รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย

2. โครงการวิจัย ปรับปรุงพันธุ์มะม่วง

3. กิจกรรม

กิจกรรมย่อยที่

4. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) ฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ไทย พันธุ์ต่างประเทศ และพันธุ์ลูกผสม เพื่อการใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) DNA fingerprint database of Thai, introduced and hybrid mango for breeding

5. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวรัชนี	ศิริยาน	สังกัด ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ
ผู้ร่วมงาน	นายสมพงษ์	สุขเขตต์	สังกัด ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ
	นางสาวศุจิรัตน์	สงวนรังศิริกุล	สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
	นายธวัชชัย	นิ่มกิ่งรัตน์	สังกัด ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ไทย พันธุ์ต่างประเทศ และพันธุ์ลูกผสม และการคัดเลือกมะม่วงลูกผสมออกจากต้นพ่อแม่ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 50 ไพรเมอร์ การศึกษาดำเนินการในมะม่วง 2 ชุด โดยในมะม่วงชุดที่ 1 เป็นพันธุ์ต่างประเทศและกลุ่มน้ำดอกไม้ จำนวน 24 พันธุ์/สายพันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 48 ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง 185 แถบ หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่า similarity coefficient แล้วสร้างเดนโดรแกรมด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.1 เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และศึกษาโครงสร้างภายในของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม Structure v.2.3 สามารถจัดกลุ่มมะม่วงเป็น 7 กลุ่ม โดยพบว่า มะม่วงลูกผสมเป็นลูกผสมในกลุ่มน้ำดอกไม้ทั้งหมด มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ไม่เป็นลูกผสมแต่จัดอยู่ในกลุ่มน้ำดอกไม้เช่นกัน ในมะม่วงชุดที่ 2 เป็นพันธุ์ลูกผสมทั้งหมด 5 สายพันธุ์ พบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 25 ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง 85 แถบ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถจัดกลุ่มมะม่วงได้ 4 กลุ่ม โดยสายพันธุ์ ศก.0092 มีความแตกต่างมากที่สุดในกลุ่ม

คำสำคัญ: มะม่วงลูกผสม ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม

Abstract

This study aimed to study on DNA fingerprint of Thai, introduced and hybrid mango and could be selected hybrid mango from parental lines. Fifty microsatellite primer pairs were applied in this study. The experiments were studied in two set. The first set included 24 of Thai, introduced and hybrid mango. The DNA was amplified by 48 primer pairs which showed 185 polymorphic DNA bands. The DNA bands were analyzed for similarity coefficient and clustering using NTSYS pc 2.1. The genetic analysis and DNA structure were analyzed by STRUCTURE v2.3. According to the dendrogram, mango samples were divided into 7 groups. It was found that hybrid mango varieties were in the entire Nam Dokmai group. There was only one variety was not hybrid but also in Nam Dokmai group. The second set included five hybrid mango varieties. The DNA was amplified by 25 microsatellite primers which gave 85 polymorphic bands. Hybrid mango was divided into four groups and SK0092 was mostly difference.

Keywords: Hybrid mango, DNA fingerprint, Genetic analysis

6. คำนำ

มะม่วงจัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากปลูกง่าย โตเร็ว รับประทานได้ทั้งผลสุกและผลดิบ สำหรับมะม่วงในประเทศไทย มีรายงานไว้ถึง 250 สายพันธุ์ บางสายพันธุ์มีลักษณะคล้ายกัน บางสายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกัน บางสายพันธุ์อาจจะมีชื่อเรียกหลายชื่อแตกต่างกัน ตามสภาพภูมิประเทศที่เป็นแหล่งปลูก จากการที่มีชื่อเรียกแตกต่างกันก็เป็นสาเหตุให้เกิดความสับสนในการจำแนกสายพันธุ์ได้ง่าย การศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ตามหลักเกณฑ์ของ IPGRI ของมะม่วงที่รวบรวมไว้ และการวิเคราะห์ลักษณะภายนอกพบว่ามีบางลักษณะที่คล้ายคลึงกัน จึงได้จัดแบ่งกลุ่มมะม่วงพันธุ์ต่างๆ โดยศึกษาจากลักษณะทรงพุ่มต้น ใบ ช่อดอก และผล โดยใช้ลักษณะใบและทรงผลเป็นหลัก และลักษณะอื่นๆ เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถจำแนกกลุ่มได้เป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแก้ว กลุ่มเขียวเสวย กลุ่มน้ำดอกไม้ กลุ่มหนังกลางวัน กลุ่มอกร่อง กลุ่มพราหมณ์ กลุ่มผลกลม และกลุ่มเบ็ดเตล็ด (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) ซึ่งการศึกษาลักษณะประจำพันธุ์โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว อาจเกิดความผิดพลาดได้ง่าย เนื่องจากลักษณะบางลักษณะแยกจากกันได้ยากหรือไม่แตกต่างกันเลย ลักษณะบางลักษณะอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ดังนั้น การทราบข้อมูลความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ เพื่อใช้สนับสนุนลักษณะทางสัณฐานวิทยา จะทำให้การจำแนกพันธุ์รวดเร็วและถูกต้องมากขึ้น การทราบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์มะม่วง โดยเฉพาะการสร้างมะม่วงพันธุ์ใหม่จากพันธุ์ลูกผสม ซึ่งต้องการพ่อแม่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก

ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษได้ดำเนินงานวิจัย การรวบรวมพันธุ์และการสร้างลูกผสมมะม่วงพันธุ์ใหม่เพื่อการส่งออก ซึ่งการดำเนินงานดังกล่าว ได้มีการผสมข้ามพันธุ์มะม่วง เพื่อสร้างมะม่วงลูกผสมและคัดเลือกให้ได้พันธุ์ใหม่ แต่เนื่องจากการขยายพันธุ์มะม่วงด้วยการเพาะเมล็ด เกิดต้นกล้าจากเมล็ดที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์มากกว่า 1 ต้น ทำให้ไม่สามารถแยกต้นกล้าลูกผสมออกจากต้นกล้าที่เป็นพันธุ์แม่ได้ และมะม่วงที่เกิดจากการเพาะเมล็ดต้องใช้ระยะเวลานานในการติดผล จึงจะทราบต้นที่เป็นลูกผสม ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการคัดเลือก จะช่วยแก้ปัญหาการแยกต้นมะม่วงลูกผสมจากต้นพ่อแม่ได้

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์ ได้แก่ มะม่วงพันธุ์/สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ไทย พันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ลูกผสม สารเคมีในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม ได้แก่ dNTP, Taq DNA polymerase, agarose ฯลฯ

- วิธีการ

1. เก็บข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆที่เก็บรวบรวมไว้ในศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ เพื่อเป็นฐานข้อมูลของมะม่วงแต่ละสายพันธุ์

2. เก็บตัวอย่างใบมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ นำมาสกัดดีเอ็นด้วยวิธี CTAB วัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ microsatellite ด้วยเครื่อง PCR ตามวิธีการของ Begun *et al.* (2012) เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด นำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตรวจสอบผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซีส ที่ความเข้มข้น 4.5% ย้อมเจลด้วยสีย้อมซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) แล้วนำไปวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจลภายใต้แสงยูวี เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน วิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ โดยบันทึกการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ จัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group arithmetic average (UPGMA) วิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์/สายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา เพื่อจัดทำเป็นฐานข้อมูลพันธุ์มะม่วงในประเทศไทย

4. เก็บใบมะม่วงลูกผสมที่ต้องการตรวจสอบมาสกัดดีเอ็นเอ คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ลูกผสม เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับพันธุ์พ่อแม่

การบันทึกข้อมูล

ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ และข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ และมะม่วงลูกผสม

เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ปี 2559 สิ้นสุด ปี 2562 รวม 4 ปี

