพืชที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการนั้นมี 2 แบบ คือ

1.) การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนที่ต้องการช่วยในการคัดเลือก (indirect MAS; iMAS หรือ linked marker หรือ flaking marker)

2.) การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนช่วยในการคัดเลือก (direct MAS; dMAS หรือ functional marker assisted selection; fMAS)

ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด iMAS จะมีความแม่นยำในการคัดเลือกน้อยกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด fMAS เนื่องจากมีโอกาสที่จะเกิด recombination ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับตำแหน่งยีนที่ต้องการ ทำให้เกิดความผิดพลาดในการคัดเลือกขึ้น ส่วนใจเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด fMAS มีความแม่นยำมาก เนื่องจากใช้ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนที่ต้องการมาเป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (ธานี, 2555)

ข้อดีของ MAS

MAS ทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชมีประสิทธิภาพและประสิทธิผลเมื่อเทียบกับการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) ข้อดีเหล่านี้ได้แก่

1.) วิธีการคัดเลือกที่ง่ายเมื่อเทียบกับวิธีการคัดเลือกโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์

2.) การคัดเลือกสามารถดำเนินการได้ในระยะต้นกล้า

3.) สามารถคัดเลือกเป็นรายต้นได้

ข้อดีเหล่านี้ทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพและช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น สามารถประหยัดเวลาและแรงงานได้เมื่อใช้การประเมินลักษณะที่ต้องการเวลาและแรงงานมาก หรือเป็นลักษณะที่ประเมินยาก ต้องประเมินในช่วงระยะเวลาหรือสถานที่ที่เฉพาะ หรือการประเมินที่ต้องใช้เครื่องมือยุ่งยากซับซ้อน

นอกจากนี้การประเมินด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอจะให้ความน่าเชื่อถือเนื่องจากจะไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องต่อการประเมิน ในบางกรณีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจะมีค่าใช้จ่ายที่ประหยัดกว่าการประเมินโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ และการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอทำให้สามารถลดจำนวนจ้นที่ปลูกทดสอบต่อไปได้จึงทำให้การคัดเลือกในรอบต่อไปมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (ธานี, 2555)

3. เครื่องหมาย Simple Sequence Repeat (SSR)

SSR หรือ Microsatellites เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ ประกอบด้วยดีเอ็นเอสายเดี่ยวเหยียดตรง ซ้ำเป็นช่วงยาวประมาณ 2-6 คู่เบส SSR จะพบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตทั้งหมดที่มีดีเอ็นเอในนิวเคลียส (Hakki *et al.,* 2002) มีข้อมูลว่า SSR มีการแพร่กระจายอย่างสม่ำเสมอตลอดทั้งจีโนมและมักจะมีความจำเพาะเจาะจงสูง (Begum *et al.,* 2014) ความหลากหลายของ SSR เกิดจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ (deletion) หรือการสอดแทรกของลำดับเบสซ้ำ (insertion) การกลายนี้เกิดจากกระบวนการเข้าคู่ผิดตำแหน่งของลำดับเบส (slipped-strand mispairing) ในขณะที่มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ โดยที่มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง เบสซ้ำชนิดนี้พบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆ ของจีโนม และการวิเคราะห์ความหลากหลายของจำนวนชุดเบสซ้ำที่ปรากฏสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มส่วนที่ซ้ำกันของเบส SSR โดยการออกแบบสายดีเอ็นเอเริ่มต้น (primer) ที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันกับลำดับเบสที่ขนาบข้างส่วนซ้ำกันของเบส (flanking DNA) แล้วตรวจสอบความหลากหลายของ PCR product ที่ได้โดยแยกขนาดของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้บน acrylamide gel (วงศมน, 2550)

เครื่องหมาย SSR สามารถใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบ เช่น การศึกษาด้านจีโนม การสร้างแผนที่จีโนม การจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น ทั้งนี้เพราะ SSR กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม และมีความแปรปรวนมากอีกทั้งจำนวนซ้ำของ SSR มีความแตกต่างกันในพืชหรือสัตว์ต่างสายพันธุ์ในชนิด (species) เดียวกัน จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้เป็นอย่างดีในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต เครื่องหมาย SSR จัดว่าเป็น semi-specific primer ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายมาก ผลที่ได้จากการใช้เครื่องหมาย SSR จะเห็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มีหลายแถบเช่นเดียวกับ RAPD และเป็นเครื่องหมายโมเลกุลเป็นชนิด co-dominant จึงสามารถบอกความแตกต่างของ heterozygous และ homozygous ได้ นอกจากนี้ เมื่อทำซ้ำก็ได้ผลที่คงที่ด้วย (วงศมน, 2550) เครื่องหมาย SSR มีความสำคัญมากในการศึกษาคุณลักษณะทางพันธุกรรมที่

พืงประสงค์ เช่น คุณลักษณะที่โดดเด่นของกลุ่มยีนขนาดใหญ่ที่มีความแปรปรวนตามธรรมชาติและการถ่ายทอดลักษณะที่โดดเด่น (Kumar *et al.,* 2013)

4. เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม

4.1 เทคนิค electrophoresis เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการที่โมเลกุลดีเอ็นเอมีประจุลบ และสามารถเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้า ซึ่งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่เข้าหาประจุบวกในสนามไฟฟ้า อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ (อรรัตน์, 2548) กรดนิวคลีอิกแขวนลอยอยู่ในเจลที่ทำจาก polyacrylamide หรือ agarose ซึ่งเป็นเส้นใยเชิงซ้อนที่สานกันเป็นตาข่ายและสามารถควบคุมขนาดรูของเจลโดยวิธีการเตรียมเจล โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกจะเคลื่อนที่ผ่านรูของเจลด้วยอัตราที่ขึ้นอยู่กับน้ำหนักและรูปร่างของโมเลกุล โมเลกุลที่เล็กๆ หรือโมเลกุลที่อัดกันแน่นเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่หรือโมเลกุลหลวมๆ (อุไรวรรณ, 2545) เจลที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ได้แก่ (1) agarose gel ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6 anhydrogalactose ที่แยกได้จากวุ้น (agar) เหมาะสำหรับใช้แยกโมเลกุลของดีเอ็นเอเนื่องจากมีวงที่ใช้ได้มาก (2) polyacrylamide gel เป็นโครงสร้างที่เกิดจากการประสานแบบ cross linked ของสาย acrylamide โมเลกุลเดี่ยวของ acrylamide เชื่อมต่อเป็น linear polymer มีลักษณะเป็นร่างแห สามารถปรับขนาดของช่องโพลีเมอร์ได้ จึงเหมาะสำหรับเป็นตัวกลางในการแยกโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ (3) เจลที่เป็นส่วนผสมระหว่าง agarose gel และ polyacrylamide gel

4.2 เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะซึ่งต้องอาศัยองค์ประกอบของปฏิกิริยา คือ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายด้าน 3’ ของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อระหว่างนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate, dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่และบัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบเพื่อช่วยการทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น

องค์ประกอบของ PCR

1) DNA template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ

2) Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

3) Primers เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

4) น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

5) TBE buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่างๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{+}) อยู่ด้วย

6) $MgCl_2$ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้แต่ส่วนใหญ่แยกต่างหากเพื่อให้ปรับใช้ได้ใน ปริมาณที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของ *Taq* DNA Polymerase

7) *Taq* DNA Polymerase เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพด้วยความร้อน เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ จึงเลือกใช้เอนไซม์ทนความร้อน (Thermostable DNA polymerase) เอนไซม์ชนิดแรกแยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* VT1 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมที่สูงสุดได้ที่ pH 7.3-8.3 ชนิดที่ 2 แยกได้จากแบคทีเรียเดียวกันเป็นชนิดที่มีการใช้กันมาก รู้จักกันในชื่อ *Taq* polymerase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียสสำหรับเอนไซม์ *Taq* polymerase มักอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร และใช้ในปฏิกิริยา 2.5-5 ยูนิตต่อปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร ต่อมาสามารถแยกเอนไซม์ได้อีกหลายชนิดจากแบคทีเรียต่างๆ โดยทุกชนิดที่แยกได้ประกอบด้วยโพลิเปปไทด์เดียว (Monomer) ขนาดอยู่ระหว่าง 61 ถึง 100 กิโลดาลตัน ความแตกต่างของเอนไซม์แต่ละชนิดคือ การมีคุณสมบัติรตัดดีเอ็นเอจากปลาย 3’ (exonuclease activity) เพราะเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอจากปลาย 3’ (3’ ไป 5’ exonuclease) จะสามารถกำจัดนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ผิดพลาดหรือตรวจสอบความถูกต้องได้ (proofreading)

หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR เป็นการเลียนแบบ semi-conservative replication ในเซลล์หากแต่ใช้อุณหภูมิควบคุมปฏิกิริยาให้เป็นไปตามขั้นตอน

1) Denaturing เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิในช่วง 92-95 องศาเซลเซียส

2) Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 17-24 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน

3) Extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของ

เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (*Taq* DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (One cycle) ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (หรือเข้ากัน) กับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 2-3 หมุนเวียนไปอีกหลาย รอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมาก ประมาณว่าปฏิกิริยา 30-40 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอได้ไม่น้อยกว่าพันล้านเท่า ดังนั้น แม้ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีปริมาณสารพันธุกรรมน้อยมาก ก็สามารถใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนได้หลายเท่าทวีคูณ

4.3 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) ในงานศึกษาทางด้านโมเลกุลเครื่องหมายจีโนมิคดีเอ็นเอของพืชเป็นวัสดุพื้นฐานอันดับแรกที่มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ศึกษาต้องสกัดออกมาจากเซลล์พืชให้ได้

ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง ลำดับต่อมาขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานว่าต้องการปริมาณดีเอ็นเอมากหรือน้อย และความบริสุทธิ์มากเพียงใด เช่น ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการในปฏิกิริยา PCR มีปริมาณน้อย 20-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา ในขณะที่ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องใช้ในงาน hybridization based marker (RFLP) มีมากถึง 5-10 ไมโครกรัม และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสำหรับ PCR ก็ต้องการน้อยกว่า (อรรัตน์, 2548)

4.3.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ มีอยู่มากมายหลายวิธีแตกต่างกันไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดหรือแม้แต่ในพืชเอง พืชแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางชีวเคมีแตกต่างกันไปโดยหลักการทั่วไปวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ประกอบด้วยขั้นตอนการย่อยสลายเนื้อเยื่อพืช และการทำให้เซลล์แตก เพื่อปลดปล่อยสารภายเซลล์ออกมา ซึ่งมีดีเอ็นเอปนอยู่กับสารอื่นๆ ได้แก่ โปรตีน อาร์เอ็นเอ และอื่นๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ โพลีฟีนอล ที่จำเป็นต้องมีการกำจัดออกเพื่อให้ดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์มากที่สุด สารต่างๆ เหล่านั้นเป็นอุปสรรคสำคัญในการทำปฏิกิริยาต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ส่วนของตัวอย่างพืชที่นิยมนำมาสกัดดีเอ็นเอ คือ ใบอ่อน เนื่องจากใบอ่อนมีเซลล์จำนวนมาก เมื่อเทียบกับใบแก่ ในปริมาณที่เท่ากัน ดังนั้น ใบอ่อนจึงให้ดีเอ็นเอปริมาณมากกว่า และโดยทั่วไป ใบอ่อนของพืชมักไม่ค่อยมีสารประกอบฟีโนลิค ซึ่งถ้ามีสารนี้จะทำให้การสกัดดีเอ็นเอต้องเพิ่มขั้นตอนในการกำจัดสารนี้ออก (อรรัตน์, 2548)

1) การย่อยสลายเซลล์ ขั้นตอนนี้ทำเพื่อให้เซลล์ปลดปล่อยองค์ประกอบภายในเซลล์ซึ่งมีดีเอ็นเออยู่ออกมา เซลล์พืชมีผนังเซลล์จำเป็นต้องทำลายผนังเซลล์ก่อนด้วยการบด ตัวอย่างใบที่ใช้สกัดดีเอ็นเอควรเป็นตัวอย่างสด เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอคุณภาพดี หรือถ้าไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดก็ควรแช่แข็งตัวอย่างใบระหว่างการรอสกัดดีเอ็นเอเพื่อยับยั้งกระบวนการย่อยสลายดีเอ็นเอออกจากเอนไซม์ในเซลล์ การแช่แข็งใบอาจใช้ไนโตรเจนเหลว ใบที่แช่ไนโตรเจนเหลวจะทำให้

บดได้ง่ายขึ้น การบดเนื้อเยื่อใบให้ละเอียดในสารประเภท detergent เพื่อย่อยสลายไขมันในเมมเบรน เช่น SDS (sodium dodecyl sulphate) หรือ CTAB (cetyltrimethtlammonium bromide) ที่มี EDTA เป็นส่วนประกอบซึ่ง EDTA ช่วยยับยั้งการทำงานของ DNase (อรรัตน์, 2548) ภายหลังจากขั้นตอนนี้ ผนังและเมมเบรนของเซลล์ถูกทำลาย ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ไม่ว่าจะเป็น ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต รวมอยู่ในสารละลาย ซึ่งจะนำไปสู่ขั้นตอนต่อไปเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ขึ้น

2) การกำจัดโปรตีนและอาร์เอ็นเอ การกำจัดโปรตีนเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง เนื่องจากภายในเซลล์มีเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถย่อยดีเอ็นเอ รวมทั้งมีโปรตีนชนิดต่างๆ ที่อาจขัดขวางปฏิกิริยาทางเคมีที่ใช้ในการศึกษากับดีเอ็นเอต่อไป สารละลายที่ใช้กำจัดโปรตีน คือ สารผสม chloroform-isoamylalcohol chloroform-isoamylalcohol จะแยกชั้นอยู่ข้างล่างสุด เมื่อสารผสมที่ได้จากเซลล์ ในข้อ (1) ถูกนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) กับสารละลาย chloroform-isoamylalcohol โปรตีนจะเสื่อมสภาพและตกตะกอนอยู่ในบริเวณชั้นตรงกลางของสารผสม ส่วนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอละลายอยู่ในสารละลายส่วนบนสุด การกำจัดอาร์เอ็นเอสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ RNase (อรรัตน์, 2548)

3) การตกตะกอนดีเอ็นเอ ภายหลังขั้นตอน chloroform extraction สารละลายจากส่วนบนที่มีดีเอ็นเออยู่ค่อนข้างสะอาด ไม่มีโปรตีน การแยกดีเอ็นเอออกมาจากสารละลายใช้วิธีตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ (alcohol) ซึ่งใช้ได้ทั้ง isopropanol และ ethanol ในขั้นตอนนี้อาจเติม Na^+ หรือ K^+ หรือ NH_4^+ เพื่อช่วยตกตะกอนเกลือต่างๆ เกลือเหล่านี้สามารถกำจัดออกไปด้วยการล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% ethanol (อรรัตน์, 2548)

4.3.2 การวัดปริมาณและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ วิธีที่นิยมใช้ใน ได้แก่ spectrophotometry (อรรัตน์, 2548) เป็นการวัดปริมาณ nucleic acid (ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งคำนวณจากปริมาณการดูดกลืนคลื่นแสงของ nucleic acid (absorbance) ที่ 260 นาโนเมตร (A_{260}) ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ควรมีความสะอาดมาก ปราศจากการปนเปื้อนจากโปรตีน ฟีนอล และอื่นๆ ในระดับสูง สารปนเปื้อนเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการดูดกลืนความเข้มแสงของดีเอ็นเอ เมื่อย้อมสีดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide การวัดค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างดีเอ็น ทำที่ 2 คลื่นแสง คือ 260 และ 280 นาโนเมตร A_{260} แสดงปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่ ทุก 1 หน่วยที่อ่านได้ เท่ากับปริมาณดีเอ็น50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ A_{280} แสดงปริมาณโปรตีนที่ปนเปื้อนในตัวอย่างดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่สะอาดควรมีค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.8 ถึง 2.0 (อรรัตน์, 2548)

