บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของสายต้นมะม่วงเขียวมรกตแต่ละสายต้น โดยการสังเกต และวัดค่าต่างๆ พบลักษณะทั้งที่เป็นความแปรปรวนระหว่างสายต้น และความแปรปรวนภายในสายต้น กล่าวคือ ในลักษณะหนึ่งๆ พบว่ามีค่าที่แตกต่างกันมาก หรือมีหลายรูปแบบ นอกจากนี้ยังพบลักษณะทางคุณภาพที่ไม่มีความแปรปรวนภายในและระหว่างสายต้น (พบลักษณะเดียว) ได้แก่ รูปทรงต้น มุมกิ่ง เปลือกลำต้น สีของก้านช่อดอก รูปทรงใบ รูปร่างผล และรูปร่างเมื่อมองจากด้านข้างผล โพรงที่ขั้วผล ส่วนลักษณะทางคุณภาพที่พบความแปรปรวนภายในสายต้น ได้แก่ รูปทรงช่อดอก การติดของขั้วผล ไหล่ผลด้านหลัง ไหล่ผลด้านอก จะงอยผล ฐานผล ส่วนเว้าผล รูปร่างของปลายผลเมื่อมองจากด้านหน้าผล

ลักษณะทางปริมาณที่พบว่าสายต้นส่วนใหญ่มีความแปรปรวนภายในสายต้นค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับความแปรปรวนระหว่างสายต้น เช่น ความเหนียวขั้วผล ค่า TSS ผลดิบและผลสุก ค่า TTA ผลดิบและผลสุก ซึ่งถือเป็นลักษณะเฉพาะที่ชัดเจนของแต่ละสายต้น แต่พบว่าในระหว่าง 2 ปีที่ทำการบันทึกผล บางลักษณะให้ผลไม่เป็นไปในทางเดียวกัน เช่น ความแน่นเนื้อผลดิบในปี พ.ศ. 2548 มีความแปรปรวนภายในสายต้นค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับความแปรปรวนระหว่างสายต้น แต่ในปี พ.ศ. 2549 พบว่ามีความแปรปรวนระหว่างสายต้นต่ำ

ลักษณะทางปริมาณที่มีค่าความแปรปรวนภายในสายต้นค่อนข้างสูง เช่น ค่าความสว่างของสี ค่าความเข้มของสีและค่าองศาของสีเปลือกผลสุกส่วนหัวและส่วนกลางผล ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสายต้น จำนวนหรือสัดส่วนของดอกมีความแปรปรวนในสายต้นค่อนข้างมาก อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของอุณหภูมิเข้ามาเกี่ยวข้องและยังเกี่ยวข้องกับการบานของดอก (ปฐมา, 2543) ส่วนสีเปลือกของผลดิบแก่จัด ซึ่งสามารถจัดกลุ่มได้โดยการสังเกตเป็น 2 กลุ่ม คือ สีเปลือกของผลสีเขียวเข้มและสีเขียวอ่อน อย่างไรก็ตามเมื่อนำตัวอย่างผลมาวัดค่าของสีด้วยเครื่อง chroma meter พบว่า มีความแปรปรวนภายในสายต้นสูง นอกจากนั้นแล้วสีเปลือกของผลยังขึ้นอยู่กับตำแหน่งของผลในทรงพุ่มด้วย

สำหรับลักษณะอื่นๆ ที่ไม่สามารถนำมาใช้ในการนำมาใช้ในการจำแนกสายต้นมะม่วงเขียวมรกตสายต้นคัดในครั้งนี้ ได้แก่ ลักษณะทรงพุ่มต้น ความสูง และความกว้างทรงพุ่มของต้น เนื่องจากมีการตัดแต่งกิ่งหลังการเก็บเกี่ยวทุกปี ทำให้ลักษณะของต้นไม่เป็นไปตามธรรมชาติ