สถานที่ ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

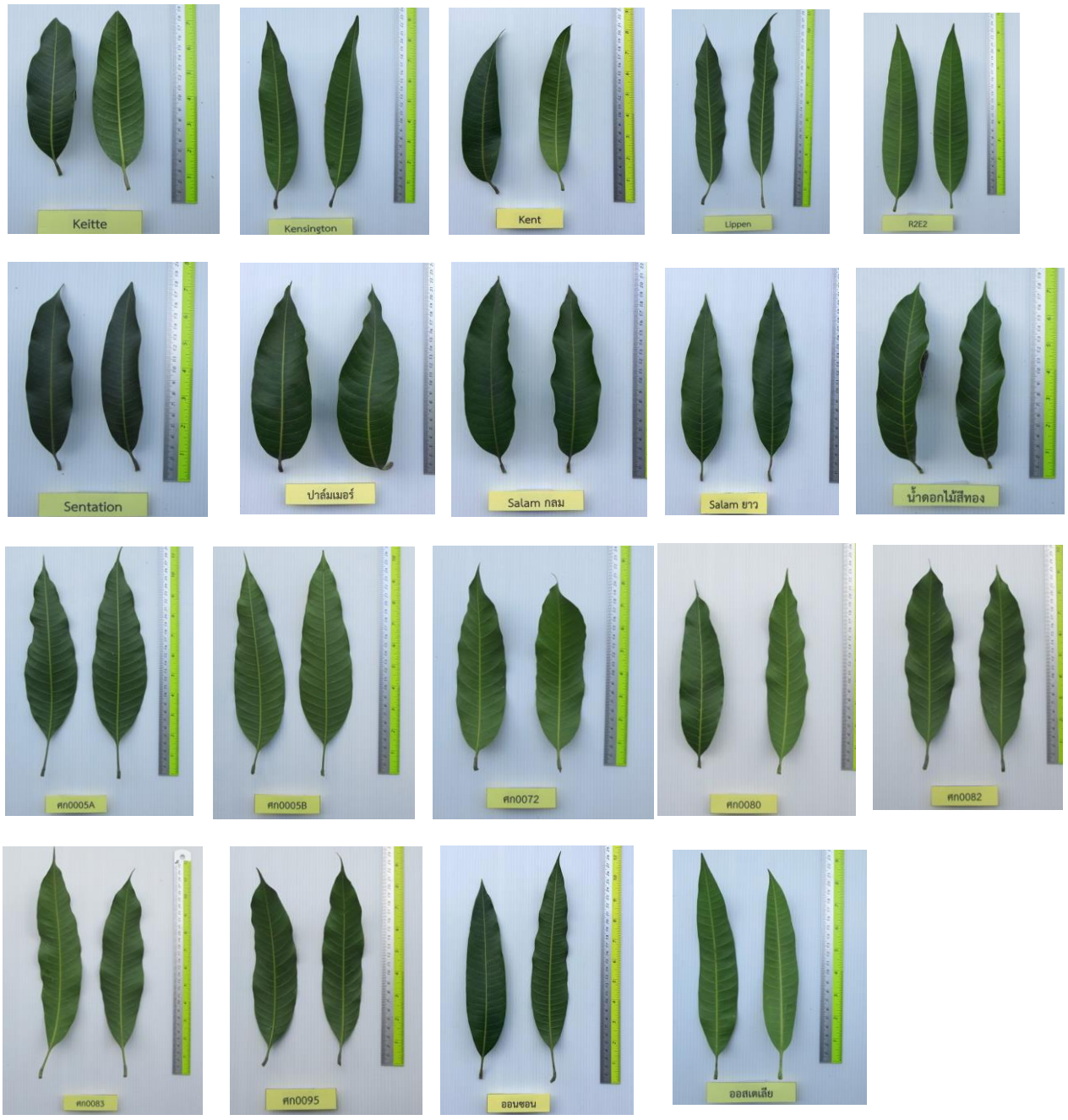
8.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาใบของมะม่วงพันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ลูกผสม

บันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาใบของมะม่วงพันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ลูกผสม ตามคู่มือการตรวจสอบลักษณะพันธุ์พืชมะม่วงสำหรับพนักงานเจ้าหน้าที่ของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช จำนวน 34 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ Keitte Kensington Kent Lippen R2E2 Senzation Palmer Salamผลกลม Salamผลยาว ศก.0005A ศก. 0005B ศก.0072 ศก.0080 ศก.0082 ศก.0083 ศก.0095 ออนซอน ออสเตรเลีย Ruby Kohrade Lahor india Brook indiaเล็ก indiaใหญ่ Duncan Betti Vilard Amabalaci YinKwe Kartha Kolomban Lata Sunset Pandian Shwehintho และ Sientalon โดยเก็บใบมะม่วงที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วด้านนอกทรงพุ่มบริเวณกลางลำต้น สายพันธุ์ละ 20 ใบ บันทึกลักษณะต่างๆของใบมะม่วง (ตารางที่ 1) ถ่ายภาพของใบมะม่วงแต่พันธุ์ (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาด้านใบของมะม่วงพันธุ์ไทย ต่างประเทศและพันธุ์ลูกผสม

ลำดับที่	สายพันธุ์	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	รูปร่างใบ	สีใบแก่	รูปร่างส่วนฐานใบ	รูปร่างส่วนปลายใบ
1	Keitte	18.6	5.8	รูปไข่	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
2	Kensington	20.0	5.1	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
3	Kent	16.8	4.2	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
4	Lippen	23.1	5.2	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
5	R2E2	19.4	4.6	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
6	Senzation	16.9	4.2	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
7	Palmer	16.8	4.7	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	สอบเรียว
8	Salamกลม	18.4	5.1	รี	เขียว	แหลม	สอบเรียว
9	Salamยาว	18.3	4.9	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	สอบเรียว
10	ศก.0005A	24.1	6.6	รี	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
11	ศก.0005B	22.8	6.3	รี	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
12	ศก.0072	21.5	5.8	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
13	ศก.0080	19.5	4.9	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
14	ศก.0082	21.5	5.5	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
15	ศก.0083	21.3	5.1	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
16	ศก.0095	25.5	6.0	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
17	ออนซอน	21.0	4.5	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
18	ออสเตรเลีย	19.5	4.4	ขอบขนาน	เขียวอมเหลือง	แหลม	สอบเรียว
19	Ruby	16.0	5.0	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	สอบเรียว
20	Kohrade	19.9	4.7	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
21	Lahor india	18.2	5.0	รี	เขียว	แหลม	สอบเรียว
22	Brook	16.7	5.1	ไข่	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
23	india เล็ก	17.5	3.6	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	สอบเรียว
24	india ใหญ่	17.8	4.5	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	สอบเรียว
25	Dundan	21.1	5.6	ไข่	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
26	Betti	15.8	3.7	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	สอบเรียว
27	Vilard Amabalaci	16.6	4.1	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	สอบเรียว
28	Yin Kwe	19.7	4.5	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
29	Kartha Kolomban	18.3	5.0	รี	เขียวอมเหลือง	แหลม	สอบเรียว
30	Lata	20.0	5.5	รี	เขียวแก่	แหลม	สอบเรียว