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmatic Mean)

การประเมินผลของโครงสร้างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด เป็นวิธีที่ทำให้เราสามารถรู้ความสัมพันธ์และความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์นั้นๆ ได้ ทำได้โดยการนำข้อมูลพื้นฐานของเครื่องหมาย SSR มาใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งการใช้งานเครื่องหมาย SSR มีความเหมาะสมในการใช้ระบุความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วง (Kumar *et al.,* 2013) โดยหลังจากการทำ PCR ทำบันทึกผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic band ซึ่งได้จากการแยกขนาดด้วย polyacrylamide gel ในรูปแบบไบนารี (binary data) โดยให้ 1 แทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้ 0 แทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้ 999 หรือ -999 แทนข้อมูลที่ผิดพลาด (missing data) นำค่าที่ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ในรูปแบบ phylogenetic tree โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc รุ่น 2.20 ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard (Jaccard's coefficient) ในการวิเคราะห์ข้อมูล และแสดงผลในรูปแบบเดนโดรแกรม

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะม่วง มีชื่อเสียงในฐานะ King of Fruits เป็นหนึ่งในไม้ผลที่ยอดเยี่ยมในด้านการนำมาบริโภคเป็นผลไม้ของพื้นที่เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนทั่วโลก ลักษณะและการประเมินผลของมะม่วงเป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมและการใช้ประโยชน์ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ลักษณะของแหล่งเชื้อพันธุกรรมที่มีอยู่มีความสำคัญอย่างมากในการระบุลักษณะหรือยีนที่ต้องการ เพื่อจุดประสงค์ในการใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางสัณฐานวิทยาและโมเลกุล ซึ่งเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยานั้นโดยทั่วไปจะสามารถบันทึกได้และมีความโดดเด่นเมื่อมองด้วยตาและแสดงออกได้ง่ายในทุกสภาพแวดล้อม และในทางตรงกันข้ามเครื่องหมายโมเลกุลจะถูกใช้ในระดับโมเลกุลและเหมาะสมกับลักษณะเฉพาะที่แม่นยำซึ่งจะสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีลักษณะพิเศษและลักษณะของผลผลิตที่ต้องการได้ นอกจากนี้การเก็บรักษาพันธุกรรมเพื่อใช้ประโยชน์ในอนาคตในการปรับปรุงพันธุ์พืชต้องการข้อมูลที่ถูกต้อง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องรวบรวมข้อมูลที่มีค่าที่มีอยู่ในด้านต่างๆ ของลักษณะมะม่วง ในงานวิจัยจึงมีความพยายามที่จะทบทวนวรรณกรรมที่มีอยู่ทั้งหมดเพื่อให้ทราบรายละเอียดสำคัญในการระบุพันธุ์มะม่วง ลักษณะสัณฐานวิทยา ลักษณะหรือยีนที่ต้องการ และการประเมินค่าของเชื้อพันธุกรรมที่มีอยู่กับเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งลักษณะที่ต้องการสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อให้ประสบความสำเร็จในโครงการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตเพื่อเพิ่มการผลิตมะม่วงที่มีคุณภาพทั่วโลก (Khan *et al.,* 2015)

Kumar *et al.,* (2013) ได้ศึกษาและจำแนกลักษณะทางโมเลกุลของมะม่วง จำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ Kalepad Neelum Swarnarekha Alphonso Himayuddin Banganapalli Rumani Sendura Mulgoa และ Bangalora โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 20 ไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของมะม่วง 10 พันธุ์ จากการศึกษาพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับปานกลางค่าความคล้ายคลึงกันของ Jaccard มีค่าตั้งแต่ 0.075 ระหว่างกลุ่ม I และ II ถึง 0.285 ระหว่างกลุ่ม II และ III แผนภาพเดนโดรแกรมสร้างขึ้นจากการวิเคราะห์กลุ่มค่าเฉลี่ย (UPGMA) ของมะม่วง 10 พันธุ์ สามารถจัดกลุ่มมะม่วงไว้ในกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่มที่มีความคล้ายคลึงกันอย่างมีประสิทธิภาพเท่ากับ 0.65 ขนาดกลุ่มแตกต่างกันตั้งแต่ 1-6 และกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด ประกอบด้วยมะม่วง 6 พันธุ์ ตามด้วยกลุ่มที่ 1 มีมะม่วง 3 พันธุ์ และกลุ่มที่สองมีมะม่วง 1 พันธุ์ กลุ่มที่หนึ่งมีพันธุ์ที่หลากหลายที่สุด คือ Kalepad, Neelum และ Swarnarekha กลุ่มที่สองคือ พันธุ์ Alphonso และกลุ่มที่สาม ประกอบด้วยสายพันธุ์ Rumani, Sendura, Bangnapalli, Himayuddin, Mulgoa และ Bangalora ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่ซ้ำกันถูกระบุไว้ในแต่ละสายพันธุ์ ขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่ซ้ำกันมีตั้งแต่ LMMA-8 (257-270 bp), LMMA-11 (232-245 bp) ไปจนถึง MiSHRS 39 (340-369 bp) แนวโน้มของการกระจุกตัวของพันธุ์มะม่วงพบว่ามีความสัมพันธ์กับโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

งานวิจัยที่ใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 16 ไพรเมอร์ เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วงที่มีอยู่ในประเทศอิหร่าน จำนวน 41 ชนิด จากการศึกษานี้ พบว่าเครื่องหมาย SSR ทำให้เกิดความแตกต่างทั้งหมด จำนวน 56 อัลลีล จากตำแหน่ง polymorphic 15 ตำแหน่ง ตั้งแต่ 2-6 อัลลีลต่อโลคัส โดยเฉลี่ย 3.7 อัลลีลต่อโลคัส ส่วน heterozygosities ที่คาดหวังสังเกตได้จากตำแหน่ง polymorphic 15 ตำแหน่ง ค่าเฉลี่ย 0.57 และ 0.63 ตามลำดับ การวิเคราะห์กลุ่ม UPGMA และ Bayesian ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์มะม่วงอิหร่านที่เกิดจากอินเดียและปากีสถานอย่างชัดเจน (Shamili *et al.,* 2012)

Tsai *et al.,* (2013) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะม่วง (*Mangifera indica* L.) จำนวน 21 สายพันธุ์ ถูกตรวจสอบโดยเครื่องหมาย SSR จำนวน 37 ไพรเมอร์ จำนวนอัลลีลต่อโลคัส มีค่าตั้งแต่ 2-11 และมีอัลลีล ทั้งหมด 182 อัลลีล โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 4.86 อัลลีลต่อโลคัส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ SSR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้สัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity coefficients) ที่คำนวณได้จาก 182 แถบดีเอ็นเอ ตามที่คาดไว้ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ต่อสายพันธุ์กับพันธุ์แม่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดโดยอาศัยเดนโดรแกรมในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ อย่างไรก็ตาม การทดสอบโดยเครื่องหมาย SSR

ไม่สามารถแยกเมล็ด monoembryonic ออกจากเมล็ด polyembryonic ของพันธุ์ต่อสายพันธุ์มะม่วงได้ตามโครงสร้างเดนโดรแกรมและโครงสร้างทางพันธุกรรมในการศึกษานี้

"Beneshan" เป็นพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจากมะม่วงหลายพันธุ์ที่เพาะปลูกมานานกว่าศตวรรษในรัฐ Andhra Pradesh ประเทศอินเดีย จากการสำรวจเชิงนิเวศภูมิศาสตร์ที่ครอบคลุมพื้นที่ 3 แห่งของรัฐพบว่า มะม่วงพันธุ์ "Beneshan" (BN Acc-1 ถึง BN Acc-31) ถูกคัดเลือกจาก 31 แห่งที่ทำการสำรวจและทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างใบและผลมะม่วง เพื่อศึกษาความหลากหลายและความแตกต่างระหว่างพันธุ์ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล และใช้เครื่องหมาย SSR ในการตรวจสอบตามลำดับ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 109 ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง พบว่ามี polymorphic 23 ไพรเมอร์ เครื่องหมาย microsatellites ที่ก่อให้เกิด polymorphic มีจำนวนทั้งหมด 58 อัลลีล ซึ่งมี polymorphic 30 อัลลีล (51.72%) ข้อมูล polymorphic ที่พึงพอใจมีความค่าความแปรปรวนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.03 (SSR-59) ถึง 0.72 (SSR-87) เครื่องหมาย microsatellites ที่มี polymorphic สูง เช่น SSR-80, SSR-87, SSR-28 และ SSR-89 มีประโยชน์อย่างมากในการแยกความแตกต่างของมะม่วงพันธุ์ "Beneshan" ที่ทำการสำรวจ SSR-91 และ MngSSR-26 ทำให้เกิดอัลลีลที่ไม่ซ้ำกัน ตั้งแต่ 280 และ 140 bp ใน BNAcc-8 และ BNAcc-9 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์คล้ายคลึงกันของ Jaccard มีค่าตั้งแต่ 0.50-1.00 มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ช่วงกว้างๆ (ไม่เกิน 50%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามะม่วงพันธุ์ "Beneshan" ที่ปลูกในพื้นที่ใดๆ ทั่วทั้งรัฐไม่ได้เป็นโคลนที่บริสุทธิ์ ซึ่งจะช่วยให้การปรับปรุงพันทางพันธุกรรมของมะม่วงพันธุ์นี้ ทำได้โดยการคัดเลือกแบบรวม (mass selection) (Begum *et al.,* 2014)

"Cherukurasam" เป็นหนึ่งในพันธุ์มะม่วงที่ผลมีความฉ่ำที่สุดที่มีการผลิตและมีคุณภาพแตกต่างกัน ในรัฐ Andhra Pradesh ประเทศอินเดีย การสำรวจครอบคลุมพื้นที่ทางธรณีวิทยา 3 แห่งของรัฐ ได้ดำเนินการในช่วงฤดูร้อนปี 2009 มะม่วงพันธุ์ "Cherukurasam" ถูกคัดเลือกจาก 30 แห่งที่ทำการสำรวจ (CKR Acc-1 ถึง CKR Acc-30) และทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างผลและใบมะม่วง เพื่อศึกษาความแปรปรวนระหว่างพันธุ์ โดยการวิเคราะห์ขั้นพื้นฐานและการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลตามลำดับ ผลการศึกษาพบความแปรปรวนทางลักษณะสัณฐานวิทยาของลักษณะผลในกลุ่มมะม่วง 30 แห่งที่ทำการสำรวจ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 109 ไพรเมอร์กับกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด พบว่ามี 25 ไพรเมอร์ที่มี polymorphic สูง ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Jaccard มีค่าตั้งแต่ 0.75 ถึง 1.00 แสดงให้เห็นว่ามะม่วงพันธุ์ "Cherukurasam" ที่ปลูกในพื้นที่ใดๆ ในรัฐ Andhra Pradesh ไม่ได้เป็นโคลนบริสุทธิ์ (Begum *et al.,* 2014)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วง 254 พันธุ์ที่ทำการคัดเลือกจาก *Mangifera indica* L. และสายพันธุ์ *Mangifera* ที่มีต้นกำเนิดจาก 12 พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันโดยใช้เครื่องหมาย SSR ที่รู้จักกันดี พบว่ามีอัลลีลทั้งหมด 133 อัลลีล จากไพรเมอร์ LMMA12 ถึง LMMA16 (MIAC-5) โดยมีค่าเฉลี่ย 12.36 ในแต่ละ locus และค่าความหลากหลายของข้อมูล (PIC) เท่ากับ 0.72 จำนวนเฉลี่ยของอัลลีล สูงที่สุดในกลุ่มประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (อินโดนีเซีย / มาเลเซีย) เท่ากับ 8.45 และต่ำสุดในกลุ่มประเทศฟิลิปปินส์ เท่ากับ 2.55 การวิเคราะห์ความหลากหลายแบ่งได้หลักๆ 4 แห่งที่แสดงถึงแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์โดยกว้าง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ 'Kensington Pride' ได้รับการยืนยันว่าอยู่ในระดับต่ำมากและไม่มีแหล่งที่มาของสายพันธุ์พ่อแม่สำหรับพันธุ์นี้ และไม่สามารถสร้างความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR ที่วิเคราะห์และเอ็มบริโอได้ มีการระบุสายพันธุ์ที่เหมือนกัน 10 ชนิดด้วยการจับคู่ลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกับเครื่องหมาย SSR ระบุยีนที่ไม่ซ้ำกัน 21 ชนิดสำหรับ 50 ต้นที่กำหนดไว้ก่อนหน้านี้ ส่วนที่เหลือเป็นพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ความเข้าใจที่เพิ่มขึ้นนี้เกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมใน Mango Gene bank แห่งชาติออสเตรเลียจะช่วยในการคัดเลือกพ่อแม่ที่มีศักยภาพในการให้ยีนที่ต้องการแก่รุ่นลูกได้ดียิ่งขึ้นและส่งผลให้พันธุ์พืชที่ได้รับการปรับปรุงให้ดีขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค (Dillon *et al.,* 2013)

มะม่วงฉ่ำ (ชนิดดูด / *rasaalu*) เป็นหนึ่งในธุรกิจมะม่วงที่สำคัญที่สุดในรัฐ Andhra Pradesh ประเทศอินเดีย นักพฤกษศาสตร์ได้ปลูกมะม่วงพันธุ์ฉ่ำที่ไม่เคยมีการพิสูจน์ความสม่ำเสมอทางพันธุกรรมมาก่อน Panchadarakalasa เป็นหนึ่งในพันธุ์ที่อร่อยที่สุดของมะม่วงในรัฐ Andhra Pradesh ซึ่งมีความหลากหลายของสัณฐานวิทยาของผลในพันธุ์เดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการเก็บตัวอย่างผลและใบมะม่วงจาก 16 ชนิดของพันธุ์ Panchadarakalasa (PK Acc-l ถึง PK Acc-16) ในพื้นที่สามเขตนิเวศน์ทางภูมิศาสตร์ (Coastal Andhra, Rayalaseema และ Telangana) ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ microsatellite และทางสัณฐานวิทยาเพื่อระบุว่ามีความแปรปรวนในพืชที่ปลูกในรัฐหรือไม่ ลักษณะและการประเมินผลของตัวอย่างตามลักษณะเชิงปริมาณและคุณภาพ 7 ลักษณะ พบว่ารูปแบบของฟีโนไทป์แตกต่างกัน พบเครื่องหมาย microsatellite ที่เฉพาะเจาะจงจำนวน 20 คู่ จาก 109 เครื่องหมายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และมีเพียง 4 ไพรเมอร์ที่มี polymorphic ทั้งหมด 11 อัลลีล มีขนาดตั้งแต่ 130 bp จนถึง 245 bp polymorphic มีค่าตั้งแต่ 0.25-0.56 ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์ของความคล้ายคลึงกันของ Jaccard อยู่ในช่วง 0.9-1.0 แสดงในรูปแบบ Dendrogram ที่ใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ซึ่งไม่สามารถจัดกลุ่มตามการแบ่งทางภูมิศาสตร์ แต่เป็นการวิเคราะห์ด้วย microsatellite พบว่ามีความแปรปรวนน้อยกว่า 10% ในพื้นที่เดียวกันและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างมะม่วง Panchadarakalasa ที่ปลูกไว้ทั่วทั้งรัฐ