ในการจำแนกสายต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานที่ไม่มีความแปรปรวนในสายต้น แต่มีความแปรปรวนระหว่างสายต้น ซึ่งพบว่าลักษณะที่เหมาะสมและเลือกใช้เพื่อการจำแนกมะม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เขียวมรกตสายต้นคัดคือ สีเปลือกของผลดิบแก่จัดซึ่งจัดกลุ่มโดยการสังเกต แต่การใช้ลักษณะทางสัณฐานเพียงลักษณะเดียวในการจำแนกสายต้นนั้นอาจทำให้การจัดจำแนกได้ข้อมูลที่เป็นการจัดกลุ่มที่กว้างเกินไป จึงได้นำกลุ่มน้ำหนักผลและลักษณะผลซึ่งเป็นอัตราส่วนความกว้างต่อความหนาผลมาพิจารณาร่วม เนื่องจาก สมมติฐานแรกที่กลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกมะม่วงเขียวมรกต อ. บ้านโฮ่ง จ. ลำพูน พิจารณาเห็นถึงความแตกต่างของมะม่วงเขียวมรกตที่ปลูกในบางต้นที่ต่างจากต้นอื่น คือ สีเปลือกของผลมีสีเขียวเข้ม หรือเขียวอ่อน ผลมีขนาดใหญ่หรือเล็ก ผลมีลักษณะกลมหรือแบน แต่ลักษณะผลกลมหรือแบนไม่มีสิ่งที่ใช้เป็นบรรทัดฐานในการระบุลักษณะ จึงได้นำอัตราส่วนความกว้างต่อความหนาผลที่บ่งบอกถึงลักษณะรูปหน้าตัดผลตามขวางของมะม่วงมาเป็นดัชนีชี้ความแตกต่างของลักษณะดังกล่าว โดยกำหนดค่าอัตราส่วนความกว้างต่อความหนาผลคือ หากมากกว่า 1.15 ขึ้นไปคือผลแบน และน้อยกว่า 1.15 คือผลกลม

จากการใช้ลักษณะทางสัณฐานจำแนกสายต้นมะม่วงเขียวมรกต พบว่าลักษณะสีเปลือกผลดิบแก่จัดสามารถแบ่งกลุ่มมะม่วงเขียวมรกตจำนวน 20 สายต้นออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มน้ำหนักผลสามารถแบ่งกลุ่มมะม่วงเขียวมรกตออกได้เป็น 2 กลุ่ม และสัดส่วนความกว้างต่อความหนาผลสามารถแบ่งกลุ่มมะม่วงเขียวมรกตออกได้เป็น 2 กลุ่มเช่นกัน แต่เมื่อใช้ลักษณะทางสัณฐานทั้ง 3 มาประกอบกันในการแบ่งกลุ่มมะม่วงเขียวมรกต พบว่า สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 สายต้น และ 6 กลุ่ม ในปี พ.ศ. 2548 และ 1 สายต้น กับ 5 กลุ่ม ในปี พ.ศ. 2549