31	Sun Set	17.8	5.2	ไข่	เขียวแก่	แหลม	เรียวแหลม
32	Pandian	20.2	5.4	รี	เขียวแก่	แหลม	สอบเรียว
33	Shwehintho	19.0	4.7	รี	เขียว	แหลม	สอบเรียว
34	Sientalon	20.4	4.5	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	สอบเรียว



ภาพที่ 1 ลักษณะใบมะม่วงพันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ลูกผสม

8.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาใบของมะม่วงพันธุ์ไทย

เก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาใบของมะม่วง ตามคู่มือการตรวจสอบลักษณะพันธุ์พืชมะม่วงสำหรับพนักงานเจ้าหน้าที่ของสำนักคุ้มครองพันธุ์พืช จำนวน 9 พันธุ์ (ตารางที่ 2) โดยเก็บใบมะม่วงที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วด้านนอกทรงพุ่มบริเวณกลางลำต้น พันธุ์ละ 20 ใบ บันทึกลักษณะของใบมะม่วงแต่ละพันธุ์

ตารางที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาด้านใบของมะม่วงพันธุ์ไทย

ลำดับที่	พันธุ์	ความยาวใบ (ซม.)	ความกว้างใบ (ซม.)	รูปร่างใบ	สีใบแก่	รูปร่างส่วนฐานใบ	รูปร่างส่วนปลายใบ
1	ทองดำ	18.4	4.7	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
2	โอชารส	16.2	4.5	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
3	ศรีสยาม	17.9	4.1	ขอบขนาน	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
4	พญาก้อม	20.5	4.3	รี	เขียว	แหลม	สอบเรียว
5	มรกต	19.5	5.4	รี	เขียว	แหลม	เรียวแหลม
6	อกร่องสกลนคร	16.6	4.2	รี	เขียว	แหลม	สอบเรียว
7	เวียดนาม	18.4	4.9	ขอบขนาน	เขียวแก่	แหลม	สอบเรียว
8	น้ำดอกไม้ตาเลี๊ยบ	19.4	5.2	ขอบขนาน	เขียวอมเหลือง	แหลม	เรียวแหลม
9	น้ำดอกไม้สีทอง	20.4	5.2	ขอบขนาน	เขียวอมเหลือง	แหลม	เรียวแหลม

8.3 การสกัดดีเอ็นเอมะม่วงพันธุ์ไทย พันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ลูกผสม

เก็บใบอ่อนมะม่วง จำนวน 18 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์น้ำดอกไม้ น้ำดอกไม้สีทอง น้ำดอกไม้ตาเลี๊ยบ ออนซอน ศก.0005A ศก.0005B ศก.0072 ศก.0080 ศก.0082 ศก.0083 ศก.0095 Salamยาว R2E2 Kensington Aromanis Lippen Kent และ Sensation สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนมะม่วงตามวิธีการของ Fulton *et al.* (1995) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ตัดใบมะม่วงเป็นชิ้นเล็กๆ โดยตัดเส้นกลางใบออก ใส่ใบลงในโกร่ง เติม Microprep buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บดใบให้ละเอียด เติม Microprep buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติม Chloroform : Isoamyl (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วกลับหลอดไปมาเพื่อให้สารละลายเข้ากัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Chloroform : Isoamyl (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol (เย็นจัด) ปริมาตรเท่ากับส่วนใส กลับหลอดไปมาเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ให้เหลือเฉพาะส่วน

ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารส่วนบนทิ้ง ให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส กำจัดอาร์เอ็นเอด้วย RNaseA 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nucleic Acid Analyzer (Nano-200) ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะม่วงที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่พบว่า ดีเอ็นเอมะม่วง จำนวน 18 พันธุ์ มีคุณภาพค่อนข้างดี โดยมีความเข้มข้นประมาณ 1,000-4,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

8.4 การทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

(1) ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, MgCl2 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, Primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase (Promega) 1 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ (Begum *et al*., 2012) นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ (PCR product) มาทำการแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

(2) วิธีของ Kumar *et al*. (2013) ในองค์ประกอบพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 1X PCR buffer $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.015 มิลลิโมลาร์, Primer 0.5 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase (Promega) 0.5 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ (Begum *et al*., 2012) นาน 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ (PCR product) มาทำการแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

(3) วิธีของ Willams *et al*. (1990) ในองค์ประกอบพีซีอาร์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 1X PCR buffer $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.1 มิลลิโมลาร์ primer 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase (Promega) 0.5 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ (Begum *et al*., 2012) นาน 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ และ Final extension ที่

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ (PCR product) มาทำการแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

(4) วิธีของ Ravishankar *et al*. (2011) ในองค์ประกอบพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม Tris-HCL 67 มิลลิโมลาร์ $(NH_4)SO_4$ 18 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.1 มิลลิโมลาร์, primer 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase (Promega) 0.5 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ (Begum *et al*., 2012) นาน 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ (PCR product) มาทำการแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR พบว่า วิธีของ Williams *et al.* (1990) เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำการแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างชัดเจนกว่าการใช้องค์ประกอบ PCR ตามวิธีอื่นๆ หลังจากได้สภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีการดังกล่าวในมะม่วง 18 พันธุ์ โดยได้ดำเนินการในเครื่องหมาย SSR และนำไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้โพลีอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Microsatellite (Begun *et al.*, 2012) ไปแล้ว จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย SSR1 SSR2 SSR3 และ SSR8 พบว่า เครื่องหมายดังกล่าวสามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างมะม่วงได้

8.5 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ไทย พันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ลูกผสม ชุดที่ 1

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ไทยและพันธุ์ต่างประเทศ จำนวน 17 พันธุ์ ได้แก่ น้ำดอกไม้ indiaเล็ก indiaใหญ่ Salamกลม Salamยาว Kent Aroomanis น้ำดอกไม้สีทอง ออนซอน ออสเตรเลีย Keitte Kensington Senzation Lippen R2E2 อกร่องตาเปรื่อง และน้ำดอกไม้ตาเลี๊ยบ มะม่วงลูกผสมในกลุ่มน้ำดอกไม้ จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ ศก.0072 ศก.0080 ศก.0082 ศก.0083 ศก.0095 ศก.0005A ศก.0005B ดำเนินการโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Microsatellite จำนวน 50 ไพรเมอร์ พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง จำนวน 185 แถบจาก 48 ไพรเมอร์ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างจำนวน 2 แถบจาก 2 ไพรเมอร์

หลังจากนั้นจะได้นำแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากไพรเมอร์ต่างๆ นำไปวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นเจล เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน วิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ โดยบันทึกการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 1 หรือการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 0 วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรม NTSYS pc 2.1 วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient) (ภาพที่ 2) โดย

มะม่วงที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมากที่สุด คือ พันธุ์อกร่องตาเปรื่องและน้ำดอกไม้ตาเลี๊ยบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.96 หรือ 96 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนน้อยที่สุด คือ Salam ยาว และ ศก.0005A อกร่องตาเปรื่อง น้ำดอกไม้ตาเลี๊ยบ โดยมีค่าเท่ากับ 0.47 หรือ 47 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted pair group arithmetic average (UPGMA) และศึกษาโครงสร้างภายในของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม Structure v.2.3 (ภาพที่ 3) สามารถจัดกลุ่มมะม่วงเป็น 7 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม 1 ได้แก่ น้ำดอกไม้ ศก.0072 ออสเตรเลีย น้ำดอกไม้สีทอง และออนซอน

กลุ่ม 2 ได้แก่ Aroomanis ศก.0083 อกร่องตาเปรื่อง น้ำดอกไม้ตาเลี๊ยบ ศก.0080 ศก.0005A ศก.0005B ศก.0082 ศก.0095 และ Sensation