ไม่ได้เป็นโคลนบริสุทธิ์ การเพาะเลี้ยงแบบเพาะชำแบบดั้งเดิมมีอิทธิพลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจาก Panchadarakalasa ไม่แพร่กระจายโดยเฉพาะในพืช microsatellites ที่มี polymorphic สูง เช่น SSR-83, MngSSR-24 และ MngSSR-26 ซึ่งมีประโยชน์มากยิ่งขึ้นในการจำแนก Panchadarakalasa ผลลัพธ์ที่ได้จากเครื่องหมาย microsatellite จะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์เช่นเดียวกับการใช้สิทธิในการเพาะพันธุ์ในประเทศ (Begum *et al.,* 2013)

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

1. สถานที่ทำการทดลอง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วง โดยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR ทำการศึกษา ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยแม่โจ้ (ฟาร์มสาขาไม้ผล บ้านโปง) อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

2. พันธุ์

พันธุ์มะม่วงที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 20 พันธุ์ ได้แก่

1. จินหวง1
2. จินหวง2
3. เขียวใหญ่
4. สามฤดูมัน
5. มหาโชค
6. R2E2
7. น้ำดอกไม้สีทอง1
8. น้ำดอกไม้สีทอง2
9. น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1
10. น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2
11. มหาชนก1
12. มหาชนก2
13. มันเดือนเก้า
14. โชคอนันต์
15. ตึก
16. สามปี
17. ตลับนาค
18. แก้วลืมลัง
19. แก้ว
20. คาราบาว

3. วิธีการทดลอง

การวิจัยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ

โดยการเก็บข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของใบและผลมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 20 สิ่งทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ

1. วิธีดำเนินการ

ทำการเก็บข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของใบและผล

ลักษณะใบ ใบมะม่วงที่ใช้ในการเก็บข้อมูล เป็นใบฉัตรที่ 4 ซึ่งนับจากยอดลงมา เนื่องจากเป็นใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ ทำการเก็บข้อมูล ดังนี้ ลักษณะทรงใบ ลักษณะปลายใบ ลักษณะฐานใบ และลักษณะขอบใบ ส่วนความยาวใบ ความกว้างใบเก็บข้อมูลโดยใช้ไม้บรรทัดขนาดความยาว 45 เซนติเมตร ความละเอียด 1 มิลลิเมตร

ลักษณะผล ผลมะม่วงที่ใช้ในการเก็บข้อมูลเป็นผลมะม่วงที่อยู่ในระยะสุกแก่ (จริงแท้, 2537) ทำการเก็บข้อมูล ดังนี้ น้ำหนักผล ทำการวัดโดยใช้เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ความกว้างผล ความหนาผล และความยาวผลทำการวัดโดยใช้ Vernier Caliper ความแน่นเนื้อผล ทำการวัดโดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อผลไม้ที่มีเนื้อในแข็ง (Fruit Firmness Tester) รุ่น FT- 044 ความหวาน ทำการวัดโดยใช้เครื่องวัดความหวาน (Digital Brix Refractometer) รุ่น MA871 การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ในน้ำผลไม้หรือน้ำผลไม้เข้มข้น ทำการวัดค่าด้วย hand refractometer อ่านปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในหน่วย องศาบริกซ์ และวัดปริมาณกรดที่ไตเตรทได้

จากข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของใบและผลที่ได้นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) รุ่น 16.0

การทดลองที่ 2 การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วงโดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR

โดยศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วง จำนวน 20 สายพันธุ์

1. วิธีดำเนินการ

ทำการเก็บตัวอย่างใบมะม่วงจำนวน 20 พันธุ์ ใบมะม่วงที่นำมาสกัดดีเอ็นเอต้องเป็นใบกึ่งแก่กึ่งอ่อน (ระยะใบเพสลาด) เพราะจะง่ายต่อขั้นตอนการบดตัวอย่างใบ

2. สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB

การสกัดดีเอ็นเอจะเริ่มจากการนำตัวอย่างใบมะม่วงมาบดโดยการเติมสารละลาย CTAB buffer ผสมร่วมกับ สารละลาย 2-mercaptothanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่งและเทใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นนำมาเติมสารละลาย Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ย้ายใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ที่มี Isopropyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอเกิดการตกตะกอนอย่างน้อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืน นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เมื่อเสร็จทำการเทส่วนใสทิ้งและเติม 75% Ethanol ปริมาตร 1000 ไมโครลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อเสร็จทำการเทส่วนใสทิ้ง และนำไปตากที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที หรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะแห้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer เพื่อเก็บรักษาดีเอ็นเอ

3. การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Quantification)

การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยการใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ วัดสารละลาย ดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยทั่วไปความเข้มข้นของ Double Strand DNA 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A260) = 1 หรืออาจจะนำสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นมาทำ Standard curve เพื่อใช้ในการหาปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการ

4. การเจือจางสารละลาย (Dilutions)

การเจือจางสารละลายเป็นการลดความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นน้อยลง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการใช้ในการทำ PCR ด้วยเครื่อง PCR machine หรือ Thermal cycler จะใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดังนั้นจึงต้องมีการเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยานั้นๆ

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

ขั้นตอนของปฏิกิริยา

1) Pre-denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

2) Denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

3) Annealing 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

4) Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

จากขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 45 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6. ตรวจสอบ PCR Product โดยวิธี Gel electrophoresis

7. วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS รุ่น 2.2 โดยวิธี UPGMA

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ

ผลการศึกษา

การจัดจำแนกกลุ่มมะม่วง 20 พันธุ์ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและผล (ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2) สามารถจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มแก้ว ได้แก่ แก้ว มันเดือนเก้า มีลักษณะทรงใบ ป้อมโคนใบ (lanceolate) ลักษณะปลายใบ สอบเรียว (attenuate) ลักษณะฐานใบ แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ คลื่น (undulate) ลักษณะทรงผล รูปไข่กลับ (obovate) 2) กลุ่มน้ำดอกไม้ ได้แก่ น้ำดอกไม้สีทอง1 น้ำดอกไม้สีทอง2 น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 และน้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 มีลักษณะทรงใบ ป้อมกลางใบ (elliptical) ลักษณะปลายใบ เรียวแหลม (acuminate) ลักษณะฐานใบ แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ คลื่น (undulate) ลักษณะทรงผล ทรงรี (elliptical) 3) กลุ่มหนังกลางวัน ได้แก่ แก้วลืมลัง มหาชนก1 และมหาชนก2 มีลักษณะทรงใบ ขอบขนาน (oblong) ลักษณะปลายใบ สอบเรียว (attenuate) ลักษณะฐานใบ แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ คลื่น (undulate) ลักษณะทรงผล ทรงกระบอก (cylindrical) 4) กลุ่มอกร่อง ได้แก่ จินหวง1 จินหวง2 เขียวใหญ่ สามฤดูมัน มหาโชค โชคอนันต์ ตึก สามปี และคาราบาว มีลักษณะทรงใบ ป้อมกลางใบ (elliptical) ลักษณะปลายใบ เรียวแหลม (acuminate) ลักษณะฐานใบ แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ เรียบ (entire) ลักษณะทรงผล ทรงรี (elliptical) 5) กลุ่มผลกลม ได้แก่ ตลับนาค และ R2E2 มีลักษณะทรงใบ ป้อมกลางใบ (elliptical) ลักษณะปลายใบ เรียวแหลม (acuminate) ลักษณะฐานใบ แหลม (acute) ลักษณะขอบใบ เรียบ (entire) ลักษณะทรงผล ทรงกลม (roundish)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและผลมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์

กลุ่มพันธุ์	**ใบ**				**ทรงผล**
พันธุ์	**ทรงใบ**	**ปลายใบ**	**ฐานใบ**	**ขอบใบ**	
1. กลุ่มแก้ว					
1) แก้ว	ป้อมโคนใบ	สอบเรียว	แหลม	คลื่น	รูปไข่กลับ
2) มันเดือนเก้า	ป้อมโคนใบ	สอบเรียว	แหลม	คลื่น	รูปไข่กลับ
2. น้ำดอกไม้สีทอง					
1) น้ำดอกไม้สีทอง1	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	คลื่น	ทรงรี
2) น้ำดอกไม้สีทอง2	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	คลื่น	ทรงรี
3) น้ำดอกไม้ เบอร์.4-1	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	คลื่น	ทรงรี
4) น้ำดอกไม้ เบอร์.4-2	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	คลื่น	ทรงรี
3. กลุ่มหนังกลางวัน					
1) แก้วลืมลัง	ขอบขนาน	แหลม	แหลม	เรียบ	รูปไข่กลับ
2) มหาชนก1	ยาวเรียว	สอบเรียว	มน	คลื่น	ทรงกระบอก
3) มหาชนก2	ยาวเรียว	สอบเรียว	มน	คลื่น	ทรงกระบอก
4. กลุ่มอกร่อง					
1) จินหวง1	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	เรียบ	ทรงรี

ตารางที่ 1 (ต่อ) การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและผลมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์

กลุ่มพันธุ์	**ใบ**				**ทรงผล**
พันธุ์	**ทรงใบ**	**ปลายใบ**	**ฐานใบ**	**ขอบใบ**	
2) จินหวง2	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	เรียบ	ทรงรี
3) เขียวใหญ่	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	เรียบ	ทรงรี
4) สามฤดูมัน	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	เรียบ	ทรงรี
5) มหาโชค	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	เรียบ	ทรงรี
6) โชคอนันต์	ป้อมกลางใบ	สอบเรียว	แหลม	คลื่น	รูปไข่กลับ
7) ตึก	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	obtuse	เรียบ	รูปไข่กลับ
8) สามปี	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	คลื่น	ทรงรี
9) คาราบาว	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	แหลม	เรียบ	ทรงรี
5. กลุ่มผลกลม					
1) ตลับนาค	ขอบขนาน	แหลม	แหลม	เรียบ	ทรงกลม
2) R2E2	ป้อมกลางใบ	เรียวแหลม	มน	เรียบ	ทรงกลม

คุณภาพของผล พบว่า พันธุ์มะม่วงที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มน้ำดอกไม้และกลุ่มอกร่อง มีคุณภาพของผลที่ดี (ตารางที่ 2) คือ กลุ่มอกร่อง พันธุ์จินหวง2 ให้น้ำหนักผลที่มากคือ 736.64 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับพันธุ์สามปี มีน้ำหนักผลเท่ากับ 176.30 กรัม และพันธุ์โชคอนันต์ มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดที่สูงคือ 18.60 องศาบริกซ์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับพันธุ์ตลับนาค มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดเท่ากับ 9.87 องศาบริกซ์ ส่วนกลุ่มน้ำดอกไม้ พบว่า พันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง2 มีปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมดที่น้อยคือ 0.24 มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับพันธุ์คาราบาว มีปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมดเท่ากับ 3.62 มิลลิลิตร และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดต่อปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมดที่มากคือ 74.64 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับพันธุ์คาราวบาว มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดต่อปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมดที่มากคือ 4.96

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและผลมะม่วง แสดงให้เห็นถึงลักษณะใบที่มีความแตกต่างกันในลักษณะของรูปทรงใบ ฐานใบ ปลายใบ ขอบใบ ซึ่งลักษณะของใบที่มีความแตกต่างกันเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วง (Rymbai *et al.,* 2014)

นอกจากลักษณะของใบที่แตกต่างกันยังพบลักษณะคุณภาพของผลมะม่วงที่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำหนัก ความกว้าง ความยาว ความหนา ความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดต่อปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ในระดับพื้นฐาน ซึ่งในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นสิ่งที่สามารถทำได้เป็นอันดับแรก เพราะเป็นลักษณะที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ผล ลำต้น และส่วนต่างๆ ของพืชได้ถูกนำมาใช้ประเมินความแตกต่างกันสำหรับพืชต่างๆ เช่น มะม่วง (Kheshin *et al.,* 2016) กล้วย (Gibert *et al.,* 2009) และส้ม (Domingues *et al.,* 1999) การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาเป็นวิธีการที่ง่ายที่สุดของการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช (Kheshin *et al.,* 2016) แม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะมีความแตกต่างกัน แต่การระบุความแตกต่างระหว่างพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์อาจจะไม่ถูกต้องแม่นยำ เนื่องจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อมและข้อจำกัด ในการจำแนกลักษณะ (Begum *et al.,* 2014) บางลักษณะอาจได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง เช่น ความสูงต้น ผลผลิต หรือสีดอก ซึ่งได้รับผลกระทบโดยตรงจากความอุดมสมบูรณ์ของดินหรือปุ๋ย รวมทั้งลักษณะบางลักษณะมีการแสดงออกที่บางระยะการเจริญเติบโตเท่านั้น มะม่วงที่ได้รับการจัดการดูแลที่ดีจะมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดียิ่งขึ้น (Menzel and Le, 2017)

ตารางที่ 2 ลักษณะเชิงคุณภาพของผลมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์

กลุ่มพันธุ์ / พันธุ์	น้ำหนักผล (กรัม)	ความกว้างผล (ซม.)	ความยาวผล (ซม.)	ความหนาผล (ซม.)	ความแน่นเนื้อผล (กก./ซม^2)	ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS) (องศาบริกซ์)	ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมด (TA) (มล.)	TSS/TA
1. กลุ่มแก้ว								
1) แก้ว	235.15de	72.40bc	117.85bcd	62.11b	0.17b	12.33abc	0.22e	57.97ab
2) มันเดือนเก้า	431.36bcde	81.52abc	134.03abcd	67.47b	0.17b	15.70abc	0.73cde	22.75cde
2. กลุ่มน้ำดอกไม้								
1) น้ำดอกไม้สีทอง1	246.71de	67.71bc	130.83bcd	60.51b	0.00b	15.87abc	0.97cde	18.03de
2) น้ำดอกไม้สีทอง2	387.30bcde	76.32bc	167.34abc	68.11b	0.00b	17.99ab	0.24e	74.64a
3) น้ำดอกไม้ เบอร์.4-1	299.17cde	69.05bc	147.54abcd	62.87b	0.00b	17.62ab	0.50de	44.81bc
4) น้ำดอกไม้ เบอร์.4-2	332.60bcde	72.21bc	153.72abcd	67.06b	0.00b	16.98ab	0.62cde	31.64cd
3. กลุ่มหนังกลางวัน								
1) แก้วลืมลัง	272.54cde	77.43bc	114.43bcd	68.59b	0.26b	12.29abc	0.58de	22.38cde
2) มหาชนก1	376.92bcde	68.86bc	164.39abc	63.22b	0.10b	14.62abc	0.91cde	17.21de
3) มหาชนก2	415.34bcde	75.81bc	171.72abc	63.25b	0.06b	12.92abc	0.84cde	16.72de
4. กลุ่มอกร่อง								
1) จินหวง1	346.55bcde	54.53c	109.02bcd	50.58b	0.18b	9.71c	0.55de	26.48cde

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติตามการเปรียบเทียบ Tukey's honest significance test (Tukey's HSD)

ตารางที่ 2 (ต่อ) ลักษณะเชิงคุณภาพของผลมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์