ลักษณะเด่นของมะม่วงเขียวมรกต คือ ผลของมะม่วงเขียวมรกตสามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่เหี่ยวเฉาและเนื้อไม่ฟ่าม ซึ่งความแน่นเนื้อของผลดิบแก่จัดพบว่ามีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับมะม่วงพันธุ์อื่น โดยมะม่วงเขียวมรกตมีความแน่นเนื้อของผลดิบแก่จัดเฉลี่ย 12.20 และ 8.85 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตรในปี พ.ศ. 2548 และ พ.ศ. 2549 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับมะม่วงแก้วที่พบว่ามีความแน่นเนื้อโดยเฉลี่ย 3.6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (ปฐมา, 2543) ซึ่งลักษณะเนื้อแน่นกรอบ ไม่เละ เป็นลักษณะดีที่โรงงานแปรรูปมะม่วงต้องการ (ธวัชชัย และคณะ, 2546) ส่วนผลสุกพบว่ามีค่าความแน่นเนื้อสูง (0.49 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร) รวมทั้งมีรสหวาน (22.23 องศาบริกซ์) จึงเหมาะแก่การบริโภคสดและแปรรูปเป็นมะม่วงหั่นชิ้นเพราะเนื้อไม่เละ นอกจากนี้ยังพบว่ามะม่วงเขียวมรกตมีความเหนียวขั้วผลเฉลี่ย 4.29 และ 4.27 กิโลกรัม ในปี 2548 และ 2549 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับมะม่วงแก้วที่มีความเหนียวขั้วผล 3.4 กิโลกรัม (ปฐมา, 2543) พบว่ามีค่าโดยเฉลี่ยสูงกว่า ประกอบกับมะม่วงเขียวมรกตที่เก็บข้อมูลได้ไม่ปรากฏโพรงที่ขั้วผลจึงน่าจะทำให้มะม่วงเขียวมรกตสามารถแขวนผลบนต้นได้นานเมื่อแก่เต็มที่ และไม่ร่วงหล่นง่ายเมื่อมีฝนตกหรือลมแรง จึงช่วยลดความเสียหายที่เกิดกับผลผลิตได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ช่วงระยะของการติดดอกของมะม่วงเขียวมรกตใกล้เคียงกับมะม่วงพันธุ์อื่นคือ ช่วงเดือนธันวาคมถึงมกราคม และทำการเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงต้นเดือนกันยายน สอดคล้องกับเสกสรร (2543) ที่กล่าวว่า มะม่วงพันธุ์เขียวมรกตเป็นมะม่วงที่ออกดอกติดผลประมาณเดือนธันวาคมถึงมกราคม และเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม ซึ่งจัดเป็นมะม่วงล่าฤดู ทำให้ผลผลิตขายได้ราคาดี (ยิ่งศักดิ์, 2545) ดังนั้นมะม่วงเขียวมรกตจึงเป็นมะม่วงพันธุ์ที่ควรมีการสนับสนุนให้เกษตรกรปลูก

การทดสอบจำนวนต้นกล้าต่อเมล็ดของมะม่วงเขียวมรกต จากการสุ่มนำเมล็ดของแต่ละสายต้นมาเพาะกล้าพบว่าเมล็ดที่เพาะให้ต้นกล้า 1 ต้นต่อเมล็ดทุกสายต้น แสดงว่ามะม่วงเขียวมรกตจัดอยู่ในกลุ่มมะม่วงกลุ่มอินเดีย ซึ่งมีลักษณะเด่น คือ เมล็ดที่เพาะให้ต้นกล้า 1 ต้นต่อเมล็ด ต้นกล้านั้นจะเกิดจากการปฏิสนธิระหว่างต้นพ่อกับต้นแม่ มีชื่อเรียกตามลักษณะการเกิดว่า zygotic หรือ gametic seedling (เกศิณี, 2530) ทำให้ต้นกล้าที่ได้นั้นกลายพันธุ์ไม่ตรงกับต้นแม่

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของมะม่วงเขียวมรกตด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี พบว่าการสกัดด้วยวิธี Doyle and Doyle (1990) ประยุกต์โดยอุไรวรรณ (2540) หลังจากการตกตะกอนด้วย Isopropanol ที่เย็นและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วตะกอนที่ได้มีลักษณะเป็นวุ้นใสเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 1% agarose gel พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่คมชัด มีปริมาณน้อยและมีการปนเปื้อนมาก ดีเอ็นเอเริ่มต้นที่สกัดได้มักรวมอยู่กับอาร์เอ็นเอ โปรตีน โพลีแซคคาไรด์ แทนนินและรงควัตถุ การปนเปื้อนที่พบในวิธีการนี้อาจเนื่องมาจากไม่มีขั้นตอนของการสกัดด้วย phenol หรือ chloroform ซึ่งช่วยในการกำจัดโปรตีน (Daneshwarp and Khoyratty, 2004) และไม่มีการกำจัดอาร์เอ็นเอซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้ RNase A (Daneshwarp and Khoyratty, 2004) ลักษณะของวุ้นใสมักเป็นการปนเปื้อนของโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นปัญหาและยากแก่การกำจัด (Scott and Playford, 1996) เนื่องจากโพลีแซคคาไรด์สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Wilkie *et al.,* 1993) และทำให้การเข้าคู่ของดีเอ็นเอผิดพลาด (Merlo และ Kemp, 1976) และในวิธีการนี้มี NaCl ใน extraction buffer เข้มข้นเพียง 250 mM อาจเป็นผลให้ดีเอ็นเอที่ได้ไม่สะอาด และแถบดีเอ็นเอไม่คมชัด