กลุ่ม 3 ได้แก่ India เล็ก และ Keitte

กลุ่ม 4 ได้แก่ Salam กลม Kensington และ R2E2

กลุ่ม 5 ได้แก่ Kent และ Lippen

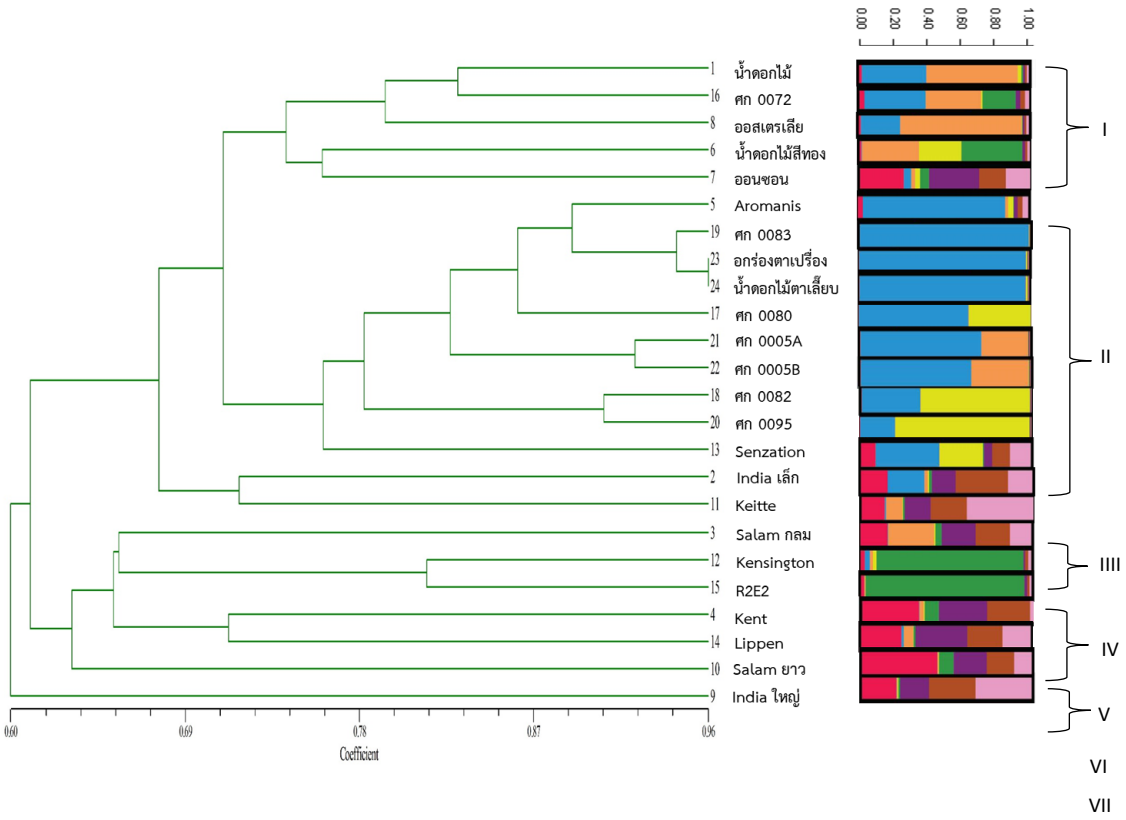
กลุ่ม 6 ได้แก่ Salam ยาว

กลุ่ม 7 ได้แก่ India ใหญ่

VAR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	1																							
2	0.74	1.00																						
3	0.70	0.66	1.00																					
4	0.66	0.60	0.66	1.00																				
5	0.76	0.71	0.58	0.54	1.00																			
6	0.78	0.64	0.70	0.72	0.64	1.00																		
7	0.73	0.66	0.67	0.69	0.70	0.76	1.00																	
8	0.81	0.68	0.73	0.64	0.74	0.71	0.69	1.00																
9	0.60	0.64	0.60	0.61	0.56	0.63	0.64	0.57	1.00															
10	0.57	0.56	0.61	0.65	0.47	0.64	0.65	0.59	0.58	1.00														
11	0.71	0.72	0.62	0.67	0.66	0.67	0.69	0.71	0.67	0.56	1.00													
12	0.70	0.69	0.68	0.67	0.62	0.75	0.73	0.66	0.64	0.61	0.68	1.00												
13	0.65	0.65	0.61	0.57	0.79	0.63	0.65	0.63	0.66	0.51	0.67	0.64	1.00											
14	0.72	0.66	0.63	0.71	0.61	0.65	0.71	0.69	0.60	0.61	0.70	0.65	0.56	1.00										
15	0.59	0.58	0.63	0.67	0.48	0.71	0.65	0.57	0.60	0.66	0.63	0.81	0.56	0.63	1.00									
16	0.83	0.70	0.69	0.74	0.74	0.79	0.76	0.77	0.63	0.63	0.72	0.73	0.64	0.76	0.65	1.00								
17	0.74	0.68	0.60	0.57	0.82	0.68	0.70	0.67	0.58	0.51	0.63	0.61	0.81	0.60	0.51	0.73	1.00							
18	0.71	0.71	0.61	0.60	0.81	0.71	0.70	0.65	0.62	0.52	0.60	0.67	0.78	0.58	0.54	0.72	0.87	1.00						
19	0.80	0.73	0.60	0.56	0.90	0.65	0.70	0.75	0.57	0.48	0.63	0.64	0.76	0.64	0.48	0.78	0.88	0.82	1.00					
20	0.71	0.66	0.63	0.63	0.78	0.72	0.70	0.64	0.59	0.55	0.60	0.66	0.78	0.59	0.55	0.71	0.84	0.90	0.78	1.00				
21	0.74	0.68	0.61	0.54	0.84	0.62	0.65	0.80	0.55	0.47	0.64	0.60	0.71	0.61	0.48	0.75	0.78	0.73	0.88	0.68	1.00			
22	0.78	0.69	0.63	0.58	0.82	0.67	0.67	0.79	0.52	0.50	0.67	0.64	0.69	0.64	0.51	0.78	0.76	0.72	0.85	0.68	0.92	1.00		
23	0.82	0.74	0.61	0.59	0.89	0.65	0.70	0.75	0.58	0.47	0.64	0.63	0.75	0.67	0.48	0.79	0.85	0.82	0.95	0.81	0.83	0.82	1.00	
24	0.78	0.70	0.57	0.57	0.88	0.64	0.70	0.72	0.56	0.47	0.63	0.60	0.76	0.66	0.48	0.78	0.88	0.80	0.94	0.78	0.83	0.83	0.96	1.00