กลุ่มพันธุ์ / พันธุ์	น้ำหนักผล (กรัม)	ความกว้างผล (ซม.)	ความยาวผล (ซม.)	ความหนาผล (ซม.)	ความแน่นเนื้อผล (กก./ซม2)	ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (TSS) (องศาบริกซ์)	ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมด (TA) (มล.)	TSS/TA
2) จินหวง2	736.64a	95.66ab	201.85a	82.06ab	0.06b	11.39bc	0.58de	22.63cde
3) เขียวใหญ่	496.20abcd	84.72abc	178.21ab	72.41b	0.00b	12.14abc	0.73cde	16.73de
4) สามฤดูมัน	539.91abc	85.51abc	175.86ab	74.24ab	0.22b	13.58abc	0.93cde	14.90de
5) มหาโชค	616.58ab	88.93abc	174.91ab	80.30ab	0.39ab	14.99abc	1.07cde	14.89de
6) โชคอนันต์	299.22cde	75.81bc	126.34bcd	64.50b	1.04a	18.60a	1.50bc	12.73de
7) ตีก	311.59cde	76.01bc	117.09bcd	67.95b	0.29b	17.60ab	1.18cd	16.11de
8) สามปี	176.30e	61.88bc	102.29cd	53.55b	0.46ab	15.04abc	2.20b	6.98de
9) คาราบาว	315.18cde	73.44bc	124.97bcd	63.14b	0.08b	17.92ab	3.62a	4.96e
5. กลุ่มผลกลม								
1) ตลับนาค	206.24de	80.10abc	88.90d	62.86b	0.27b	9.87c	0.77cde	16.50de
2) R2E2	748.35a	114.25a	124.21bcd	104.89a	1.02a	11.77abc	0.88cde	13.80de
การทดสอบทางสถิติ	*	*	*	*	*	*	*	*
CV (%)	6.18	3.93	4.17	3.27	29.11	6.01	21.57	0.28

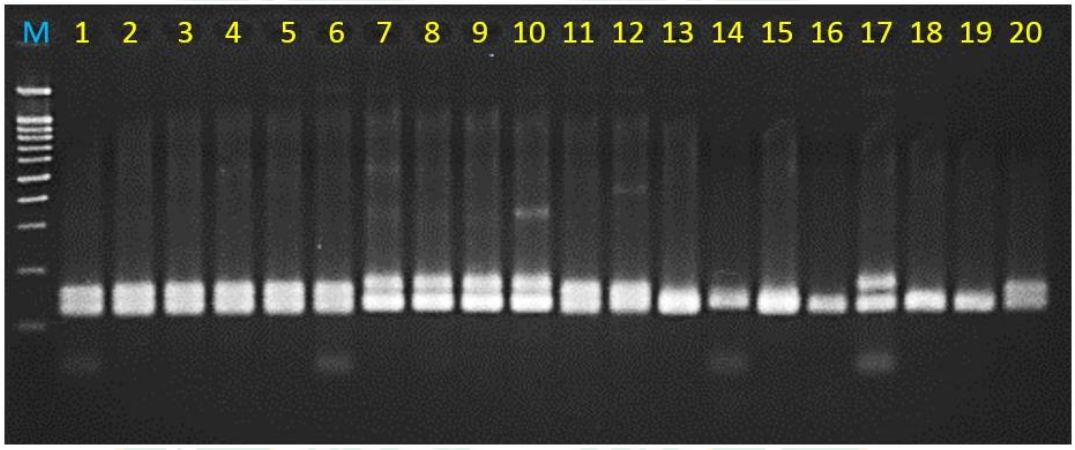
หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ที่ใช้ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติตามการเปรียบเทียบ Tukey's honest significance test (Tukey's HSD)

การทดลองที่ 2 การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วงโดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SSR

ผลการศึกษา

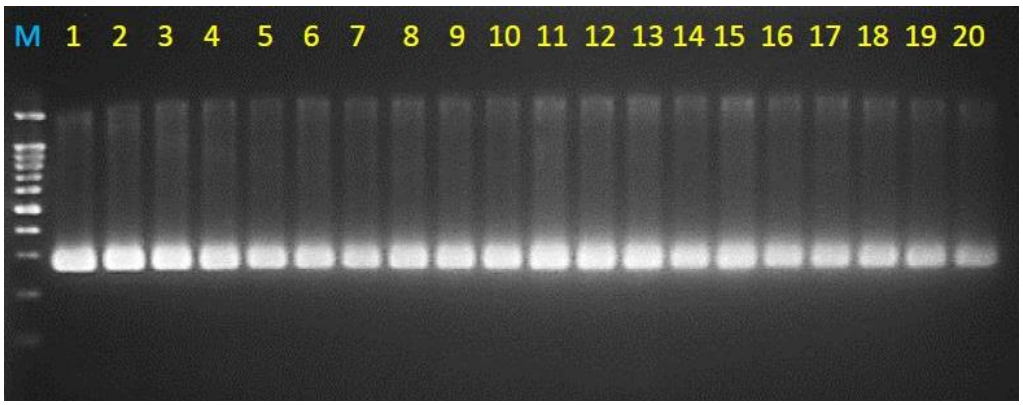
การคัดเลือกไพรเมอร์จากเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ ด้วยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 50 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 33 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันดังตัวอย่าง (ภาพที่ 8) และมีไพรเมอร์จำนวน 17 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้แต่แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันดังตัวอย่าง (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับไพรเมอร์ SSR19

หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้ สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



ภาพที่ 9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR กับไพรเมอร์ LMMA5

หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้ สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว

จากการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วงจำนวน 20 พันธุ์ พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 33 คู่ไพรเมอร์ ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 112 แถบ เป็น polymorphic จำนวน 84 แถบ คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของมะม่วงจำนวน 20 พันธุ์ได้ ซึ่ง (Wichan *et al.,* 1999) ได้มีรายงานว่าเครื่องหมาย SSR จำนวน 7 ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างของมะม่วงได้ถึง 22 พันธุ์ ซึ่งประกอบไปด้วย พันธุ์มะม่วงของไทย 13 พันธุ์ มะม่วง มะม่วงของฟลอริดา 4 พันธุ์ มะม่วงของอินเดีย 3 พันธุ์ มะม่วงของอินโดนีเซีย 1 พันธุ์ และมะม่วงของฟิลิปปินส์ 1 พันธุ์ และยังมีรายงานของ (Tsai *et al.,* 2013) ซึ่งได้มีการระบุสายพันธุ์และประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงในประเทศไต้หวัน โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 37 primer สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์มะม่วงในไต้หวัน 22 สายพันธุ์ได้

ตารางที่ 3 จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์แถบที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแต่ละไพรเมอร์

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	Polymorphic (%)	ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	Polymorphic (%)
MngSSR24	5	100	MISHRS1	3	33.33
MngSSR27	4	100	MISHRS4	4	75
SSR8	4	75	MISHRS18	3	33.33
SSR15	3	100	MISHRS37	3	66.67
SSR16	2	100	QGMi001	3	33.33
SSR19	5	80	QGMi002	3	66.67
SSR26	3	66.67	QGMi005	2	50
SSR36	5	100	QGMi009	5	40
SSR46	5	80	QGMi010	3	100
SSR52	2	100	QGMi025	3	66.67
SSR59	2	100	LMMA8	2	50
SSR85	3	100	LMMA9	2	50
SSR89	8	75	LMMA10	3	100
MillHR18	3	100	LMMA11	3	100
MillHR26	4	75	LMMA12	2	100
MillHR30	5	40	LMMA15	2	50
MillHR36	3	66.67			
จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่แสดงความแตกต่าง 112					

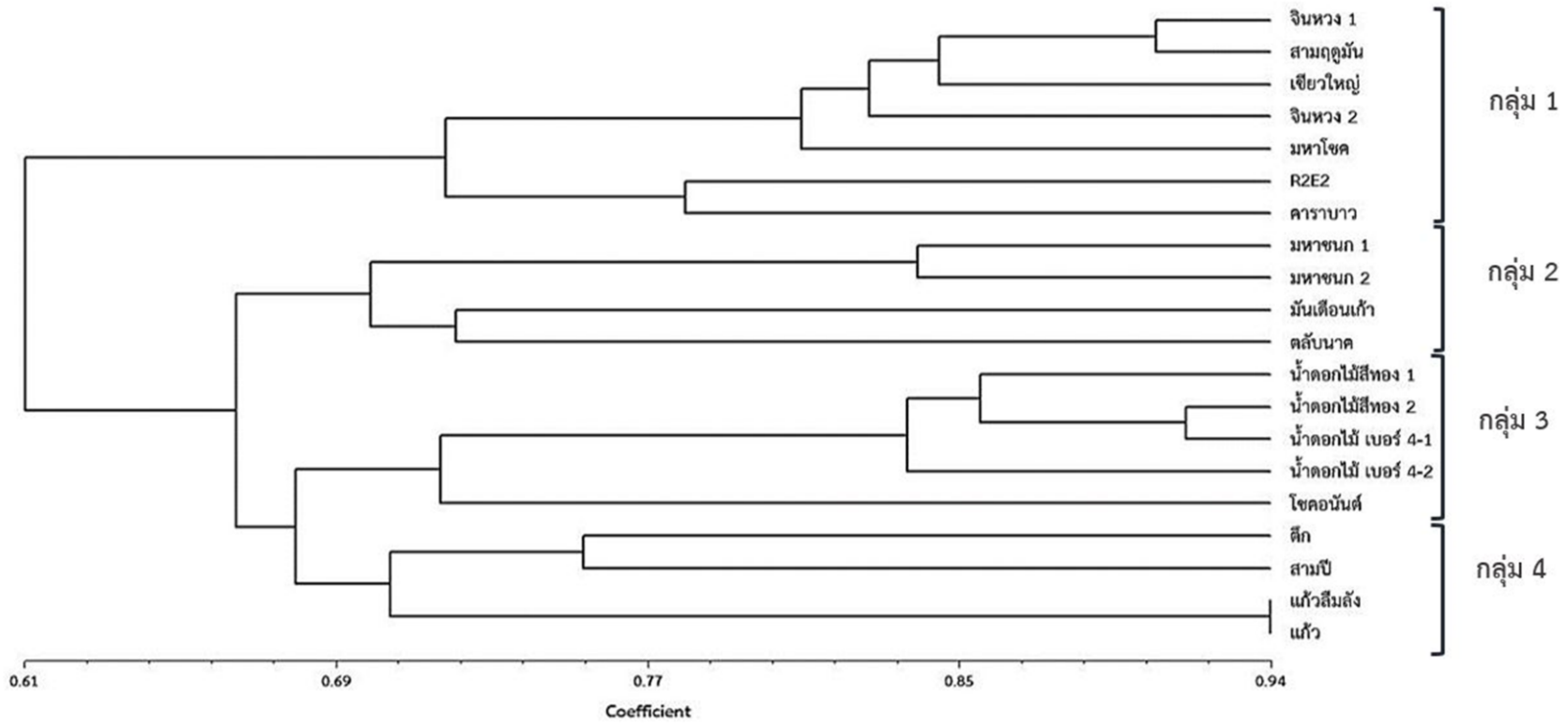
การหาค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุ์กรรมของมะม่วง

ค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสามารถวิเคราะห์ได้จากการนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกันของมะม่วงจำนวน 20 พันธุ์ มาวิเคราะห์จาก 33 ไพรเมอร์ จำนวน 112 ตำแหน่ง ด้วยโปรแกรม NTSYSpc รุ่น 2.2 ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard (Jaccard's coefficient) ในการวิเคราะห์ข้อมูลและเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA แสดงผลในรูปแบบเดนโดรแกรม (dendrogram) (Zhang *et al.,* 2008) จากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) พบว่า มะม่วงทั้ง 20 พันธุ์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.52 ถึง 0.94 (ค่าที่เข้าใกล้ 1 มาก แสดงถึงความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่มาก) (ภาพที่ 11) มะม่วงทั้ง 20 พันธุ์ สามารถจัดจำแนกกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์จินหวง1 สามฤดูมัน เขียวใหญ่ มหาโชค จินหวง2 R2E2 และคาราบาว ซึ่งมะม่วงที่อยู่ในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันคือ ลักษณะขอบใบเรียบ (entire) และมีขนาดผลใหญ่ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์มหาชนก1 มหาชนก2 มันเดือนเก้า และตลับนาค มะม่วงที่อยู่ในกลุ่มนี้มีลักษณะสัณฐานวิทยาของขอบใบ (leaf margin) ที่คล้ายกันคือ ขอบใบมีลักษณะเป็นคลื่น (undulate) กลุ่มที่ 3 ได้แก่ น้ำดอกไม้สีทอง1 น้ำดอกไม้สีทอง2 น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 น้ำดอกไม้เบอร์ 4-2 และโชคอนันต์ มะม่วงที่อยู่ในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันในรูปทรงใบ คือ ป้องกลางใบ (elliptical) (ตารางที่ 1) และมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดสูง (ตารางที่ 2) และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ พันธุ์ตึก สามปี แก้วลืมลัง และแก้ว มะม่วงที่อยู่ในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลที่คล้ายกันคือ รูปไข่กลับ (ตารางที่ 1) และมีคุณภาพของผลผลิตที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ น้ำหนักของผลผลิต (ตารางที่ 2)

จากการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วง พบว่า พันธุ์แก้วลืมลังและพันธุ์แก้ว มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ 0.94 เมื่อแสดงผลในรูปแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) (ภาพที่ 10) ซึ่งพันธุ์แก้วลืมลังที่ใช้ในการทดลองนี้อาจจะเป็นพันธุ์แก้วและเกิดการเรียกชื่อที่ผิดไปจึงทำให้เกิดความสับสนของการระบุสายพันธุ์ เพราะว่าผลที่ได้จากการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่สูง

ผลการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วงจำนวน 20 พันธุ์ สามารถแยกความแตกต่างและจำแนกออกได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วย พันธุ์จินหวง1 สามฤดูมัน เขียวใหญ่ มหาโชค จินหวง2 R2E2 และคาราบาว พบว่ามีไพรเมอร์ QGMi002 (ภาพภาคผนวกที่ 18) แสดงแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในมะม่วงกลุ่มนี้ ซึ่งอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะของสัณฐานวิทยาของใบที่คล้ายคลึงกันและสัณฐานวิทยาของผลที่คล้ายกันในมะม่วงกลุ่มนี้ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์มหาชนก1 มหาชนก2 มันเดือนเก้า และตลับนาค ซึ่งมีไพรเมอร์ MillHR36 (ภาพภาคผนวกที่ 16) ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันของมะม่วงกลุ่มนี้ ไพรเมอร์ดังกล่าวอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันของมะม่วงในกลุ่มนี้ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ น้ำดอกไม้สีทอง1 น้ำดอกไม้สีทอง2 น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 น้ำดอกไม้เบอร์ 4-2 และโชคอนันต์ ซึ่งพบว่ามีไพรเมอร์ SSR8 (ภาพภาคผนวกที่ 11) ที่แสดงให้เห็นแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏแถบเหมือนกันของมะม่วงที่อยู่ในกลุ่มนี้ และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ พันธุ์ตึก สามปี แก้วลืมลัง และแก้ว พบว่ามีไพรเมอร์ SSR46 (ภาพภาคผนวกที่ 13) ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันของมะม่วงกลุ่มนี้