ส่วนวิธีการ SDS Extraction พบว่าตะกอนที่ได้มีสีส้มแดง ซึ่งต่างจากอีกสองวิธีที่ตะกอนมีสีเหลืองอ่อนเท่านั้น และเมื่อนำไปตรวจสอบไม่พบแถบดีเอ็นเอ พบเฉพาะแถบที่คาดว่าน่าจะเป็นอาร์เอ็นเอ ส่วนวิธีการสุดท้ายคือการนำวิธี Doyle and Doyle, 1987 มาประยุกต์ พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีขึ้น โดยแถบดีเอ็นเอมีความคมชัดขึ้น และมีส่วนปนเปื้อนลดลง ตะกอนที่ได้จากการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สกัดมีวุ้นและสารละลายเหนียวลดลง อาจเนื่องมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl เป็น 1.4 M ซึ่งความเข้มข้นของ Nacl มีส่วนช่วยกำจัดโพลีแซคคาไรด์ให้แยกออกจากดีเอ็นเอได้ดีขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ให้สูงกว่า 0.5 M ร่วมกับการใช้ CTAB สามารถแยกโพลีแซคคาไรด์ออกไปโดยโพลีแซคคาไรด์และโปรตีนถูกเร่งให้เป็นองค์ประกอบเชิงซ้อนของเกลือ (Wattier *et al*., 2000) จึงมีกาใช้ NaCl ใน extraction buffer ตั้งแต่ 0.7 M (Clark, 1997) จนถึง 6 M (Aljanabi *et al*., 1999) ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ซึ่งบางกรณีมีการใช้ NaCl ร่วมกับ KCl (Thompson and Henry, 1995) นอกจากนั้นในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอออกมาจากเนื้อเยื่อ มีการประยุกต์โดยเติม PVP ซึ่งมีคุณสมบัติในการแยกดีเอ็นเอออกจากสารประกอบฟีนอลได้ (phenolic compound) สอดคล้องกับศักดิ์ชัยและคณะ (ไม่ระบุปี) ที่กล่าวว่า การเพิ่ม 2% PVP ใน extraction buffer สามารถช่วยกำจัดสารประกอบฟีนอลออกจากตัวอย่างได้ จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากขึ้น แถบดีเอ็นเอจึงคมชัดขึ้น นอกจากนี้ในขั้นตอนการล้างตะกอนยังได้มีการเพิ่ม 10 mM NH_4OAc เข้ากับ Ethanol ด้วยจึงทำให้ตะกอนที่ได้สะอาดขึ้น

การเปรียบเทียบอายุของใบมะม่วงที่เหมาะสมในการนำมาสกัดดีเอ็นเอ เมื่อนำใบอ่อนมะม่วง 3 ระยะ คือ อายุ 7, 12, และ 20 วันนับจากวันที่เริ่มแทงยอดอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอด้วยการประยุกต์วิธีการของ Doyle and Doyle (1987) พบว่าใบอ่อนอายุ 20 วัน ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากและค่อนข้างสะอาดกว่าใบอ่อนอายุ 7 และ 12 วัน นอกจากนี้วุ้นใสที่ถูกเหวี่ยงลงมาปะปนกับตะกอนของดีเอ็นเอนั้น พบว่าในใบอ่อนที่มีอายุ 7 และ 12 วัน มีปริมาณมากกว่าใบอ่อนอายุ 20 วัน ตามลำดับ จึงได้เลือกนำใบอ่อนมะม่วงเขียวมรกตสายต้นคัดทั้ง 20 สายต้น ที่มีอายุประมาณ 20 วัน นับจากวันที่เริ่มแทงยอดอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอด้วยการประยุกต์วิธีการของ Doyle and Doyle (1987)