<u>หมายเหตุ</u> 1 = น้ำดอกไม้ 2 = India เล็ก 3 = Salam กลม 4 = Kent 5 = Aroomanis
6 = น้ำดอกไม้สีทอง 7 = ออนซอน 8 = ออสเตรเลีย 9 = India ใหญ่ 10 = Salam ยาว 11 = Keitte
12 = Kensington 13 = Senzation 14 = Lippen 15 = R2E2 16 = ศก.0072 17 = ศก.0080
18 = ศก.0082 19 = ศก.0083 20 = ศก.0095 21 = ศก.005A 22 = ศก.005B 23 = อกร่องตาเปรื่อง
24 = น้ำดอกไม้ตาเลี่ยบ

ภาพที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของมะม่วง 24 พันธุ์/สายพันธุ์



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

8.5 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ลูกผสม ชุดที่ 2

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะม่วงลูกผสม ศก.0003 ศก.0005 ศก.0006 ศก.0009 และ ศก.0092 โดยหลังจากมะม่วงแตกใบอ่อนได้เก็บใบอ่อนของมะม่วงลูกผสม จำนวน 5 สายพันธุ์ นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีข้างต้นและวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nucleic Acid Analyzer (Nano-200) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์จำนวน 25 ไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจล 4.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ผลการศึกษา พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 103 แถบ และมีแถบที่เป็น Polymorphic จำนวน 85 แถบ วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ลูกผสม โดยดูจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์เทียบกันในมะม่วงแต่ละสายพันธุ์ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามวิธีการข้างต้น โดยมะม่วงที่มีค่าสัมประสิทธิ์

ความเหมือนมากที่สุด คือ ศก.0006 และศก.0009 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.806 หรือ 80.6 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนน้อยที่สุด คือ ศก.0005 และ ศก.0092 โดยมีค่าเท่ากับ 0.602 หรือ 60.2 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) หลังจากนั้นจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted pair group arithmetic average (UPGMA) และศึกษาโครงสร้างภายในของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม Structure v.2.3 (ภาพที่ 5) สามารถแบ่งกลุ่มมะม่วงลูกผสมตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ศก.0003

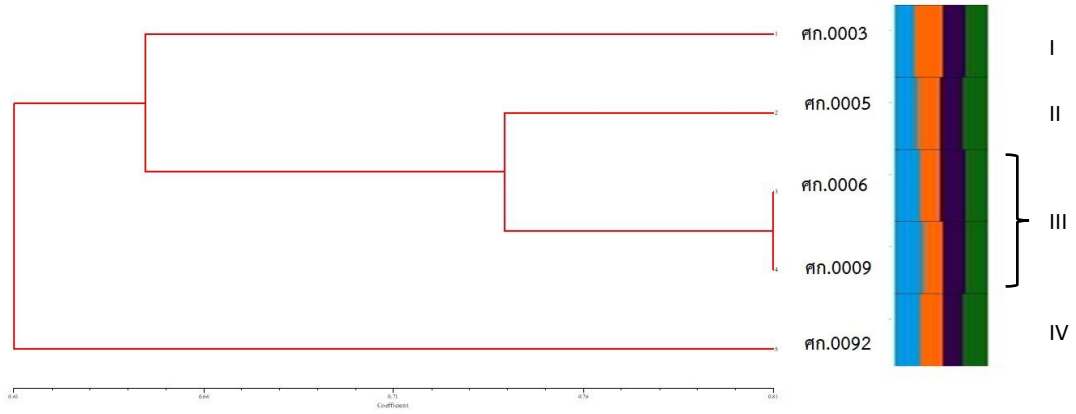
กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ศก.0005

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ศก.0006 และ ศก.0009

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ศก.0092

สายพันธุ์	ศก.0003	ศก.0005	ศก.0006	ศก.0009	ศก.0092
ศก.0003	1.000				
ศก.0005	0.680	1.000			
ศก.0006	0.650	0.699	1.000		
ศก.0009	0.612	0.777	0.806	1.000	
ศก.0092	0.612	0.602	0.631	0.612	1.000

ภาพที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของมะม่วงลูกผสม 5 สายพันธุ์



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

จากการสืบประวัติการปรับปรุงพันธุ์พบว่า มะม่วงลูกผสม 4 สายพันธุ์ คือ ศก.0003 ศก.0005 ศก.0006 และ ศก.0009 จัดอยู่ในกลุ่มมะม่วงแก้ว โดยมีประวัติพันธุ์ดังนี้

ศก.0003 เกิดจาก บุญบันดาลxศก.0007

ศก.0005 เกิดจาก ศก.0007xบุญบันดาล

ศก.0006 เกิดจาก ศก.0007xKeitt

ศก.0009 เกิดจาก ศก.0007xRuby

ผลการทดลองพบว่า มะม่วงลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ ศก.0006 และ ศก.0009 มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด เนื่องจากทั้งสองสายพันธุ์มี ศก.0007 เป็นต้นแม่ แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าทุกสายพันธุ์เป็นลูกผสมหรือไม่ เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้เทียบกับมะม่วงสายพันธุ์ ศก.0007 ดังนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยนำตัวอย่างมะม่วงที่มีประวัติการเป็นพ่อแม่พันธุ์และในกลุ่มมะม่วงแก้วมาเทียบด้วย ส่วนสายพันธุ์ ศก.0092 อยู่ในกลุ่มมะม่วงน้ำดอกไม้ ควรจะมีการนำมะม่วงกลุ่มน้ำดอกไม้มาเทียบด้วย

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้แยกความแตกต่างของมะม่วงลูกผสมแต่ละคู่ผสม โดยการทดสอบในพันธุ์พ่อแม่ สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้แยกความแตกต่างของมะม่วงแต่ละคู่ผสมได้ ซึ่งจะได้ทดสอบไพรเมอร์เหล่านี้ในมะม่วงลูกผสมคู่ต่างๆ ต่อไป

1. Lippen × ศก.0083 จำนวน 1 ไพรเมอร์
2. น้ำดอกไม้ตาเลี๊ยบ × ศก.0095 จำนวน 2 ไพรเมอร์
3. ศก.0083 × Salam ยาว จำนวน 1 ไพรเมอร์
4. ศก.0080 × Kent จำนวน 7 ไพรเมอร์
5. น้ำดอกไม้สีทอง × Salam ยาว จำนวน 21 ไพรเมอร์
6. ศก.0080 × Lippen จำนวน 8 ไพรเมอร์
7. ศก.0082 × Kensington จำนวน 8 ไพรเมอร์
8. ศก.0080 x R2E2 จำนวน 8 ไพรเมอร์
9. น้ำดอกไม้สีทอง x R2E2 จำนวน 21 ไพรเมอร์
10. น้ำดอกไม้สีทอง x Salam ยาว จำนวน 20 ไพรเมอร์
11. ศก.0072 x Sensation จำนวน 7 ไพรเมอร์
12. ศก.0083 x Kensington จำนวน 1 ไพรเมอร์
13. R2E2 x น้ำดอกไม้สีทอง จำนวน 21 ไพรเมอร์

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ไทย พันธุ์ต่างประเทศ และพันธุ์ลูกผสม ดำเนินการในมะม่วงจำนวน 29 พันธุ์/สายพันธุ์ แบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ประกอบด้วย มะม่วงพันธุ์ไทยกลุ่มน้ำดอกไม้ มะม่วงต่างประเทศ และมะม่วงลูกผสมที่มีลักษณะคล้ายน้ำดอกไม้ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งกลุ่มมะม่วงได้เป็น 7 กลุ่ม โดยพบว่า มะม่วงลูกผสม 5 สายพันธุ์ มีความเป็นลูกผสมของมะม่วงน้ำดอกไม้ ยกเว้น ศก.0083 ซึ่งมีความเหมือนมะม่วงน้ำดอกไม้ตาเลี๊ยบและอกร่องตาเปรื่อง 94 และ 93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงไม่จัดเป็นลูกผสม การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงชุดที่ 2 ซึ่งเป็นมะม่วงลูกผสมในกลุ่มแก้ว และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม โดย ศก.0006 และ ศก.0009 มีความเหมือนกันมากที่สุดโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนสูงสุดจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำมะม่วงที่มีประวัติเป็นพ่อแม่พันธุ์มาศึกษาร่วมด้วย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ ที่เป็นพันธุ์พ่อแม่และข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงลูกผสม สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในคัดเลือกมะม่วงลูกผสมและการปรับปรุงพันธุ์มะม่วง

11.คำชี้แจง -

12. เอกสารอ้างอิง

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ. 2546. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืช: มะม่วง เล่ม 2. กรมวิชาการเกษตร, จตุจักร, กรุงเทพ.

Begun, H., M.T. Reddy, S. Malathi, B.P. Reddy, S. Arcahk, J. Nagaraju and E.A. Siddiq. 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 Aus. J. of Plant Sci and Biotech 6(1): 24-37.

Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plant Mol. Biol. Rep. 13(3): 207-209.

Kumar, M., V. Ponnuswami, P. Nagarajan, P. Jeyakumar and N. Senthi. 2013. Molecular characterization of ten mango cultivars using simple sequences repeat (SSR) markers. African J. of Biotech. 12(47): 6568-6573.

Ravishankar ,K.V., B.M.H. Reddy, L. Anand and M.R. Dinesh. 2011. Development of new microsatellite markers from Mango (*Mangifera indic*a) and cross-species amplifi cation. Americ. J. Bot. 98: e96-e99.

Williams, J.G.K., A.Kubbelik, K.J. Livak, J.A. Rafiski and S.V. Tinjey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.