ภาพที่ 10 แผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA

mo1	1.00																			
mo2	0.86	1.00																		
mo3	0.86	0.82	1.00																	
mo4	0.91	0.81	0.83	1.00																
mo5	0.84	0.79	0.81	0.81	1.00															
mo6	0.81	0.76	0.78	0.75	0.76	1.00														
mo7	0.58	0.56	0.54	0.56	0.57	0.59	1.00													
mo8	0.60	0.60	0.58	0.60	0.60	0.63	0.83	1.00												
mo9	0.61	0.60	0.56	0.59	0.59	0.61	0.88	0.91	1.00											
mo10	0.55	0.54	0.52	0.52	0.57	0.60	0.84	0.81	0.87	1.00										
mo11	0.64	0.62	0.56	0.60	0.63	0.63	0.71	0.70	0.71	0.69	1.00									
mo12	0.71	0.63	0.65	0.67	0.65	0.66	0.68	0.69	0.70	0.64	0.84	1.00								
mo13	0.64	0.62	0.64	0.60	0.63	0.67	0.61	0.68	0.67	0.63	0.65	0.71	1.00							
mo14	0.59	0.57	0.53	0.54	0.58	0.56	0.74	0.69	0.74	0.69	0.65	0.62	0.67	1.00						
mo15	0.60	0.58	0.58	0.58	0.59	0.61	0.68	0.73	0.72	0.65	0.66	0.65	0.68	0.70	1.00					
mo16	0.59	0.59	0.55	0.57	0.58	0.58	0.67	0.67	0.69	0.67	0.67	0.64	0.69	0.72	0.75	1.00				
mo17	0.64	0.62	0.58	0.63	0.61	0.65	0.67	0.65	0.69	0.65	0.72	0.71	0.72	0.67	0.68	0.65	1.00			
mo18	0.59	0.59	0.55	0.55	0.59	0.65	0.64	0.65	0.69	0.67	0.61	0.58	0.67	0.72	0.68	0.72	0.67	1.00		
mo19	0.59	0.59	0.55	0.57	0.59	0.65	0.62	0.65	0.69	0.67	0.61	0.60	0.67	0.67	0.68	0.74	0.69	0.94	1.00	
mo20	0.68	0.65	0.65	0.66	0.67	0.78	0.58	0.63	0.64	0.64	0.63	0.64	0.69	0.60	0.65	0.69	0.74	0.74	0.79	1.00
	mo1	mo2	mo3	mo4	mo5	mo6	mo7	mo8	mo9	mo10	mo11	mo12	mo13	mo14	mo15	mo16	mo17	mo18	mo19	mo20

ภาพที่ 11 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ จาก 33 ไพรเมอร์ที่ได้จากเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR

หมายเหตุ : (mo1) จินหวง1 (mo2) จินหวง2 (mo3) เขียวใหญ่ (mo4) สามฤดูมัน (mo5) มหาโชค (mo6) R2E2 (mo7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (mo 8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (mo9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (mo10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (mo11) มหาชนก1 (mo12) มหาชนก2 (mo13) มันเดือนเก้า (mo14) โชคอนันต์ (mo15) ตึก (mo16) สามปี (mo17) ตลับนาค (mo18) แก้วลืมลัง (mo19) แก้ว (mo20) คาราบาว

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ โดยใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกกลุ่ม สามารถจำแนกความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของมะม่วง 20 พันธุ์ ได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มแก้ว ได้แก่ แก้ว มันเดือนเก้า 2) กลุ่มน้ำดอกไม้ ได้แก่ น้ำดอกไม้สีทอง1 น้ำดอกไม้สีทอง2 น้ำดอกไม้เบอร์ 4-1 และน้ำดอกไม้เบอร์ 4-2 3) กลุ่มหนังกลางวัน ได้แก่ แก้วลืมลัง มหาชนก 1 และมหาชนก2 4) กลุ่มอกร่อง ได้แก่ จินหวง1 จินหวง2 เขียวใหญ่ สามฤดูมัน มหาโชค โชคอนันต์ ตีก สามปี และคาราบาว และ 5) กลุ่มผลกลม ได้แก่ ตลับนาค และ R2E2 ซึ่งกลุ่มน้ำดอกไม้ และกลุ่มอกร่อง แสดงลักษณะที่ดีทางคุณภาพผลผลิต ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการจัดกลุ่มและคัดเลือกสายพันธุ์มะม่วงสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์มะม่วงโดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล ชนิด SSR marker

การประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR มาช่วยในการจำแนกกลุ่ม ซึ่งมีไพรเมอร์จำนวน 33 ไพรเมอร์ ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันถึง 85 แถบ คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ที่สามารถจำแนกมะม่วงได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ พันธุ์จินหวง1 สามฤดูมัน เขียวใหญ่ มหาโชค จินหวง2 R2E2 และคาราบาว กลุ่มที่ 2 ได้แก่ พันธุ์มหาชนก1 มหาชนก2 มันเดือนเก้า และตลับนาค กลุ่มที่ 3 ได้แก่ น้ำดอกไม้สีทอง1 น้ำดอกไม้สีทอง2 น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 น้ำดอกไม้เบอร์ 4-2 และโชคอนันต์ และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ พันธุ์ตีก สามปี แก้วลืมลัง และแก้ว ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.52 ถึง 0.94

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR ทำให้สามารถจำแนกมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ได้เป็นกลุ่มที่ไม่เหมือนกัน เนื่องจากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและผลมะม่วงที่เก็บบันทึกเป็นลักษณะเบื้องต้นที่ยังไม่ครอบคลุมทั้งหมด เพราะพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นเพียงพันธุ์ที่ปลูกรวบรวมไว้ในพื้นที่เดียวกันและสภาพแวดล้อมอาจมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะทางฟีโนไทป์ ตลอดจนการเรียกชื่อมะม่วงพันธุ์นั้นๆ นอกจากนี้ควรใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นหรือเพิ่มจำนวนมากขึ้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดและชัดเจนยิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

บรรณานุกรม

เกศิณี ระมิงค์วงศ์. 2528. **ไม้ผลเมืองร้อน.** เชียงใหม่: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จริงแท้ ศิริพานิช. 2537. **วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้.** ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม.

ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2555. **การหาตำแหน่งยีนและการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช.** [Online]. แหล่งที่มา http://www.corsat.agr.ku.ac.th/doc/01003579/%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%AB%E0%B8%B2%E0%B8%95%E0%B8%B3%E0%B9%81%E0%B8%AB%E0%B8%99%E0%B9%88%E0%B8%87%E0%B8%A2%E0%B8%B5%E0%B8%99%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%A2%E0%B8%B8%E0%B8%81%E0%B8%95%E0%B9%8C%E0%B9%83%E0%B8%8A%E0%B9%89%E0%B9%83%E0%B8%99%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B1%E0%B8%9A%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B8%E0%B8%87%E0%B8%9E%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%98%E0%B8%B8%E0%B9%8C%E0%B8%9E%E0%B8%B7%E0%B8%8A144.pdf.

ประเสริฐ ศรีสาธร. 2548. **คู่มือการทำสวนมะม่วง.** กรุงเทพมหานคร: อักษรสยามการพิมพ์.

วงศมน เพ็งประเสิร์ฐ. 2550. **การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันระหว่างโปรแกรม NTSYSpc version 2.20e และ PHYLIP version 3.66.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิจิตร วังใน. 2529. **มะม่วง.** ศรีสมบัติการพิมพ์: คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลักงการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา. 2556. **มะม่วง การผลิตและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว.** วนิดาการพิมพ์: ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลักงการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช DNA Markers in Plant Breeding. **JOURNAL OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY**, 5(2), 37-59.

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ. 2544. **ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืชมะม่วง (Plant Database for Mango).** กรุงเทพมหานคร: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2555. **โอกาศสินค้าเกษตรไทยสู่ประชาคมอาเซียน.** [Online]. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/ebook/ThailandtoASEAN.pdf.

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. **เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพมหานคร: จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545. **ดีเอ็นเอเทคโนโลยี DNA Technology.** โรงพิมพ์ตระกูลไทยพิษณุโลก: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม.

Ahmad, R. I., Tabbasam, N., Malik, A. U., Malik, S. A., Mehboob ur, R. & Zafar, Y. 2008. Assessment of genetic diversity among mango (Mangifera indica L.) genotypes using RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, 117(3), 297-301.

Begum, H., Reddy, M., Malathi, S., Reddy, B. P., Narshimulu, G., Nagaraju, J. & Siddiq, A. E. 2014. **Morphological and Microsatellite Analysis of Intravarietal Variability in 'Cherukurasam' Cultivar of Mango (Mangifera indica L.)**.

Begum, H., Reddy, M., Malathi, S., Reddy, B. P., Narshimulu, G., Nagaraju, J. & Siddiq, E. A. 2013. **Morphological and Microsatellite Analysis of Intravarietal Heterogeneity in 'Beneshan' Mango (Mangifera indica L.)**.

BEGUM, H., REDDY, M. T., MALATHI, S., REDDY, B. P., NARSHIMULU, G., NAGARAJU, J. & SIDDIQ, E. A. 2013. MICROSATELLITE ANALYSIS OF INTRA CULTIVAR DIVERSITY IN 'CHINNARASAM' MANGO FROM ANDHRA PRADESH, INDIA. **African Crop Science Journal**, 21(2), 109-117.

Begum, H., Reddy, M. T., Malathi, S., Reddy, B. P., Narshimulu, G., Nagaraju, J. & SIDDIQ, E. A. 2013. Molecular Analysis of Intracultivar Polymorphism of 'Panchadarakalasa' Mango by Microsatellite Markers. **Jordan Journal of Biological Sciences**, 6(2), 127-136.

Begum, H., Reddy, M. T., Malathi, S., Reddy, B. P., Narshimulu, G., Nagaraju, J. & Siddiq, E. A. 2014. Morphological and Microsatellite Analysis of Intravarietal Heterogeneity in 'Beneshan' Mango (Mangifera indica L.). **International Journal of Agricultural and Food Research**, 3(2), 16-33.

Begum, H., Reddy, T. M., Malathi, S., Reddy, B. P., Arcahk, S., Nagaraju, J. & Siddiq, E. A. 2012. Molecular Analysis for Genetic Distinctiveness and Relationships of Indigenous Landraces with Popular Cultivars of Mango (Mangifera indica L.) in

Andhra Pradesh, India **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, 6(1), 24-37.

Dillon, N., Innes, D., Bally, I., Wright, C., Devitt, L. & Dietzgen, R. 2014. Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat (EST-SSR) Marker Resources for Diversity Analysis of Mango (Mangifera indica L.). **Diversity**, 6(1), 72-87.

Dillon, N. L., Bally, I. S. E., Wright, C. L., Hucks, L., Innes, D. J. & Dietzgen, R. G. 2013. Genetic diversity of the Australian National Mango Genebank. **Scientia Horticulturae**, 150(Supplement C), 213-226.

Domingues, E. T., Souza;, V. C., Sakuragui;, C. M., Júnior;, J. P., Pio;, R. M., Sobrinho, J. T. & Souza, J. P. 1999. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE TANGERINAS DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE CITROS DO CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA/IAC **Scientia Agricola**, 56(1), 197-206.

Gibert, O., Dufour, D., Giraldo, A., Sanchez, T., Reynes, M., Pain, J. P., Gonzalez, A., Fernandez, A. & Diaz, A. 2009. Differentiation between cooking bananas and dessert bananas. 1. Morphological and compositional characterization of cultivated Colombian Musaceae (Musa sp.) in relation to consumer preferences. **J Agric Food Chem**, 57(17), 7857-7869.

Hakki, E., Christo, P., Luchezar, K. & Mahinur, A. 2002. Isolation of wheat microsatellite DNA fragments by hybridization selection. **Bulg. J. Plant Physol**, 28(3-10).

Khan, A. S., Ali, S. & Khan, I. A. 2015. Morphological and molecular characterization and evaluation of mango germplasm: An overview. **Scientia Horticulturae**, 194(353-366).

Kheshin, A. E. M., Hossam, A. S. & Abdou, a. a. 2016. **Morphological and Molecular Analysis of Genetic Diversity among Some 'Sukkary' Mango (Mangifera indica L.) Genotypes**.

Kheshin, M. A. E., Sayed, H. A. & Allatif, A. M. A. 2016. Morphological and Molecular Analysis of Genetic Diversity among Some ‘Sukkary’ Mango (*Mangifera indica* L.) Genotypes. **Horticultural Science & Ornamental Plants**, 8(1), 01-10.

Krishnapillai, N. & Wijeratnam, R. S. W. 2016. Morphometric analysis of mango varieties in Sri Lanka. **Australian Journal of Crop Science**, 10(6), 784-792.

Kumar, M., Ponnuswami, V., Nagarajan, P., Jeyakumar, P. & Senthil, N. 2013. Molecular characterization of ten mango cultivars using simple sequences repeat (SSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, 12(47), 6568-6573.

Luo, C., He, X.-H., Chen, H., Ou, S.-J. & Gao, M.-P. 2010. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, 38(6), 1176-1184.

Luo, C., He, X.-h., Chen, H., Ou, S.-j., Gao, M.-p., Brown, J. S., Tondo, C. T. & Schnell, R. J. 2011. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, 39(4), 676-684.

Menzel, C. M. & Le Lagadec, M. D. 2017. Can the productivity of mango orchards be increased by using high-density plantings? **Scientia Horticulturae**, 219(222-263).

Ravishankar, K. V., Bommisetty, P., Bajpai, A., Srivastava, N., Mani, B. H., Vasugi, C., Rajan, S. & Dinesh, M. R. 2015. Genetic diversity and population structure analysis of mango (Mangifera indica) cultivars assessed by microsatellite markers. **Trees**, 29(3), 775-783.

Rymbai, H., Laxman, R. H., Dinesh, M. R., Sunoj, V. S. J., Ravishankar, K. V. & Jha, A. K. 2014. Diversity in leaf morphology and physiological characteristics among mango (Mangifera indica) cultivars popular in different agro-climatic regions of India. **Scientia Horticulturae**, 176(Supplement C), 189-193.

Schnell, R. J., Olano, C. T., Quintanilla, W. E. & Meerow, A. W. 2005. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (Mangifera indica L.) and cross-species amplification in closely related taxa. **Molecular ecology notes**, 5(3), 625-627.

Sennhenn, A., Prinz, K., Gebauer, J., Whitbread, A., Jamnadass, R. & Kehlenbeck, K. 2014. Identification of mango (Mangifera indica L.) landraces from Eastern and Central Kenya using a morphological and molecular approach. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 61(1), 7-22.

Shamili, M., Fatahi, R. & Hormaza, J. I. 2012. Characterization and evaluation of genetic diversity of Iranian mango (Mangifera indica L., Anacardiaceae) genotypes using microsatellites. **Scientia Horticulturae**, 148(230-234).

Tsai, C.-C., Chen, Y.-K. H., Chen, C.-H., Weng, I. S., Tsai, C.-M., Lee, S.-R., Lin, Y.-S. & Chiang, Y.-C. 2013. Cultivar identification and genetic relationship of mango (Mangifera indica) in Taiwan using 37 SSR markers. **Scientia Horticulturae**, 164(Supplement C), 196-201.

Viruel, M. A., Escribano, P., Barbieri, M., Ferri, M. & Hormaza, J. I. 2005. Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango (Mangifera indica L., Anacardiaceae) with microsatellites. **Molecular Breeding**, 15(4), 383-393.

Wichan, E., Yonemori, K., Sugiura, A., Utsunomiya, N. & Subhadrabandhu, S. 1999. Identification of mango cultivars of Thailand and evaluation of their genetic variation using the amplified fragments by simple sequence repeat-(SSR-) anchored primers.pdf. **Scientia Horticulturae**, 82(57-66).

Zhang, Q., Yan, G., Dai, H., Zhang, X., Li, C. & Zhang, Z. 2008. Characterization of Tomentosa cherry (Prunus tomentosa Thunb.) genotypes using SSR markers and morphological traits. **Scientia Horticulturae**, 118(1), 39-47.

ภาคผนวก ก

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์

จินหวง1 จินหวง2

เขียวใหญ่ สามฤดูมัน

ภาพภาคผนวกที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (จินหวง1 จินหวง2 เขียวใหญ่ สามฤดูมัน)

มหาโชค R2E2

น้ำดอกไม้สีทอง1 น้ำดอกไม้สีทอง2

ภาพภาคผนวกที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (มหาโชค R2E2 น้ำดอกไม้สีทอง1 น้ำดอกไม้สีทอง2)

น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1

น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2

มหาชนก1

มหาชนก2

ภาพภาคผนวกที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 มหาชนก1 มหาชนก2)

มันเดือนเก้า

โชคอนันต์

ตึก

สามปี

ภาพภาคผนวกที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (มันเดือนเก้า โชคอนันต์ ตึก สามปี)

ตลับนาค แก้วลืมลัง

แก้ว คาราบาว

ภาพภาคผนวกที่ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (ตลับนาค แก้วลืมลัง แก้ว คาราบาว)

จินหวง1

จินหวง2

เขียวใหญ่

สามฤดูมัน

ภาพภาคผนวกที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของผลมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (จินหวง1 จินหวง2 เขียวใหญ่ สามฤดูมัน)

มหาโชค

R2E2

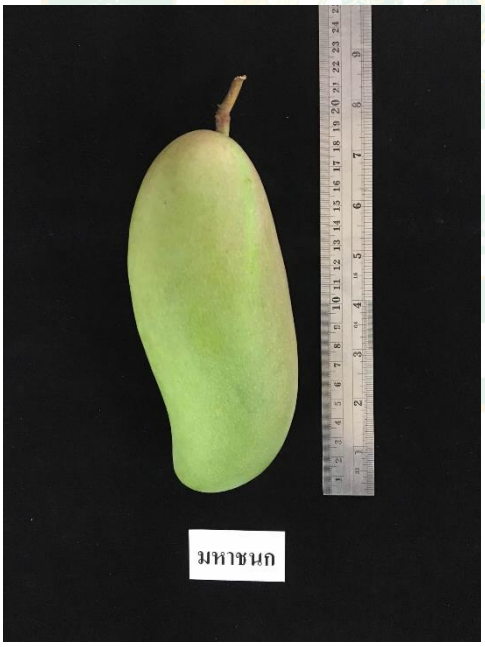
น้ำดอกไม้สีทอง1

น้ำดอกไม้สีทอง2

ภาพภาคผนวกที่ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของผลมะม่วงพันธุ์ต่าง (มหาโชค R2E2 น้ำดอกไม้สีทอง1 น้ำดอกไม้สีทอง2)

น้ำดอกไม้เบอร์ 4-1

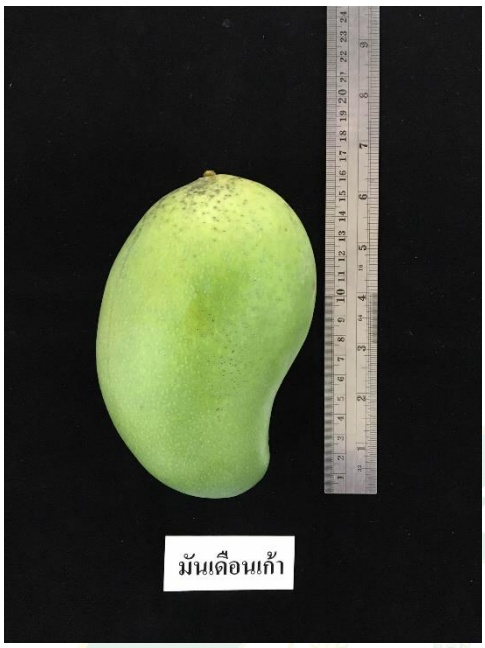
น้ำดอกไม้เบอร์ 4-2



มหาชนก1

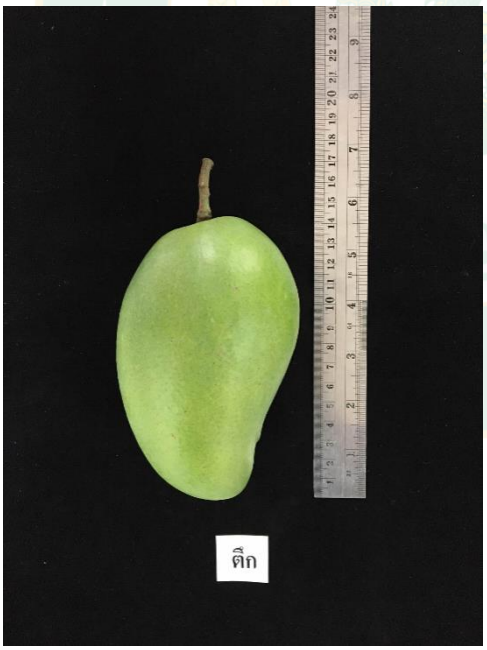
มหาชนก2

ภาพภาคผนวกที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของผลมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (น้ำดอกไม้เบอร์ 4-1 น้ำดอกไม้เบอร์ 4-2 มหาชนก1 มหาชนก2)

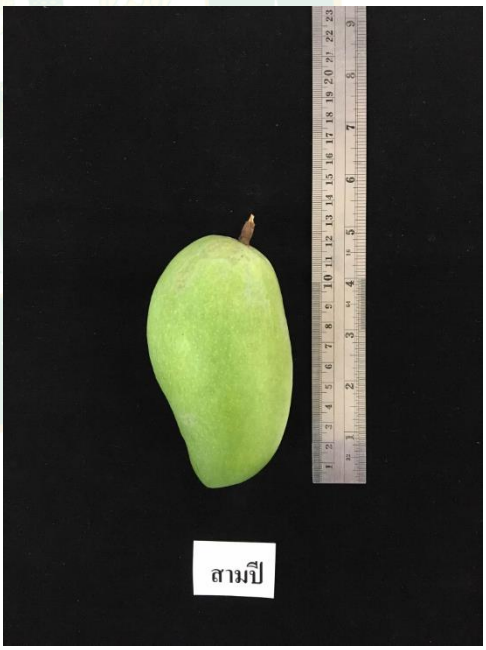


มันเดือนเก้า

โชคอนันต์



ตึก



สามปี

ภาพภาคผนวกที่ 9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของผลมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (มันเดือนเก้า โชคอนันต์ ตึก สามปี)

ตลับนาค แก้วลืมลัง

แก้ว คาราบาว

ภาพภาคผนวกที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของผลมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (ตลับนาค แก้วลืมลัง แก้ว คาราบาว)

ภาคผนวก ข

เครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR

การเตรียมสารเคมีที่ในการสกัดดีเอ็นเอและขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลาย 2X CTAB buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2X CTAB buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	
1M Tris-HCl pH 8.0	100 มิลลิลิตร
0.5M EDTA pH 8.0	40 มิลลิลิตร
5M NaCl	280 มิลลิลิตร
PVP	10 กรัม
CTAB	20 กรัม
เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารละลาย 1X TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1X TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	
1M Tris-HCl pH 8.0	10 มิลลิลิตร
0.5M EDTA pH 8.0	20 มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสารละลาย 5M NaCl ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

5M NaCl ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร	
NaCl	292.2 กรัม
เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเตรียมสารละลาย 0.5M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

0.5M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	
EDTA 292.25*0.	146.125 กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	800 มิลลิลิตร
ปรับ pH โดยใช้ NaOH	
เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเตรียมสารละลาย 1M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	
Tris base	121.1 กรัม
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	800 มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย HCl	
เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 6 การเตรียมสารละลาย 5X TBE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

5X TBE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	
Tris base	54 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
0.5M EDTA pH 8.0	20 มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 7 การเตรียมสารละลาย 1X TBE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

1X TBE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร	
5X TBE buffer	200 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	800 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 8 การเตรียมสารละลาย Agarose gel 2 เปอร์เซ็นต์

Agarose gel 2 เปอร์เซ็นต์	
Agarose	1 กรัม
1X TBE Buffer	50 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 9 การเตรียมสารละลาย Master mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา

การเตรียม Master mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา	
Forward Agarose	0.5 ไมโครลิตร
Revers 1X TBE Buffer	0.5 ไมโครลิตร
Go taq	5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	3 ไมโครลิตร
DNA template	1 ไมโครลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A260 และ A280) และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์

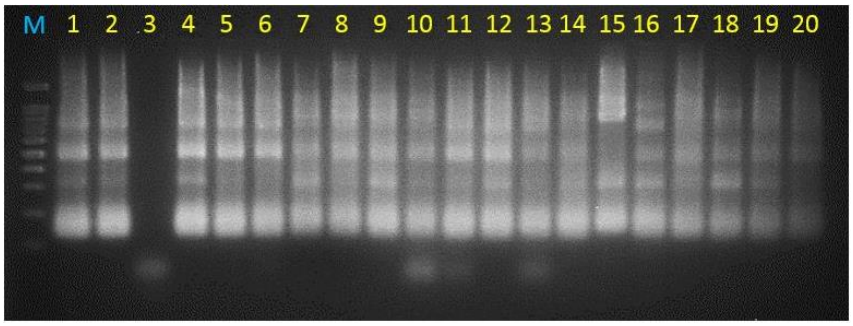
พันธุ์	A260	A280	A260/A280	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/µl)
จินหวง1	1.24	0.64	1.94	61.95
จินหวง2	0.62	0.32	1.94	31.17
เขียวใหญ่	0.50	0.26	1.97	24.78
สามฤดูมัน	0.56	0.30	1.79	27.86
มหาโชค	3.00	1.58	1.91	150.23
R2E2	3.77	1.98	1.91	188.43
น้ำดอกไม้สีทอง1	3.11	1.63	1.93	155.58
น้ำดอกไม้สีทอง2	4.07	2.12	1.92	203.37
น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1	4.98	2.68	1.86	348.90
น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2	4.37	2.30	1.90	218.67
มหาชนก1	5.65	2.93	1.92	282.43
มหาชนก2	6.76	3.57	1.90	337.93
มันเดือนเก้า	9.40	4.95	1.91	470.17
โชคอนันต์	25.64	11.54	2.22	1282.00
ตึก	7.88	4.09	1.93	394.10
สามปี	22.65	9.93	2.27	1127.67
ตลับนาค	7.95	4.06	1.96	397.27
แก้วลืมลัง	5.28	2.73	1.93	264.03
แก้ว	1.20	0.64	1.87	60.12
คาราบาว	0.63	0.33	1.88	31.46

ตารางภาคผนวกที่ 11 SSR primers ที่ใช้ในการทดลอง

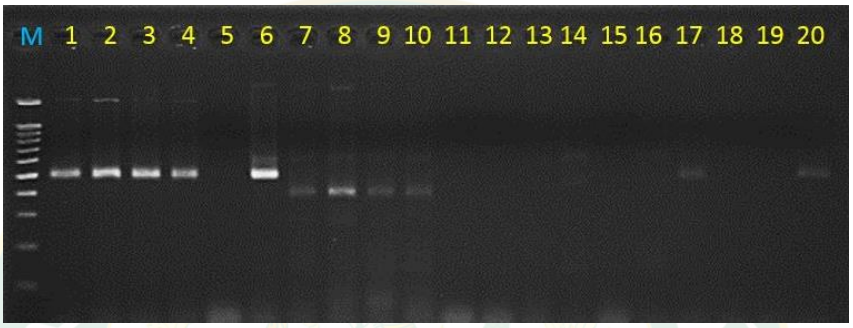
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′ - 3′)	แหล่งที่มาของไพรเมอร์
MngSSR24	F: CGATGGACTTCATAAGAAGAG	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: GCTAGCAGAATCACCTTGGTC	
MngSSR27	F: CGAAACCGACTGCCTATTTT	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: CCATTAATAAAGTTGTGGCCA	
SSR8	F: TTGATGCAACTTTCTGCC	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: ATGTGATTGTTAGAATGAACTT	
SSR15	F: TTTACCAAGCTAGGGTCA	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: CACTCTTAAACTATTCAACCA	
SSR16	F: GCTTTATCCACATCAATATCC	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: TCCTACAATAACTTGCC	
SSR19	F: AATTATCCTATCCCTCGTATC	(Begum *et al.,* 2012)
	R: AGAAACATGATGTGAACC	
SSR26	F: GCCCTTGCATAAGTTG	(Begum *et al.,* 2012)
	R: TAAGTGATGCTGCTGGT	
SSR36	F: CCTCAATCTCACTCAACA	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: ACCCCACAATCAAACTAC	
SSR46	F: TCATTGCTGTCCCTTTTC	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: ATCGCTCAAACAATCC	
SSR52	F: AAAAACCTTACATAAGTGAATC	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: CAGTTAACCTGTTACCTTTTT	
SSR59	F: TTCTTTAGACTAAGAGCACATT	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: AGTTACAGATCTTCTCCAATT	
SSR85	F: GCTTGCTTCCAACTGAGACC	(BEGUM *et al.,* 2013)
	R: GCAAAATGCTCGGAGAAGAC	
SSR89	F:CGCCGAGCCTATAACCTCTA	(Begum *et al.,* 2014)
	R: ATCATGCCCTAAACGACGAC	
MillHR18	F: TCTGACGTCACCTCCTTTCA	(Ravishankar *et al.,* 2015)
	R: ATACTCGTGCCTCGTCCTGT	
MillHR26	F: GCGAAAGAGGAGAGTGCAAG	(Ravishankar *et al.,* 2015)
	R: TCTATAAGTGCCCCCTCACG	
MillHR30	F:AGCTATCGCCACAGCAAATC	(Ravishankar *et al.,* 2015)
	R:GTCTTCTTCTGGCTGCCAAC	
MillHR36	F:TCTATAAGTGCCCCCTCACG	(Ravishankar *et al.,* 2015)
	R:ACTGCCACCGTGGAAAGTAG	

ตารางภาคผนวกที่ 11 (ต่อ) SSR primers ที่ใช้ในการทดลอง

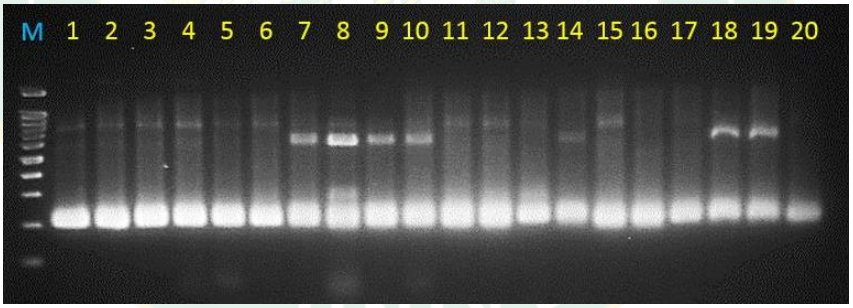
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′ - 3′)	แหล่งที่มาของไพรเมอร์
MISHRS1	F:TAACAGCTTTGCTTGCCTCC	(Schnell *et al.,* 2005)
	R:TCCGCCGATAAACATCAGAC	
MISHRS4	F:CCACGAATATCAACTGCTGCC	(Schnell *et al.,* 2005)
	R:TCTGACACTGCTCTTCCACC	
MISHRS18	F:AAACGAGGAAACAGAGCAC	(Schnell *et al.,* 2005)
	R:CAAGTACCTGCTGCAACTAG	
MISHRS37	F:CTCGCATTTCTCGCAGTC	(Schnell *et al.,* 2005)
	R:TCCCTCCATTTAACCCTCC	
QGMi001	F:GAAAGGCTTGCAGAGACAGG	(Dillon *et al.,* 2014)
	R:GTTTCTTCTGTTCGGTGATGGAGGAGT	
QGMi002	F:CTCAACCTCTTTCCTGCTC	(Dillon *et al.,* 2014)
	R:GTTTCTTCAATCCCCAGAAGAAAACCA	
QGMi005	F:TGGAGGAATTGAACCGATTG	(Dillon *et al.,* 2014)
	R:TTTCTTCAGTATCGGAGGCGTCAGTC	
QGMi009	F:GGGTTAGCAAAACTGGTGGA	(Dillon *et al.,* 2014)
	R:GTTTCTTCCCCAAGGATATACAGTAACCAG	
QGMi010	F:GTTTGAGCTTCCAAATTGC	(Dillon *et al.,* 2014)
	R:GTTTCTTCCTGGGAAAGTCAACAGCAG	
QGMi025	F:TAGGGAAGCACAACCACGAT	(Dillon *et al.,* 2014)
	R:GTTTCTTGTTCATCCTTGGCTCTCGAC	
LMMA8	F:CATGGAGTTGTGATACCTAC	(Viruel *et al.,* 2005)
	R:CAGAGTTAGCCATATAGAGTG	
LMMA9	F:TTGCAACTGATAACAAATATAG	(Viruel *et al.,* 2005)
	R:TTCACATGACAGATATACACTT	
LMMA10	F:TTCTTTAGACTAAGAGCACATT	(Viruel *et al.,* 2005)
	R:AGTTACAGATCTTCTCCAATT	
LMMA11	F:ATTATTTACCCTACAGAGTGC	(Viruel *et al.,* 2005)
	R:GTATTATCGGTAATGTCTTCAT	
LMMA12	F:AAAGATAGCATTTAATTAAGGA	(Viruel *et al.,* 2005)
	R:GTAAGTATCGCTGTTTGTTATT	
LMMA15	F:AACTACTGTGGCTGACATAT	(Viruel *et al.*, 2005)
	R:CTGATTAACATAATGACCATCT	



MngSSR24



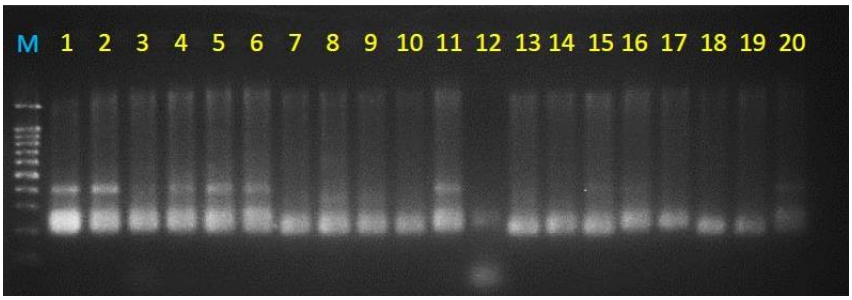
MngSSR27



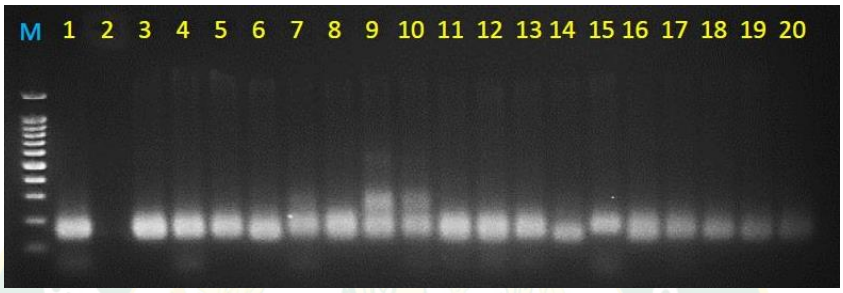
SSR8

ภาพภาคผนวกที่ 11 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ MngSSR24 MngSSR27 และ SSR8

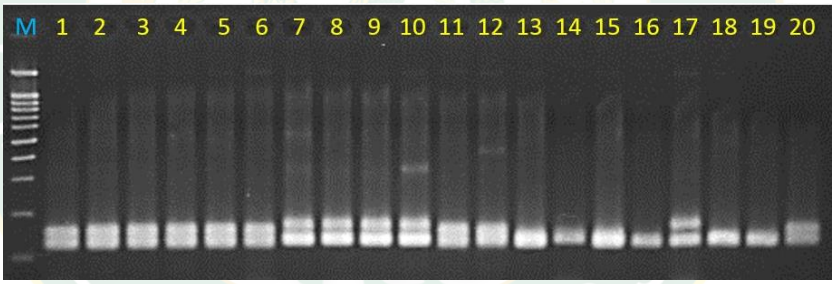
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



SSR15



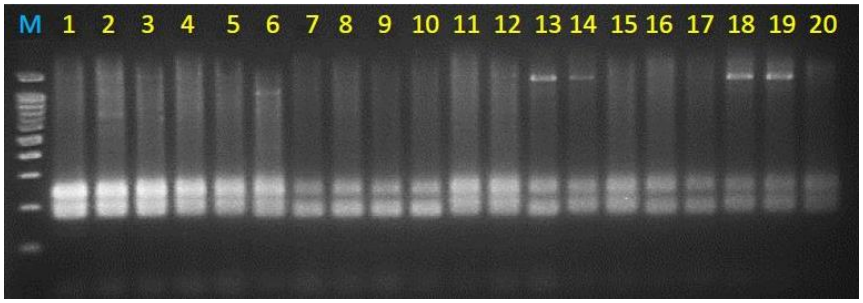
SSR16



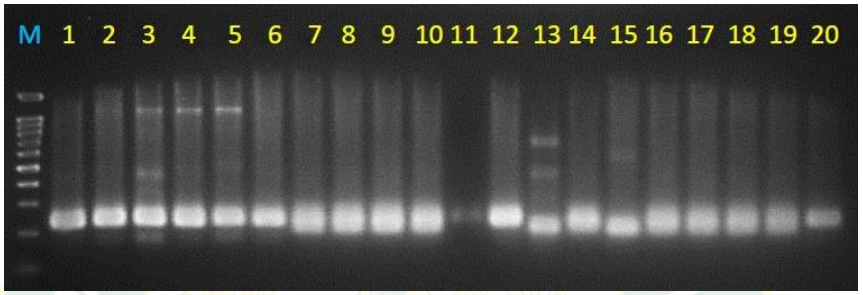
SSR19

ภาพภาคผนวกที่ 12 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ SSR15 SSR16 และ SSR19

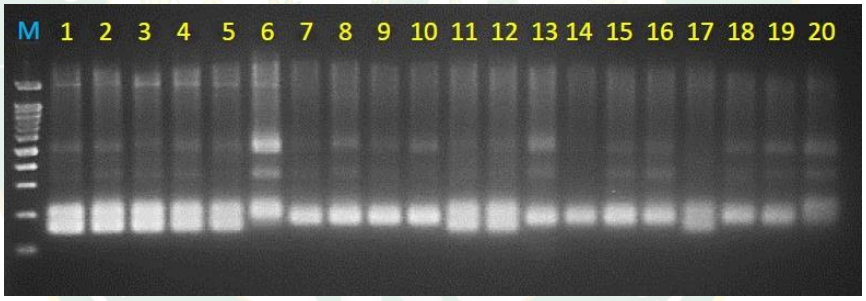
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



SSR26



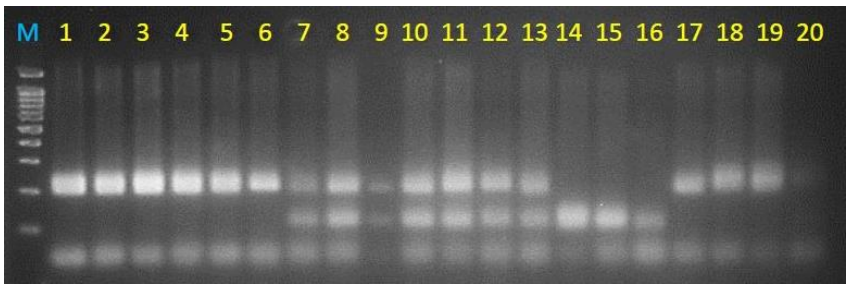
SSR36



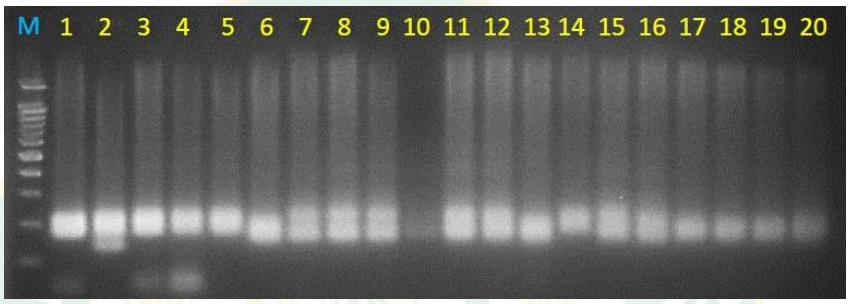
SSR46

ภาพภาคผนวกที่ 13 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ SSR26 SSR36 และ SSR46

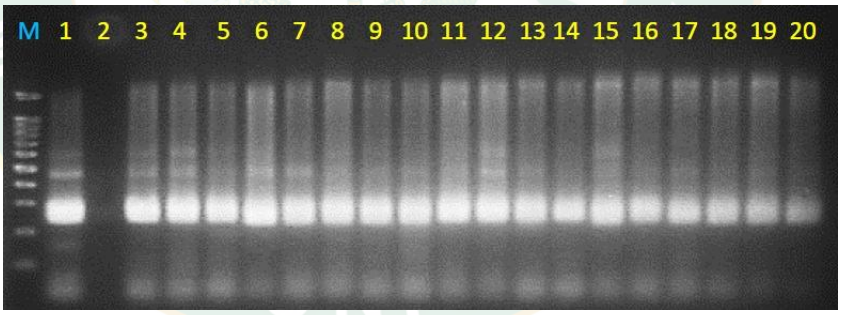
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



SSR52



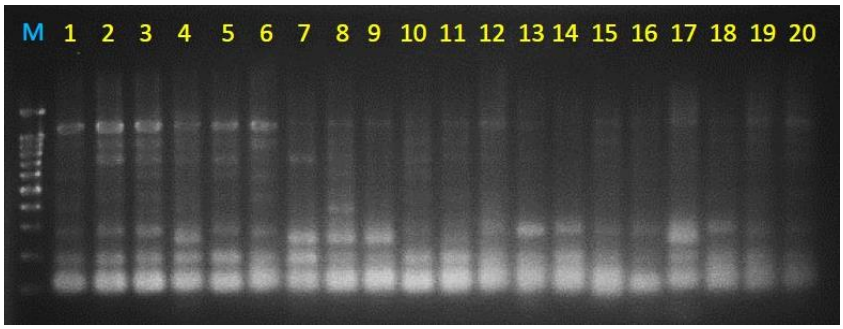
SSR59



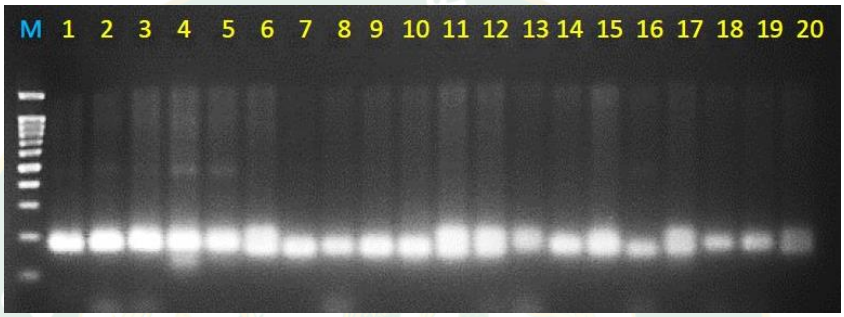
SSR85

ภาพภาคผนวกที่ 14 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ SSR52 SSR59 และ SSR85

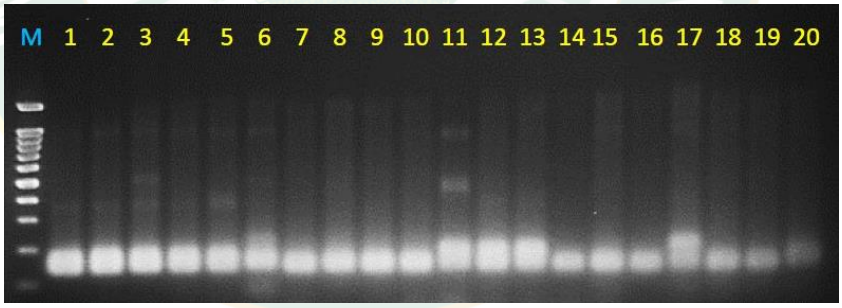
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



SSR89



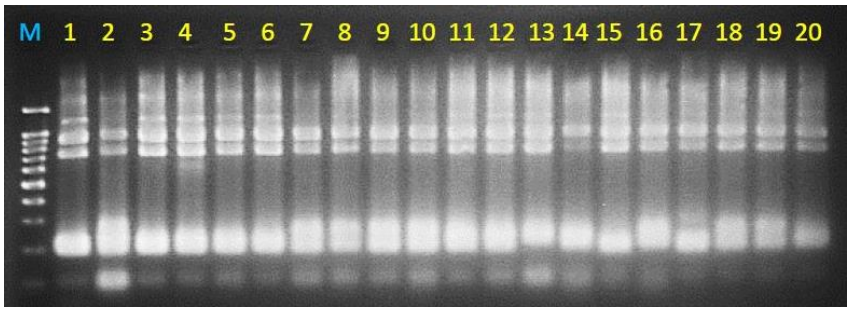
MillHR18



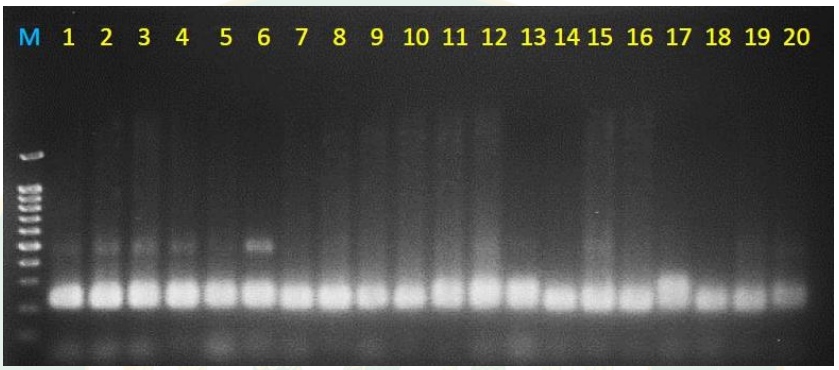
MillHR26

ภาพภาคผนวกที่ 15 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ SSR89 MillHR18 และ MillHR26

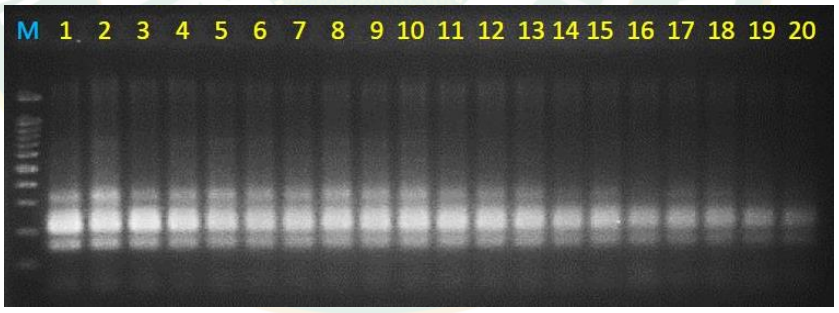
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



MillHR30



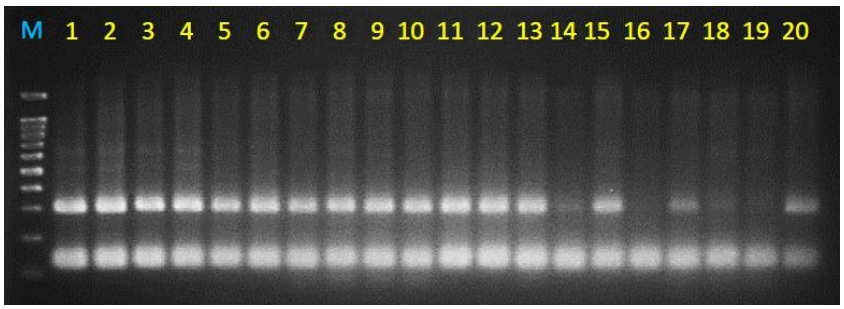
MliiHR36



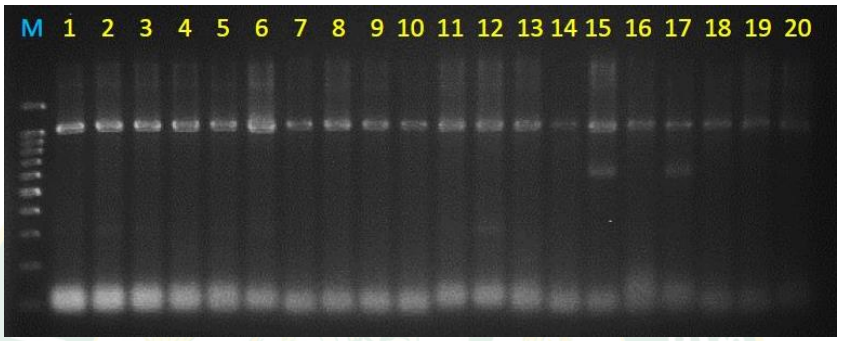
MISHRS1

ภาพภาคผนวกที่ 16 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ MillHR30 MillHR36 และ MISHRS1

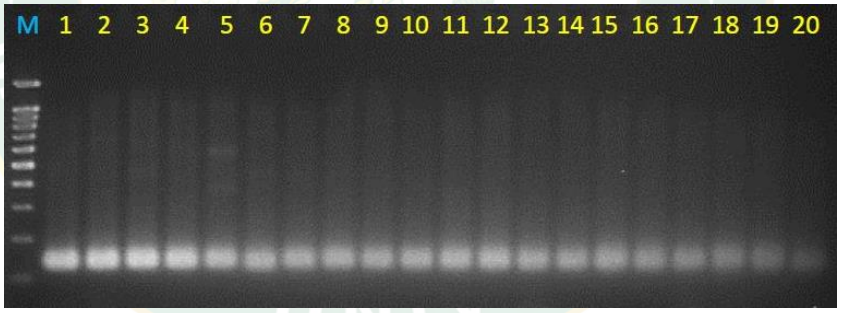
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



MISHRS4



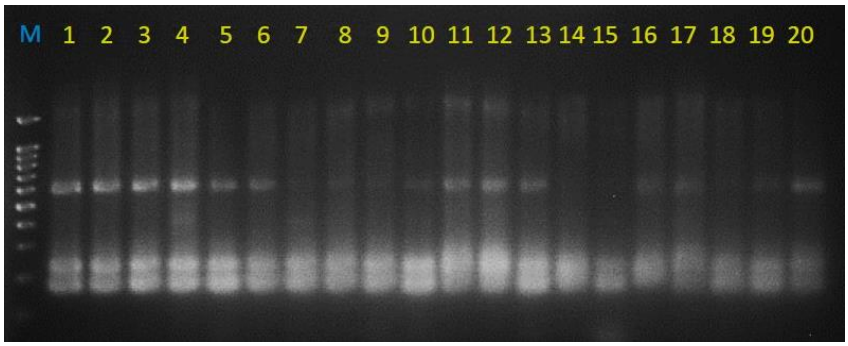
MISHRS18



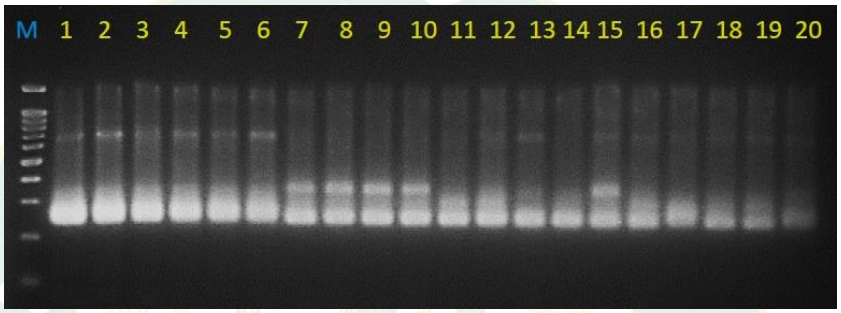
MISHRS37

ภาพภาคผนวกที่ 17 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ MISHRS4 MISHRS18 และ MISHRS37

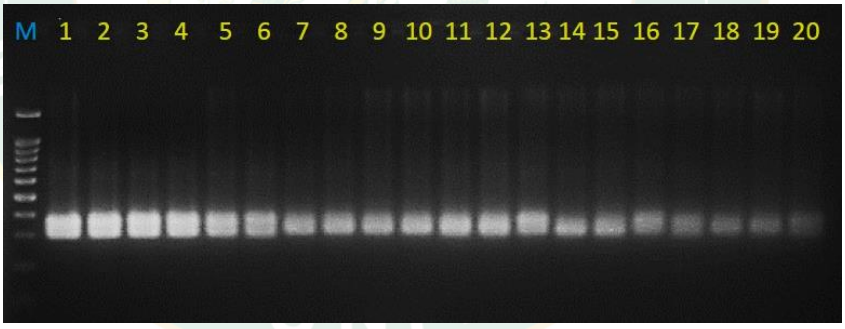
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



QGMi001



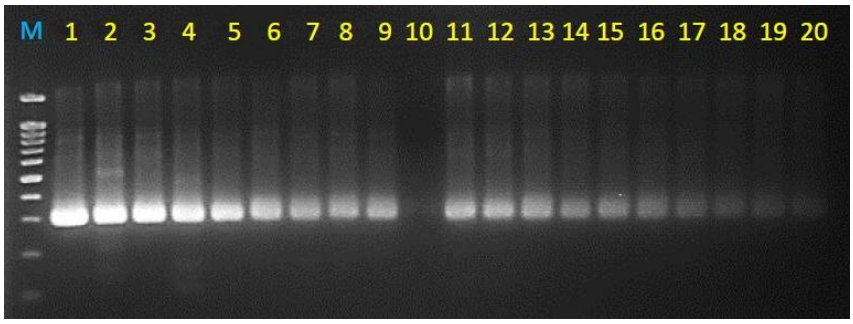
QGMi002



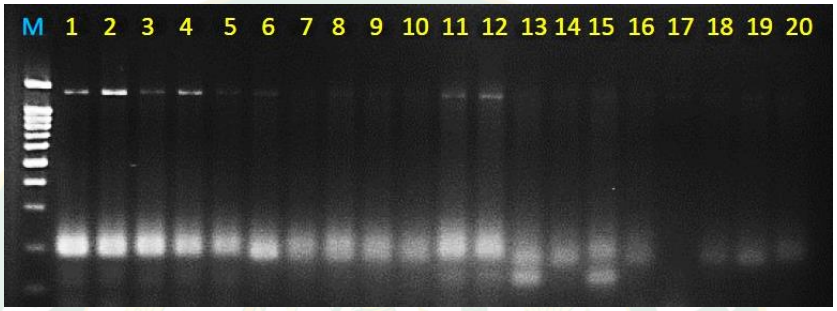
QGMi005

ภาพภาคผนวกที่ 18 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ QGMi001 QGMi002 และ QGMi005

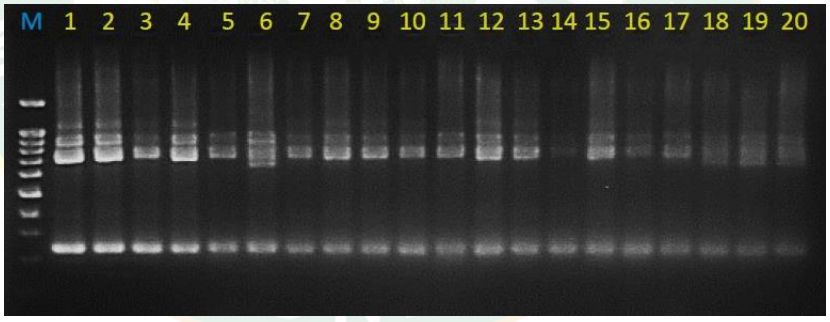
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



QGMi009



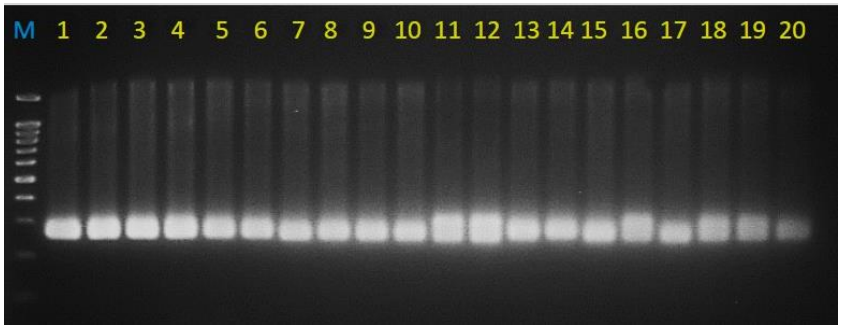
QGMi010



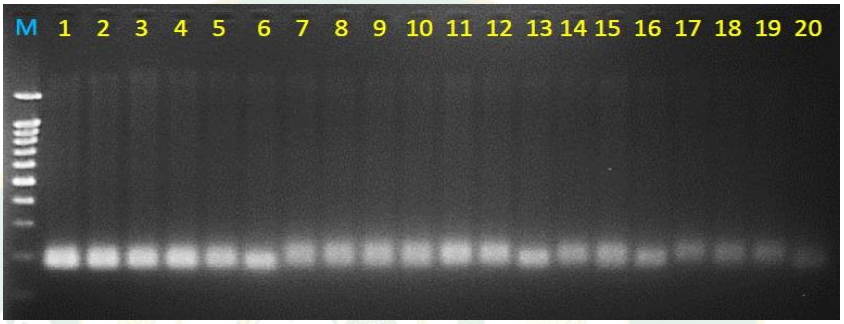
QGMi025

ภาพภาคผนวกที่ 19 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ QGMi009 QGMi010 และ QGMi025

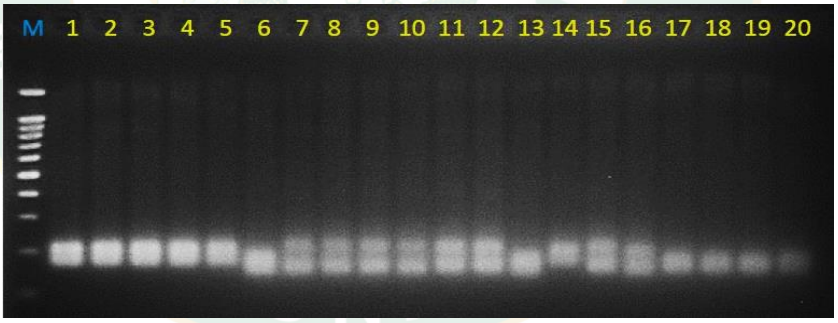
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



LMMA8



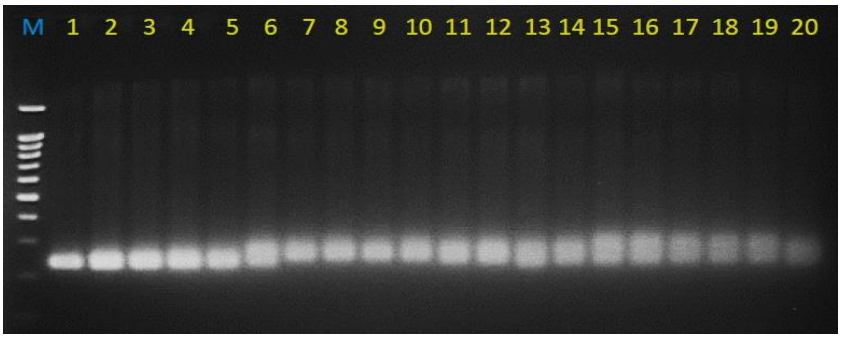
LMMA9



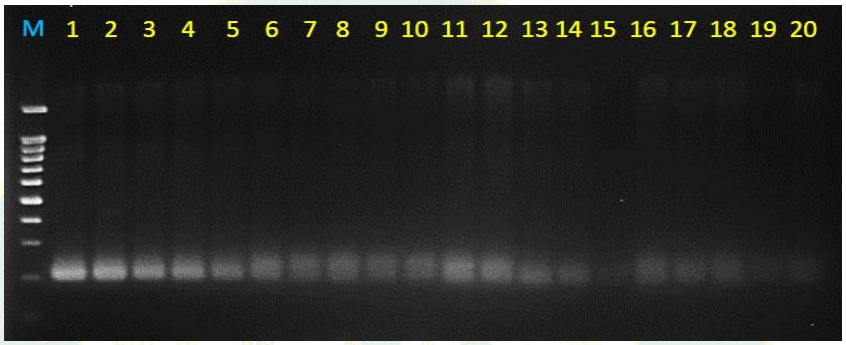
LMMA10

ภาพภาคผนวกที่ 20 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์LMMA8 LMMA9 และ LMMA10

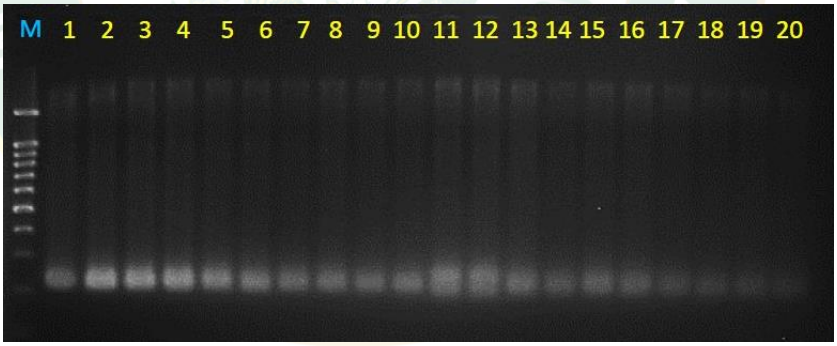
หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว



LMMA11



LMMA12



LMMA15

ภาพภาคผนวกที่ 21 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วง จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR กับไพรเมอร์ LMMA11 LMMA12 และ LMMA15

หมายเหตุ : M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1.5 Kb Plus DNA Ladder, (1) จินหวง1 (2) จินหวง2 (3) เขียวใหญ่ (4) สามฤดูมัน (5) มหาโชค (6) R2E2 (7) น้ำดอกไม้สีทอง1 (8) น้ำดอกไม้สีทอง2 (9) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-1 (10) น้ำดอกไม้ เบอร์ 4-2 (11) มหาชนก1 (12) มหาชนก2 (13) มันเดือนเก้า (14) โชคอนันต์ (15) ตึก (16) สามปี (17) ตลับนาค (18) แก้วลืมลัง (19) แก้ว (20) คาราบาว

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางอุบลวรรณ หงษ์อินทร์
เกิดเมื่อ	04 มกราคม 2537
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2559 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน สาขาไม้ผล มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พ.ศ. 2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย ณ โรงเรียนส้มป่อยพิทยาคม อ.ราษีไศล จ.ศรีสะเกษ
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2560 - ปัจจุบัน ผู้ช่วยนักวิจัย บริษัท ฮอทิเจนเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี. เอเชีย) จำกัด จังหวัดเชียงใหม่