หลังจากได้ดีเอ็นเอของมะม่วงเขียวมรกตสายต้นคัดทั้ง 20 สายต้นแล้ว จึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ *E*-A และ *M*-C ในขั้นตอน preselective amplification หลังจากนั้นในขั้นตอน selective amplification พบว่าการนำผลผลิต PCR จากขั้นตอน preselective amplification มาเจือจาง 20 เท่า ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คมชัดที่สุดเมื่อเทียบกับการเจือจาง 5 และ 10 เท่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นในปฏิกิริยาที่มากเกินไป จึงทำให้ได้ผลผลิต PCR น้อย เนื่องจากในขั้นตอนหลังจากทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแล้วลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์เข้ามาจับกับดีเอ็นเอ หากดีเอ็นเอต้นแบบมีปริมาณมากเกินไปอาจเกิดการคืนสภาพกลับมาจับตัวเองเป็นเกลียวคู่ใหม่ จึงขัดขวางการจับของไพรเมอร์ โดยเฉพาะดีเอ็นเอที่มีชุดซ้ำจำนวนมากจะกลับมาจับตัวกันได้รวดเร็ว (สุรินทร์, 2545) เมื่อนำผลผลิต PCR จากขั้นตอน preselective amplification ที่เจือจาง 20 เท่าไปตรวจสอบความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 55 – 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งยังอยู่ในช่วงความเข้มข้นของดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอ็นเอที่เหมาะสมต่อการทำ PCR โดยสุรินทร์ (2545) กล่าวว่าปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ใช้ในการทำ PCR ใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม แต่อย่างไรก็ตามการทำ AFLP โดยมาตรฐานแล้วมักใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา (Lin and Kuo, 1995) นอกจากนี้ในการทดลองของ Briard *et al.,* (2000) พบว่า ในการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก rapid carrot ความเข้มข้น 10-60 นาโนกรัม มาใช้ในการทำ AFLP ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนมากแต่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอในช่วง 5-160 นาโนกรัมยังให้ผลผลิต AFLP ที่มีคุณภาพอยู่

การทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ในขั้นตอนการทำ selective amplification โดยทดสอบคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ กับตัวอย่างดีเอ็นเอมะม่วง 1 ตัวอย่าง แล้วตรวจสอบผลผลิตด้วย 2% agarose gel พบว่ามีคู่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีจำนวน 1 คู่ และคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มี 63 คู่ โดยมี 30 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และคาดว่ามี polymorphic bands มาก สังเกตได้จากช่วงของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันเมื่อตรวจสอบเพิ่มเติมด้วย polyacrylamide gel ซึ่งมีความสามารถในการแยกแถบดีเอ็นเอที่ขนาดใกล้เคียงกันได้ดีกว่า พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้รูปแบบของแถบต่างกัน จึงเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และชัดเจนไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงเขียวมรกตจำนวน 22 คู่ไพรเมอร์

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะม่วงเขียวมรกตสายต้นคัด 20 สายต้นด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ 22 คู่ พบว่ามีเพียง 8 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบจำนวนมากชัดเจน มีรูปแบบที่แตกต่าง โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอ 10-28 แถบ รวมมีเครื่องหมายทั้งสิ้น 146 แถบ แถบที่เป็น polymorphic marker 125 แถบ คิดเป็น 85.6 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด ซึ่งเห็นได้ว่าเป็นระดับ polymorphism ที่ค่อนข้างสูงในทุกไพรเมอร์ แสดงให้เห็นว่ามะม่วงเขียวมรกตสายต้นคัดมีความหลากหลายสูง แม้ว่าจะเป็นพืชที่มีการขยายพันธุ์ (เชิงการค้า) แบบไม่อาศัยเพศ และมาจากพื้นที่ปลูกเดียวกัน จึงมีโอกาสที่จะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อจำแนกลักษณะร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงเขียวมรกต ที่ได้จากเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่มาเปรียบเทียบกับลักษณะที่จัดโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 2 กลุ่ม คือ สีเปลือกสีเขียวเข้มและสีเขียวอ่อน พบว่ามีแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สอดคล้องกับลักษณะของสีเปลือกผลดิบแก่จัด คือ การใช้ คู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTA เกิดแถบขนาด 297 bp ปรากฏเฉพาะในกลุ่มของมะม่วงเขียวมรกตเปลือกผลสีเขียวเข้ม 80 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่ม ส่วนในกลุ่มของมะม่วงเขียวมรกตเปลือกผลสีเขียวอ่อนปรากฏแถบ 2 แถบ และไม่ปรากฏแถบ 8 ตัวอย่าง (80 ของกลุ่มสีเขียวอ่อน) คู่ไพรเมอร์ E-AAG/M-CAC เกิดแถบขนาด 386 bp ปรากฏในกลุ่มของมะม่วงเขียวมรกตเปลือกผลสีเขียวเข้ม 6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวอย่าง คิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มสีเขียวเข้ม ส่วนในกลุ่มของมะม่วงเขียวมรกตเปลือกผลสีเขียวอ่อนปรากฏแถบ 1 ตัวอย่าง และไม่ปรากฏแถบ 9 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มสีเขียวอ่อน ส่วนการใช้คู่ไพรเมอร์ E-AGA/M-CAT พบแถบดีเอ็นเอขนาด 571 bp และ 506 bp ปรากฏในกลุ่มของมะม่วงเขียวมรกตเปลือกผลสีเขียวเข้ม 9 และ 7 ตัวอย่างตามลำดับ จากทั้งหมด 10 ตัวอย่างคิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับของกลุ่มที่ทดสอบ ส่วนในกลุ่มของมะม่วงเขียวมรกตเปลือกผลสีเขียวอ่อนไม่ปรากฏแถบเลยทั้งสองตำแหน่ง และจากการใช้คู่ไพรเมอร์ E-ATG/M-CTC พบแถบดีเอ็นเอขนาด 448 bp ปรากฏในกลุ่มของมะม่วงเขียวมรกตเปลือกผลสีเขียวเข้ม 5 ตัวอย่างจากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ส่วนในกลุ่มของมะม่วงเขียวมรกตเปลือกผลสีเขียวอ่อนไม่ปรากฏแถบเลย ซึ่งลักษณะสีเปลือกของผลดิบแก่จัดเป็นลักษณะที่ให้ผลการจัดกลุ่มเหมือนกันทั้ง 2 ปีที่เก็บข้อมูล เมื่อพิจารณาร่วมกับแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมาย AFLP พบว่ามีแถบดีเอ็นเอหลายขนาดจากต่างคู่ไพรเมอร์ที่สัมพันธ์กับลักษณะสีเปลือก จึงอาจใช้เป็นเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะดังกล่าวได้ การปรากฏแถบจำเพาะที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐาน มีประโยชน์ต่องานปรับปรุงพันธุ์ โดยสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการคัดเลือกลูกผสม (marker assisted selection) ซึ่งมีลักษณะตามต้องการ โดยคัดเลือกในระยะที่ลักษณะนั้นยังไม่ปรากฏได้

ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะม่วงเขียวมรกต ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ เมื่อบันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” สำหรับการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” เมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงเขียวมรกตทั้ง 20 สายต้น ด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.01d พบว่าสามารถแยกสายต้นมะม่วงเขียวมรกตได้ 18 สายต้น และสามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ที่ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.49 ขึ้นไป ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และ 4 กลุ่มย่อย คือ

กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 11 สายต้น ได้แก่ KM1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 15 และ 20
ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อยได้แก่
1.1 มีจำนวน 6 สายต้น ได้แก่ KM1, 4, 6, 10, 15 และ 20
1.2 มีจำนวน 5 สายต้น ได้แก่ KM5, 7, 8, 11 และ 13

กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 9 สายต้น ได้แก่ KM2, 3, 9, 12, 14, 16, 17, 18 และ 19
ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อยได้แก่
2.1 มีจำนวน 3 สายต้น ได้แก่ KM2, 9 และ 16
2.2 มีจำนวน 6 สายต้น ได้แก่ KM3, 12, 14, 17, 18 และ 19

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มะม่วงเขียวมรกตที่จำแนกได้นี้ไม่สอดคล้องกับกลุ่มที่จัดได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 3 ลักษณะ แต่เมื่อพิจารณาภายในกลุ่มพบว่า มีลักษณะสีเปลือกของผลดิบแก่จัดที่คล้ายกันคือ กลุ่มที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย 11 สายต้น พบว่ามีลักษณะสีเปลือกของผลสีเขียวเข้ม 7 สายต้น คิดเป็น 63.63 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่ม และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 9 สายต้น มีลักษณะสีเปลือกของผล สีเขียวอ่อน 6 สายต้น คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่ม และกลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วย 6 สายต้น มีลักษณะสีเปลือกของผลสีเขียวอ่อน 5 สายต้น คิดเป็น 83.33 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่ม แม้ว่าแต่ละสายต้นจะมีแบบแผนดีเอ็นเอที่ต่างกันเนื่องจากฐานพันธุกรรมที่ต่างกัน แต่เมื่อจัดกลุ่มแล้วพบว่าสมาชิกส่วนใหญ่มีลักษณะที่สัมพันธ์กันในกรอบการศึกษาครั้งนี้ 1 ลักษณะ

มะม่วงเขียวมรกตที่จัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปี พ.ศ. 2548 และ พ.ศ. 2549 ให้ผลต่างกัน เนื่องจากมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยมาก สังเกตได้จากความแตกต่างของข้อมูลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่บันทึกได้ทั้งสองปีให้ผลแตกต่างกัน ซึ่งการตรวจสอบพันธุ์พืชแต่ดั้งเดิมใช้สังเกตจากลักษณะภายนอก แต่วิธีการแยกแบบนี้มีข้อจำกัดหลายอย่าง ดังนั้นการใช้วิธีการจำแนกอื่นๆ มาประกอบจึงช่วยให้ผลการวิเคราะห์แม่นยำขึ้น เช่น การใช้เทคนิค AFLP จำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Collectotrichum* sp. เชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในอัลฟัลฟ่า เนื่องจากไม่สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ เพราะมีลักษณะคาบเกี่ยวกันระหว่าง *C. trifolii* และ *C. gloeosporioides* พบว่า Arl-Nw และ 57RR คือ *C. trifolii* และ *C. gloeosporioides* ตามลำดับ (O'Neil *et al.,* 1997) สอดคล้องกับ การศึกษา subspecies ใหม่ของเฟิร์นชื่อ *Pteridium aquilinum* subspecies *altanticum* ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1989 พบว่าการอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ สภาพแวดล้อม และลักษณะของดินในการเจริญเติบโตผลที่ได้มีความไม่แน่นอน แต่การจัดกลุ่มโดยอาศัยการวิเคราะห์ไอโซไซม์ให้ผลที่ชัดเจนกว่า (Ashcroft and Sheffield, 1999) การใช้เทคนิคทางด้านการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA จึงถูกนำมาใช้โดยเฉพาะเทคนิค AFLP เพราะเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบและแยกชนิดของพืชได้ค่อนข้างแม่นยำมากกว่าวิธี RFLP และ RAPD ทำได้รวดเร็วและตรวจสอบได้ในทุกระยะของพืช นอกจากนี้ยังสามารถใช้ข้อมูลลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการทำ AFLP มาใช้ในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืชได้อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved