Thai Science and Technology Journal Vol. 34 No. 5 September–October 2026 ISSN 3027-6365 (Online)

Thai Science and Technology Journal
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
Journal Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj

การประเมินความเป็นลูกผสมของมะม่วงลูกผสมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์
Assessment of Hybrid Identification in Mango Progenies Using SSR Markers

ศุภรัตน์ ศรีทะวงษ์[1*] เกวลี จันทะโพธิ์[2] ประภาพร ฉันทานุมัติ[1] อุทัยวรรณ ทรัพย์แก้ว[3] รัชนี ศิริยาน[4] และ จีรภา ออสติน[1]

[1]*ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ต.หนองไผ่ อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ 33000*

[2]*ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 2 กรมวิชาการเกษตร อ.เมือง จ.พิจิตร 66000*

[3]*ศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัย อ.ศรีสัชนาลัย จ.สุโขทัย 64190*

[4]*สถาบันวิจัยพืชสวน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900*

Suparat Srithawong[1*] Kewalee Jantapo[2] Prapaporn Chantanumat[1] Uthaiwan Sapkaew[3] Ratchanee Siriyan[4] and Jirapa Austin[1]

[1]*Si Sa Ket Horticultural Research Center, Nong Phai, Mueang Si Sa Ket, Si Sa Ket 33000*

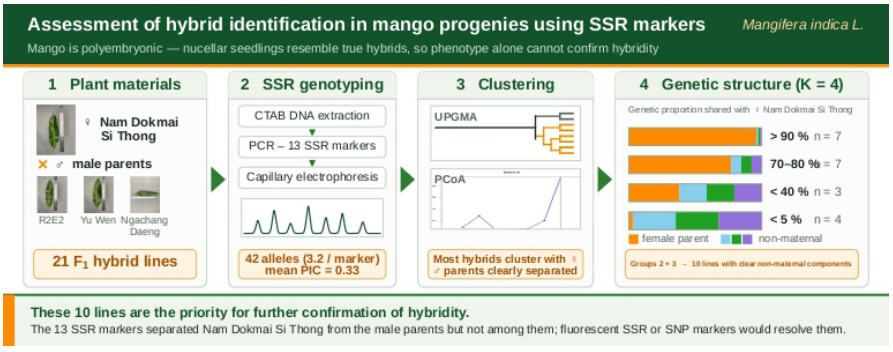
[2]*Phichit Agricultural Research and Development Center, Office of Agricultural Research and Development Region 2, Department of Agriculture, Mueang Phichit, Phichit 66000*

[3]*Sukhothai Horticultural Research Center, Si Satchanalai, Sukhothai 64190*

[4]*Horticultural Research Institute, Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900*

Received

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Nam Dokmai Si Thong is a mango cultivar known for its desirable flavor and high economic value in Thailand. However, the breeding of true hybrids is challenging because mango is polyembryonic, meaning that seedlings arising from maternal nucellar tissue can resemble true hybrids morphologically. Molecular markers can therefore improve selection accuracy and shorten the breeding process. This study used 13 simple sequence repeat (SSR) markers to examine 21 progenies derived from crosses between Nam Dokmai Si Thong (female parent) and three male parents: R2E2, Yu Wen, and Ngachang Daeng. A total of 24 alleles were detected, with 1-3 alleles per locus. The mean observed heterozygosity, expected heterozygosity and polymorphic information content (PIC) were 0.245, 0.226, and 0.183, respectively. A parentage exclusion test based on loci at which the male parents carried paternal-specific alleles revealed that two-thirds of the progenies (14 lines; 66.7%) lacked paternal alleles and were identical to Nam Dokmai Si Thong at all scored loci, consistent with a nucellar origin. Line 10 lacked paternal alleles but differed from the female parent at one locus, whereas six lines carried non-maternal alleles. The markers also revealed discrepancies in the recorded crosses that would be difficult to detect based on plant morphology alone. Line 8 had a genotype consistent with a cross between Nam Dokmai Si Thong and R2E2 rather than the recorded cross involving Yu Wen. Lines 11, 12, and 23 shared an identical genotype and carried paternal alleles that did not match any of the three designated male parents, suggesting possible pollination by another tree. Lines 13 and 14 differed from the female parent at one locus. The results of

unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering (cophenetic correlation coefficient, *r* = 0.91), principal coordinate analysis (PCoA), and STRUCTURE analysis at K = 2 were consistent with the parentage exclusion results. The SSR marker set clearly distinguished the female parent from the male parents, but could not differentiate among the three male parents. These findings demonstrate that early screening of mango seedlings using SSR markers can help eliminate non-hybrid plants at an early stage and verify the accuracy of cross records, thereby supporting more efficient and reliable mango breeding programs.

คำสำคัญ

มะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง; มะม่วงลูกผสม; เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์; การทดสอบการตัดออกทางพันธุกรรม; หลายเอ็มบริโอ

Keywords

Nam Dokmai Si Thong mango; Mango hybrids; SSR markers; Parentage exclusion; Polyembryony

บทคัดย่อ

มะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเป็นพันธุ์ที่มีรสชาติดีและสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงให้กับประเทศ แต่การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมแท้ทำได้ยาก เนื่องจากมะม่วงมีลักษณะหลายเอ็มบริโอ (polyembryony) ทำให้ต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อ nucellus ของแม่มีลักษณะปรากฏคล้ายต้นลูกผสมแท้ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลจึงช่วยเพิ่มความแม่นยำและลดระยะเวลาในการคัดเลือก งานวิจัยนี้ใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 13 ตำแหน่ง ตรวจสอบมะม่วงลูกผสม 21 สายต้น จากการผสมระหว่างน้ำดอกไม้สีทอง (แม่พันธุ์) กับอาร์ทูอีทู ยู่เหวิน และงาช้างแดง (พ่อพันธุ์) พบอัลลีลรวม 24 อัลลีล (1-3 อัลลีลต่อตำแหน่ง) ค่าเฉลี่ย observed heterozygosity, expected heterozygosity และ polymorphic information content (PIC) เท่ากับ 0.245, 0.226 และ 0.183 ตามลำดับ ผลการทดสอบการตัดออกทางพันธุกรรม (parentage exclusion test) ณ ตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะ (paternal-specific allele) พบว่าลูกผสมถึง 2 ใน 3 (14 สายต้น; ร้อยละ 66.7) ไม่มีอัลลีลของพ่อพันธุ์และมีจีโนไทป์เหมือนน้ำดอกไม้สีทองทุกตำแหน่งที่ตรวจได้ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดจากเนื้อเยื่อของแม่ (nucellar origin) ในขณะที่สายต้นหมายเลข 10 ไม่มีอัลลีลของพ่อพันธุ์แต่ต่างจากแม่พันธุ์ 1 ตำแหน่ง อีก 6 สายต้นมีอัลลีลซึ่งไม่ได้มาจากแม่พันธุ์ และเครื่องหมายดีเอ็นเอยังเผยความคลาดเคลื่อนของประวัติคู่ผสมที่ตรวจพบได้ยากจากลักษณะภายนอก ได้แก่ สายต้นหมายเลข 8 ซึ่งมีจีโนไทป์สอดคล้องกับคู่ผสมน้ำดอกไม้สีทอง × อาร์ทูอีทู แทนยู่เหวินที่บันทึกไว้ และสายต้นหมายเลข 11, 12 และ 23 ซึ่งมีจีโนไทป์เหมือนกันและมีอัลลีลจากพ่อที่ไม่ตรงกับพ่อพันธุ์ทั้งสาม บ่งชี้ว่ามีโอกาสได้รับละอองเรณูจากต้นอื่น ส่วนสายต้นหมายเลข 13 และ 14 มีจีโนไทป์ไม่ตรงกับแม่พันธุ์ 1 ตำแหน่ง ผลการจัดกลุ่มด้วยแผนภาพต้นไม้แบบ UPGMA (cophenetic r = 0.91) การวิเคราะห์ PCoA และ STRUCTURE ที่ K = 2 สอดคล้องกับผลการทดสอบการตัดออก เครื่องหมายชุดนี้แยกแม่พันธุ์ออกจากพ่อพันธุ์ได้ชัดเจน แต่ยังแยกพ่อพันธุ์ทั้งสามออกจากกันไม่ได้ ผลการศึกษาชี้ว่า การตรวจต้นกล้าด้วยเครื่องหมาย SSR ช่วยคัดแยกต้นที่ไม่ใช่ลูกผสมออกได้ตั้งแต่ระยะแรก และยังใช้ตรวจสอบความถูกต้องของประวัติคู่ผสมได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์มะม่วง

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** suparat2117@gmail.com **DOI:**

1. คำนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นไม้ผลเขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ไทยเป็นประเทศผู้ผลิตมะม่วงอันดับ 8 ของโลก โดยมีผลผลิตมากกว่า 1.6 ล้านตันต่อปี และเป็นผู้ส่งออกอันดับ 5 ของโลก ในปี 2567 การส่งออกมะม่วงสดของไทยมีมูลค่า 4,716 ล้านบาท เพิ่มขึ้นร้อยละ 45.68 จากปีก่อนหน้า โดยตลาดส่งออกหลัก ได้แก่ เกาหลีใต้ มาเลเซีย ญี่ปุ่น เวียดนาม และ สปป.ลาว [1] ไทยเป็นแหล่งพันธุกรรมมะม่วงที่สำคัญแหล่งหนึ่ง แม้สายพันธุ์ที่ปลูกจะมีความหลากหลาย แต่ตลาดยังเปิดรับสายพันธุ์ใหม่อย่างต่อเนื่อง

จากการประชุมร่วมกับสมาคมชาวสวนมะม่วงไทย พบว่าเกษตรกรต้องการพันธุ์มะม่วงที่มีคุณภาพเนื้อและรสชาติคล้ายพันธุ์น้ำดอกไม้ เปลือกหนา มีสีสันสะดุดตา ทนทานต่อโรคและแมลง และมีอายุหลังการเก็บเกี่ยวยาวนาน เพื่อเปิดตลาดต่างประเทศใหม่ เช่น สหรัฐอเมริกาและออสเตรเลีย ปัจจุบันน้ำดอกไม้สีทองเป็นพันธุ์หลักที่บริโภคผลสุกทั้งในและต่างประเทศ แต่มีข้อจำกัดคืออายุการเก็บรักษาสั้นเพียง 16 วัน เมื่อเทียบกับพันธุ์คู่แข่งในตลาดโลก (40 วัน) ทำให้ต้นทุนการขนส่งทางอากาศสูง และยังอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศ กรมวิชาการเกษตร โดยศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษและศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัย ได้ดำเนินการพัฒนาสายพันธุ์มะม่วงบริโภคผลสุกตั้งแต่ปี 2555-2558 และในปี 2565 ศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัยได้ผสมข้ามพันธุ์เพื่อหาลูกผสมที่มีผิวผลสีแดง โดยใช้น้ำดอกไม้สีทองเป็นแม่พันธุ์ ผสมกับพ่อพันธุ์ที่มีเปลือกผลสีแดงและไม่มีกลิ่นเทอร์พีนอยด์ 3 พันธุ์ ได้ลูกผสมทั้งหมด 21 ต้น พ่อพันธุ์เหล่านี้มีภูมิหลังทางพันธุกรรมต่างจากแม่พันธุ์ โดยอาร์ทูอีทู (R2E2) เป็นพันธุ์ที่คัดเลือกจากต้นกล้าของพันธุ์ Kent ณ สถานีวิจัยพืชสวน Bowen รัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย และมีเมล็ดทั้งแบบเอ็มบริโอเดียวและหลายเอ็มบริโอ [2] ยู่เหวินเป็นพันธุ์จากไต้หวัน ซึ่งงานปรับปรุงพันธุ์มะม่วงในไต้หวันใช้พันธุ์กลุ่มฟลอริดา เช่น Haden, Irwin และ Kent เป็นฐานพันธุกรรมหลัก [3] ส่วนงาช้างแดงเป็นพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดจากไต้หวันเช่นกัน ขณะที่น้ำดอกไม้สีทองเป็นมะม่วงพันธุ์ไทย ดังนั้นพ่อพันธุ์ทั้งสามจึงคาดว่ามีอัลลีลที่แตกต่างจากแม่พันธุ์ ซึ่งเป็นเงื่อนไขสำคัญในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงพันธุ์มะม่วงมีความท้าทายเนื่องจากปรากฏการณ์หลายเอ็มบริโอ (polyembryony) ซึ่งทำให้เมล็ดส่วนหนึ่งพัฒนาเป็นต้นกล้าจากเนื้อเยื่อ nucellus ของแม่ (nucellar seedling) ที่มีพันธุกรรมเหมือนต้นแม่และมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายต้นลูกผสม การคัดเลือกด้วยลักษณะปรากฏเพียงอย่างเดียวจึงไม่สามารถแยกต้นลูกผสม (zygotic seedling) ออกจากต้น nucellar ได้ เครื่องหมาย Simple Sequence Repeats (SSR) เป็นเครื่องหมายแบบ co-dominant ที่มีระดับ polymorphism สูงและให้ผลทำซ้ำได้ จึงสามารถแยกอัลลีลที่ถ่ายทอดจากต้นแม่และต้นพ่อออกจากกันได้โดยตรง ต้นลูกผสมจะต้องมีอัลลีลจำเพาะของพ่อพันธุ์ ณ ตำแหน่งที่พ่อและแม่ต่างกัน ขณะที่ต้น nucellar จะมีจีโนไทป์เหมือนแม่ทุกตำแหน่ง [4, 5] การตรวจสอบรายตำแหน่งในลักษณะนี้ (parentage exclusion test) ระบุพ่อแม่ของลูกผสมมะม่วงในออสเตรเลียได้ถูกต้องร้อยละ 95 [4] ระบุลูกผสมของมะม่วงในจีนได้ร้อยละ 95.38 [6] และช่วยคัดเลือกลูกผสมได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า [7]

ประชากรลูกผสมชุดนี้ยังไม่เคยได้รับการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลมาก่อน การคัดเลือกจึงยังอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) ประเมินความเป็นลูกผสมของมะม่วงลูกผสม 21 สายต้น ด้วยการทดสอบการตัดออกทางพันธุกรรมรายตำแหน่งจากข้อมูลจีโนไทป์ SSR แบบ co-dominant และ (2) ศึกษาความสัมพันธ์และโครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างลูกผสมกับพ่อแม่พันธุ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือก

สายต้นและตรวจสอบประวัติคู่ผสมในงานปรับปรุงพันธุ์มะม่วงต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างที่ศึกษา

ประเมินมะม่วงลูกผสมจาก 3 คู่ผสม โดยมีน้ำดอกไม้สีทองเป็นแม่พันธุ์ และมีพ่อพันธุ์ผิวผลสีแดง ได้แก่ อาร์ทูอีทู ยู่เหวิน และงาช้างแดง รวมลูกผสม 21 สายต้น ได้แก่ น้ำดอกไม้สีทอง × ยู่เหวิน 11 ต้น (หมายเลข 5-15) น้ำดอกไม้สีทอง × งาช้างแดง 6 ต้น (หมายเลข 16-21) และน้ำดอกไม้สีทอง × อาร์ทูอีทู 4 ต้น (หมายเลข 22-25) ร่วมกับพ่อแม่พันธุ์ทั้ง 4 พันธุ์ (หมายเลข 1-4) รวม 25 ตัวอย่าง รายละเอียดตัวอย่างและภาพใบแสดงใน Table 1

2.2 เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (SSR marker)

คัดเลือกเครื่องหมาย SSR จาก 50 ตำแหน่งที่มีรายงานไว้ก่อนหน้า [8] โดยเลือกตำแหน่งที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ จำนวน 13 ตำแหน่ง ลำดับเบสไพรเมอร์ อุณหภูมิ annealing ขนาดผลิตภัณฑ์ และค่าพารามิเตอร์ทางพันธุศาสตร์รายตำแหน่งแสดงใน Table 2

2.3 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการบันทึกจีโนไทป์

นำใบเพสลาดของมะม่วงลูกผสมและพ่อแม่พันธุ์ปริมาณ 0.2 กรัม มาบดในไนโตรเจนเหลว สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ประยุกต์จากวิธีของ Doyle และ Doyle [9] เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X buffer S (Vivantis) 1.5 ไมโครลิตร dNTPs 2.5 mM 1.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์สาย Forward และ Reverse (10 µM) อย่างละ 0.25 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) 0.15 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบ (10 ng/µl) 3 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 8.35 ไมโครลิตร สภาวะการเพิ่มปริมาณประกอบด้วย pre-denaturation ที่ 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิเฉพาะของแต่ละไพรเมอร์ (52-57°C; Table 2) นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 30 วินาที และ final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที ด้วยเครื่อง SimpliAmp™ thermal cycler (Applied Biosystems) จากนั้นวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่อง capillary electrophoresis รุ่น Qsep 100 Bio-Fragment Analyzer (BiOptic Inc., Taiwan) โดยใช้ชุดน้ำยา High-Resolution Cartridges (F3)

ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่อง Qsep 100 ถูกจัดเข้าช่วงอัลลีล (allele binning) และบันทึกเป็นจีโนไทป์แบบดิพลอยด์ (co-dominant) การจัดช่วงอัลลีลทำทีละตำแหน่ง โดยใช้ขนาดอัลลีลของพ่อแม่พันธุ์ทั้งสี่เป็นค่าอ้างอิง ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกันไม่เกิน 2.5 bp จัดเป็นอัลลีลเดียวกัน จากนั้นจึงเรียกจีโนไทป์ ดังนี้ หากปรากฏพีคเดียว บันทึกเป็นโฮโมไซกัส (a/a) หากปรากฏสองพีค และพีคที่สองมีความสูงมากกว่าร้อยละ 30 ของพีคแรก บันทึกเป็นเฮเทอโรไซกัส (a/b) ส่วนพีคที่สูงไม่ถึงร้อยละ 30 ของพีคแรกถือเป็นสัญญาณรบกวน (stutter) และไม่นำมาบันทึก ตัวอย่างที่ไม่ปรากฏผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ณ ตำแหน่งใด บันทึกเป็นข้อมูลขาดหาย (missing data) โดยกำหนดค่าเป็น 0 และไม่นำมาคำนวณ

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ความหลากหลายของเครื่องหมาย SSR คำนวณจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (Na) ค่า observed heterozygosity (Ho) ค่า expected heterozygosity แบบ unbiased (He) [10] และค่า polymorphic information content (PIC) ตามสูตรของ Botstein et al. [11] คือ $PIC = 1 - \Sigma p_i^2 - \Sigma\Sigma\, 2p_i^2 p_j^2$ เมื่อ p_i และ p_j คือความถี่ของอัลลีล i และ j โดยไม่นับข้อมูลที่ขาดหาย

2. การทดสอบการตัดออกทางพันธุกรรม (parentage exclusion test) เปรียบเทียบจีโนไทป์

Table 1 Information on the studied mango varieties and their leaf characteristics


1. R2E2

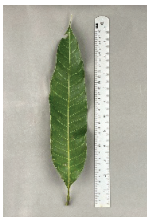

2. Yu Wen


3. Ngachang Daeng


4. Nam Dokmai Si Thong


5. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (1)


6. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (2)


7. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (3)

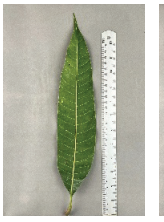

8. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (4)


9. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (5)


10. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (6)


11. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (7)


12. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (8)


13. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (9)


14. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (10)


15. Nam Dokmai Si Thong x Yu Wen (11)


16. Nam Dokmai Si Thong x Ngachang Daeng (1)


17. Nam Dokmai Si Thong x Ngachang Daeng (2)


18. Nam Dokmai Si Thong x Ngachang Daeng (2/2) **a**


19. Nam Dokmai Si Thong x Ngachang Daeng (3)


20. Nam Dokmai Si Thong x Ngachang Daeng (4)


21. Nam Dokmai Si Thong x Ngachang Daeng (5)


22. Nam Dokmai Si Thong x R2E2 (5)


23. Nam Dokmai Si Thong x R2E2 (6)


24. Nam Dokmai Si Thong x R2E2 (7)


25. Nam Dokmai Si Thong x R2E2 (8)

[a] No. 18 (2/2) Second seedling from the same polyembryonic seed as No. 17.

ของลูกผสมแต่ละสายต้นกับแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ที่บันทึกไว้ทีละตำแหน่ง กำหนดให้ “ตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะ” (paternal-specific allele) คือตำแหน่งที่พ่อพันธุ์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีลที่แม่พันธุ์ไม่มี ณ ตำแหน่งดังกล่าว ลูกผสมทุกต้นของคู่ผสมนั้นต้องมีอัลลีลของพ่อพันธุ์ จากนั้นตรวจ (1) อัลลีลที่ไม่ได้มาจากแม่พันธุ์ (non-maternal allele) (2) การขาดอัลลีลของแม่พันธุ์ (maternal mismatch) และ (3) ความเข้ากันได้ของจีโนไทป์กับคู่ผสมระหว่างแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์แต่ละพันธุ์ แล้วจัดลูกผสมแต่ละสายต้นเป็น 5 กลุ่ม โดยพิจารณาตามลำดับ 3 ขั้น ดังนี้ ขั้นที่ 1 ตรวจความเป็นลูกของแม่พันธุ์ หากมีอย่างน้อย 1 ตำแหน่งที่ลูกผสมไม่มีอัลลีลใดตรงกับแม่พันธุ์ จัดเป็นกลุ่ม V (ขาดอัลลีลของแม่พันธุ์) และไม่พิจารณาขั้นต่อไป ขั้นที่ 2 สำหรับสายต้นที่ผ่านขั้นที่ 1 และไม่มีอัลลีลที่ไม่ได้มาจากแม่พันธุ์ หากมีจีโนไทป์เหมือนแม่พันธุ์ทุกตำแหน่งที่ตรวจได้ จัดเป็นกลุ่ม I (จีโนไทป์เหมือนแม่พันธุ์) หากยังมีอัลลีลของแม่พันธุ์ทุกตำแหน่ง แต่จีโนไทป์ต่างจากแม่พันธุ์ตั้งแต่ 1 ตำแหน่งขึ้นไป เช่น แม่พันธุ์เป็นเฮเทอโรไซกัส แต่ลูกผสมเป็นโฮโมไซกัสของอัลลีลแม่ จัดเป็นกลุ่ม II (ต่างจากแม่พันธุ์โดยไม่มีอัลลีลของพ่อพันธุ์) ขั้นที่ 3 สายต้นที่มีอัลลีลที่ไม่ได้มาจากแม่พันธุ์อย่างน้อย 1 อัลลีล ถือว่าเป็นลูกผสม แล้วตรวจความเข้ากันได้กับพ่อพันธุ์ทั้งสาม โดย “เข้ากันได้” หมายถึง ทุกตำแหน่งที่ตรวจได้ ลูกผสมมีอัลลีลหนึ่งจากแม่พันธุ์และอีกอัลลีลหนึ่งตรงกับอัลลีลของพ่อพันธุ์นั้น (ไม่นับตำแหน่งที่ข้อมูลขาดหาย) หากไม่เข้ากันกับพ่อพันธุ์ที่บันทึกไว้ แต่เข้ากันได้กับพ่อพันธุ์อื่นในการศึกษานี้ จัดเป็นกลุ่ม III (พ่อพันธุ์ต่างจากที่บันทึกไว้) และหากไม่เข้ากันกับพ่อพันธุ์ทั้งสาม จัดเป็นกลุ่ม IV (พ่อพันธุ์อยู่นอกพ่อพันธุ์ทั้งสาม) ทั้งนี้ต้องตรวจขั้นที่ 1 ก่อน เนื่องจากต้องยืนยันว่าเป็นลูกของแม่พันธุ์ก่อนพิจารณาพ่อพันธุ์

3. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมแบบจีโนไทป์โคโดมิแนนต์ (codominant genotypic distance) [12] ระหว่างตัวอย่างทุกคู่ โดยใช้เฉพาะตำแหน่งที่มีข้อมูลทั้งสองตัวอย่าง และแสดงเป็นสัดส่วนของระยะห่างสูงสุดที่เป็นไปได้ จากนั้นสร้างแผนภาพต้นไม้แบบ unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) และประเมินความเหมาะสมของแผนภาพต้นไม้ด้วยค่า cophenetic correlation ระหว่างเมทริกซ์ระยะห่างทางพันธุกรรมกับเมทริกซ์ cophenetic ซึ่งคำนวณด้วยไลบรารี SciPy [13] สำหรับการวิเคราะห์ principal coordinate analysis (PCoA) [14] ใช้ squared Euclidean distance ของจำนวนสำเนาอัลลีล (allele dosage) ใน 10 ตำแหน่งที่มีความหลากหลาย โดยแทนค่าข้อมูลที่ขาดหายด้วยค่าเฉลี่ยของตำแหน่งนั้น

4. โครงสร้างทางพันธุกรรม วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE เวอร์ชัน 2.3.4 [15] ใช้ admixture model ร่วมกับ correlated allele frequencies [16] กำหนด burn-in 100,000 รอบ และ MCMC หลัง burn-in 100,000 รอบ จำนวนกลุ่ม (K) ตั้งแต่ 1 ถึง 10 ทำซ้ำ 10 ครั้งต่อค่า K หาจำนวนกลุ่มที่เหมาะสมจากค่า ΔK [17] ด้วยโปรแกรม Structure Harvester [18] และค่า posterior probability ของแต่ละ K (Prob(K)) [15] สรุปผลการทำซ้ำด้วยโปรแกรม CLUMPAK [19] และแสดงผลด้วยโปรแกรม DISTRUCT [20]

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ความหลากหลายของเครื่องหมาย SSR

เครื่องหมาย SSR ทั้ง 13 ตำแหน่ง ตรวจพบอัลลีลรวม 24 อัลลีล อยู่ในช่วง 1-3 อัลลีลต่อตำแหน่ง เฉลี่ย 1.85 อัลลีล โดย SSR15 มีจำนวนอัลลีลสูงสุด (3 อัลลีล) และมี 3 ตำแหน่งที่เป็น monomorphic ได้แก่ SSR31, SSR32 และ SSR43 (Table 2) ค่า Ho อยู่ในช่วง 0.000-0.917 (เฉลี่ย 0.245) ค่า He อยู่ในช่วง 0.000-0.507 (เฉลี่ย 0.226) และค่า PIC อยู่ในช่วง 0.000-0.373 (เฉลี่ย 0.183; เฉลี่ยเฉพาะตำแหน่งที่มี

Table 2 SSR primers and their characteristics based on co-dominant genotypes of 25 mango samples

Locus	Primer sequence (5′→3′)	Ta (°C)	Expected size (bp) [8]	Observed alleles (bp)	Na	Ho	He	PIC	Missing (%)
SSR1	F: TAA CAG CTT TGC TTG CCT CC R: TCC GCC GAT AAA CAT CAG AC	57	191-207	199, 205	2	0.120	0.184	0.164	0
SSR2	F: CCA CGA ATA TCA ACT GCT GCC R: TCT GAC ACT GCT CTT CCA CC	57	121-131	129, 133	2	0.040	0.040	0.038	0
SSR9	F: CGA GGA AGA GGA AGA TTA TGA C R: CGA ATA CCA TCC AGC AAA ATA C	56	245	250, 272	2	0.080	0.078	0.074	0
SSR11	F: GTT TTC ATT CTC AAA ATG TGT G R: CTT TCA TGT TCA TAG ATG CAA	52	174-190	173, 188	2	0.045	0.206	0.181	12
SSR13	F: GAA CGA GAA ATC GGG AAC R: GCA GCC ATT GAA TAC AGA G	53	348-370	350, 370	2	0.200	0.246	0.212	0
SSR15	F: TTT ACC AAG CTA GGG TCA R: CAC TCT TAA ACT ATT CAA CCA	52	201-226	201, 207, 224	3	0.050	0.381	0.337	20
SSR25	F: CTT GAA AGA GAT TGA GAT TG R: AGA AGG CAG AAG GTT TAG	53	200-212	192, 214	2	0.167	0.337	0.275	4
SSR30	F: TAG GGA TAT AGC TGG AGG R: ACG CAG TAG AAC CTG TG	54	290	282, 292	2	0.682	0.460	0.348	12
SSR31	F: CAG CCT TAT GTG TTG AAG R: AAA CTA AAC AAG CTG AAC C	55	190	187	1	0.000	0.000	0.000	8
SSR32	F: CTT CAT TTC TCC ACT TTT G R: ATG AAA TAC TGG CTG GTT	54	230-234	226	1	0.000	0.000	0.000	24
SSR34	F: GAG GAA CAT AAA GAT GGT G R: GAC AAG ATA AAC AAC TGG AA	53	144-164	147, 157	2	0.917	0.507	0.373	4
SSR36	F: CCT CAA TCT CAC TCA ACA R: ACC CCA CAA TCA AAC TAC	55	215-245	204, 240	2	0.880	0.503	0.371	0
SSR43	F: AAG AGG GAA TCT TAA TCA AC R: GTC GTT TTG CGT TAG TG	53	184-194	184	1	0.000	0.000	0.000	0
Mean					**1.85**	**0.245**	**0.226**	**0.183**	**6.5**

Ta = annealing temperature; Na = number of alleles; Ho = observed heterozygosity; He = unbiased expected heterozygosity [10]; PIC = polymorphic information content [11]; Missing = percentage of samples without amplification.

ความหลากหลาย 0.237) ตำแหน่งที่ให้ข้อมูลสูงสุด ได้แก่ SSR34 (0.373), SSR36 (0.371), SSR30 (0.348) และ SSR15 (0.337)

ค่า PIC เฉลี่ยต่ำกว่าช่วง 0.320-0.774 ที่รายงานในมะม่วง 10 พันธุ์ [21] เนื่องจาก (1) ตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นลูกผสมที่มีแม่พันธุ์ร่วมกัน (2) เครื่องหมายคัดเลือกจากความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งต่างจาก Begum et al. [8] ที่ใช้เครื่องหมายชุดเดียวกันกับมะม่วงพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์การค้าที่หลากหลาย 11 จีโนไทป์ และรายงานค่า PIC 0.39-0.88 (เฉลี่ย 0.66) แม้ว่าการศึกษาดังกล่าวจะบันทึกแถบดีเอ็นเอแบบมีหรือไม่มีแถบ (binary) ซึ่งต่างจากการบันทึกแบบ co-dominant ในการศึกษานี้ และ (3) ลูกผสม 14 สายต้นมีจีโนไทป์เหมือนแม่พันธุ์ ทำให้ความถี่อัลลีลของแม่พันธุ์สูงเกินสัดส่วน ด้วยเหตุผลเดียวกัน ค่า Ho จึงสูงกว่า He อย่างชัดเจนที่ SSR30, SSR34 และ SSR36 นอกจากนี้ ขนาดอัลลีลที่ตรวจพบในบางตำแหน่งอยู่นอกช่วงที่รายงานไว้ใน [8] ได้แก่ SSR2 (133 bp เทียบกับ 121-131 bp) SSR9 (250 และ 272 bp เทียบกับ 245 bp) SSR11 (173 bp เทียบกับ 174-190 bp) SSR25 (192 และ 214 bp เทียบกับ 200-212 bp) SSR30 (282 bp เทียบกับ 290 bp) SSR31 (187 bp เทียบกับ 190 bp) SSR32 (226 bp เทียบกับ 230-234 bp) และ SSR36 (204 bp เทียบกับ 215-245 bp) (Table 2) ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของวิธีวัดขนาดชิ้นดีเอ็นเอระหว่างเครื่อง Qsep 100 กับเจล metaphor agarose ที่ใช้ในการศึกษาของ Begum et al. [8] หรือจากความแตกต่างของอัลลีลระหว่างกลุ่มพันธุกรรมที่ศึกษา

3.2 การทดสอบการตัดออกทางพันธุกรรม (parentage exclusion test)

ตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะของแต่ละคู่ผสมมีจำนวนต่างกัน คู่ผสมน้ำดอกไม้สีทอง × ยู่เหวิน มี 4 ตำแหน่ง (SSR1, SSR11, SSR15 และ SSR25) คู่ผสมน้ำดอกไม้สีทอง × อาร์ทูอีทู มี 3 ตำแหน่ง (SSR11, SSR15 และ SSR25) และคู่ผสมน้ำดอกไม้สีทอง × งาช้างแดง มี 2 ตำแหน่ง (SSR15 และ SSR25) นอกจากนี้ยังมีตำแหน่งที่พ่อพันธุ์เป็นเฮเทอโรไซกัสของอัลลีลที่แม่ไม่มี ซึ่งลูกผสมได้รับอัลลีลดังกล่าวด้วยความน่าจะเป็นร้อยละ 50 เช่น อัลลีล 350 bp ที่ SSR13 ของยู่เหวินและอาร์ทูอีทู อัลลีล 272 bp ที่ SSR9 ของอาร์ทูอีทู และอัลลีล 133 bp ที่ SSR2 ของงาช้างแดง ผลการทดสอบการตัดออก

แบ่งลูกผสมได้ 5 กลุ่ม (Table 3) ดังนี้

กลุ่ม I (14 สายต้น; ร้อยละ 66.7): หมายเลข 5, 6, 7, 9, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24 และ 25 ไม่มีอัลลีลของพ่อพันธุ์ ในทุกตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะ (0 จาก 1-4 ตำแหน่งที่ตรวจได้) และมีจีโนไทป์เหมือนน้ำดอกไม้สีทองทุกตำแหน่งที่ตรวจได้ รวมทั้งยังคงจีโนไทป์เฮเทอโรไซกัสของแม่ไว้ครบทั้ง 3 ตำแหน่ง (SSR30 282/292, SSR34 147/157 และ SSR36 204/240) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับต้นกล้าที่เกิดจากเนื้อเยื่อของแม่ (nucellar origin) มากที่สุด อย่างไรก็ตาม สายต้นหมายเลข 20 และ 22 ตรวจได้เพียง 1-2 ตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะ และคู่ผสมกับงาช้างแดงมีตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะเพียง 2 ตำแหน่ง ผลการจัดกลุ่มของสายต้นเหล่านี้จึงมีความเชื่อมั่นต่ำกว่าสายต้นอื่น

กลุ่ม II (1 สายต้น): หมายเลข 10 (น้ำดอกไม้สีทอง × ยู่เหวิน (6)) ไม่มีอัลลีลของพ่อพันธุ์ทั้ง 4 ตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะ แต่ต่างจากแม่พันธุ์ที่ SSR30 (292/292 แทน 282/292) ความแตกต่างเพียงตำแหน่งเดียวนี้อาจเกิดจากการผสมตัวเองของแม่พันธุ์ หรือจากการหลุดหายของอัลลีล (allele dropout)

กลุ่ม III (1 สายต้น): หมายเลข 8 ซึ่งบันทึกว่าเป็นน้ำดอกไม้สีทอง × ยู่เหวิน (4) มีอัลลีลที่ไม่ได้มาจากแม่พันธุ์ 4 ตำแหน่ง ได้แก่ 272 bp (SSR9), 188 bp (SSR11), 207 bp (SSR15) และ 214 bp (SSR25) อัลลีล 272 และ 207 bp พบเฉพาะในอาร์ทูอีทู จีโนไทป์ของสายต้นนี้เข้ากันได้กับคู่ผสมน้ำดอกไม้สีทอง × อาร์ทูอีทู ครบทั้ง 13 ตำแหน่ง แต่ขัดแย้งกับยู่เหวิน 3 ตำแหน่ง

Table 3 Summary of parentage exclusion and clustering results for the 21 hybrid mango lines

No.	Hybrid	Missing loci	Non-maternal alleles (locus: bp)	Paternal	UPGMA	PCoA	Q(NDST) K = 2	Group
5	NDST×YW (1)	0	–	0/4	0.000	same	98.5	I
6	NDST×YW (2)	0	–	0/4	0.000	same	98.5	I
7	NDST×YW (3)	0	–	0/4	0.000	same	98.4	I
8	NDST×YW (4)	0	SSR9:272; SSR11:188; SSR15:207; SSR25:214	2/4	0.077	separated	31.6	III
9	NDST×YW (5)	0	–	0/4	0.000	same	98.4	I
10	NDST×YW (6)	0	–	0/4	0.019	near	98.0	II
11	NDST×YW (7)	6	SSR1:199; SSR13:350; SSR25:214	2/2	0.107	separated	18.7	IV
12	NDST×YW (8)	3	SSR1:199; SSR13:350; SSR25:214	2/3	0.075	separated	25.9	IV
13	NDST×YW (9)	5	SSR13:350/350	0/1	0.188	separated	15.0	V
14	NDST×YW (10)	2	SSR15:224/224	1/3	0.114	separated	42.6	V
15	NDST×YW (11)	1	–	0/4	0.000	same	98.5	I
16	NDST×NgD (1)	1	–	0/2	0.000	same	98.4	I
17	NDST×NgD (2)	0	–	0/2	0.000	same	98.4	I
18	NDST×NgD (2/2)	0	–	0/2	0.000	same	98.4	I
19	NDST×NgD (3)	0	–	0/2	0.000	same	98.4	I
20	NDST×NgD (4)	2	–	0/1	0.000	near	97.5	I
21	NDST×NgD (5)	0	–	0/2	0.000	same	98.4	I
22	NDST×R2E2 (5)	1	–	0/2	0.000	near	97.8	I
23	NDST×R2E2 (6)	0	SSR1:199; SSR13:350; SSR25:214	1/3	0.077	separated	39.4	IV
24	NDST×R2E2 (7)	0	–	0/3	0.000	same	98.4	I
25	NDST×R2E2 (8)	0	–	0/3	0.000	same	98.5	I

Paternal = number of paternal-specific-allele loci carrying the recorded male allele / number of such loci scored. UPGMA = pairwise genetic distance to NDST (proportion). PCoA: same, identical coordinates to NDST; near, close to NDST (No. 20 and 22 offset by missing-data imputation; No. 10 by one locus); separated, positioned between NDST and the male parents. Q(NDST) = proportion of the NDST cluster at K = 2 (%). Group: I, maternal genotype; II, maternal-like with one deviating locus; III, hybrid compatible with a male parent other than recorded; IV, hybrid with no compatible candidate male; V, maternal allele missing at one locus (re-genotyping required). NDST = Nam Dokmai Si Thong; YW = Yu Wen; NgD = Ngachang Daeng.

(SSR1, SSR9 และ SSR15) สายต้นนี้จึงมีหลักฐานชัดเจนว่าเป็นลูกผสม แต่พ่อพันธุ์ที่แท้จริงน่าจะเป็นอาร์ทูอีทู ซึ่งอาจเกิดจากการบันทึกคู่ผสมคลาดเคลื่อนหรือการปนเปื้อนละอองเรณูระหว่างการผสมพันธุ์

กลุ่ม IV (3 สายต้น): หมายเลข 11, 12 และ 23 มีจีโนไทป์เหมือนกันทุกตำแหน่งที่ตรวจได้ร่วมกัน (7-10 ตำแหน่ง) และมีอัลลีลที่ไม่ได้มาจากแม่พันธุ์ 3 อัลลีล ได้แก่ 199 bp (SSR1), 350 bp (SSR13) และ 214 bp (SSR25) จึงมีหลักฐานชัดเจนว่าเป็นลูกผสม อัลลีล 199 bp พบเฉพาะในยู่เหวินในบรรดาพ่อพันธุ์ทั้งสาม แต่สายต้นหมายเลข 12 และ 23 เป็นโฮโมไซกัส 173/173 ที่ SSR11 และสายต้นหมายเลข 23 เป็นโฮโมไซกัส 201/201 ที่ SSR15 ซึ่งขัดแย้งกับยู่เหวิน (188/188 และ 224/224) ส่วนอาร์ทูอีทูและงาช้างแดงถูกตัดออกที่ SSR1 ดังนั้นพ่อของสายต้นกลุ่มนี้จึงน่าจะเป็นต้นอื่นนอกเหนือจากพ่อพันธุ์ทั้งสาม (pollen contamination) หรือ ยู่เหวินมี null allele ที่ SSR11 และ SSR15 ซึ่งยังไม่สามารถตัดออกได้ด้วยข้อมูลชุดนี้ นอกจากนี้การที่สายต้นซึ่งบันทึกว่ามาจากคู่ผสมต่างกัน (ยู่เหวิน และอาร์ทูอีทู) มีจีโนไทป์เหมือนกันทุกตำแหน่ง บ่งชี้ว่าอาจเป็นต้นที่มาจากเมล็ดเดียวกัน หรือมีการสลับป้ายระหว่างการขยายพันธุ์

กลุ่ม V (2 สายต้น): หมายเลข 13 และ 14 ขาดอัลลีลของแม่พันธุ์ 1 ตำแหน่ง โดยหมายเลข 13 เป็น 350/350 ที่ SSR13 (แม่พันธุ์เป็น 370/370) และหมายเลข 14 เป็น 224/224 ที่ SSR15 (แม่พันธุ์เป็น 201/201) ทั้งยังขัดแย้งกับยู่เหวินที่ SSR1 และหมายเลข 14 ขัดแย้งที่ SSR25 เพิ่มเติม และมีข้อมูลขาดหาย 5 และ 2 ตำแหน่ง ตามลำดับ หากจีโนไทป์ถูกต้อง สายต้นทั้งสองจะไม่ใช่ลูกของน้ำดอกไม้สีทอง แต่การขาดอัลลีลเพียงตำแหน่งเดียวร่วมกับข้อมูลขาดหายจำนวนมากอาจเกิดจากคุณภาพดีเอ็นเอหรือการหลุดหายของอัลลีล

3.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (UPGMA และ PCoA)

แผนภาพต้นไม้แบบ UPGMA มีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0.000-0.396 และมีค่า cophenetic correlation เท่ากับ 0.91 แสดงว่าแผนภาพต้นไม้สะท้อนเมทริกซ์ระยะห่างได้ดี (Figure 1) ลูกผสมกลุ่ม I ทั้ง 14 สายต้นรวมกลุ่มกับน้ำดอกไม้สีทองที่ระยะห่าง 0 โดยหมายเลข 10 เข้าร่วมกลุ่มที่ระยะห่าง 0.019 หมายเลข 8 แยกออกที่ระยะห่าง 0.077 ส่วนหมายเลข 11, 12 และ 23 รวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ระยะห่าง 0 และแยกออกจากกลุ่มแม่พันธุ์ที่ระยะห่าง 0.087 หมายเลข 14 แยกออกที่ระยะห่าง 0.104 ขณะที่หมายเลข 13 จัดอยู่ใกล้อาร์ทูอีทู (0.094) พ่อพันธุ์ทั้งสามแยกออกจากกลุ่มแม่พันธุ์และลูกผสมอย่างชัดเจน (0.245)

การวิเคราะห์ PCoA พบว่าแกนที่ 1, 2 และ 3 อธิบายความผันแปรทางพันธุกรรมได้ร้อยละ 57.41, 13.50 และ 13.06 ตามลำดับ รวมร้อยละ 83.97 (Figure 2) แกนที่ 1 แยกน้ำดอกไม้สีทองและลูกผสมกลุ่ม I ซึ่งซ้อนทับกันที่ตำแหน่งเดียว ออกจากพ่อพันธุ์ทั้งสาม (Figure 2A และ 2B) โดยลูกผสมกลุ่ม III–V (หมายเลข 8, 11, 12, 13, 14 และ 23) อยู่ระหว่างแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการมีอัลลีลจากทั้งสองฝ่าย แกนที่ 2 แยกงาช้างแดงและหมายเลข 14 ออกจากอาร์ทูอีทูและหมายเลข 13 (Figure 2A และ 2C) และแกนที่ 3 แยกอาร์ทูอีทูและหมายเลข 8 ออกจากยู่เหวินและหมายเลข 11, 12, 13 และ 23 (Figure 2B และ 2C) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการตัดออกที่ระบุว่าหมายเลข 8 มีอัลลีลของอาร์ทูอีทู หมายเลข 20 และ 22 ซึ่งมีจีโนไทป์เหมือนแม่พันธุ์ทุกตำแหน่งที่ตรวจได้ อยู่ใกล้แต่ไม่ซ้อนทับกับกลุ่มแม่พันธุ์

4. โครงสร้างทางพันธุกรรม (Genetic structure)

ค่า Prob(K) สูงสุดที่ K = 2 (0.925) (Figure 3B)

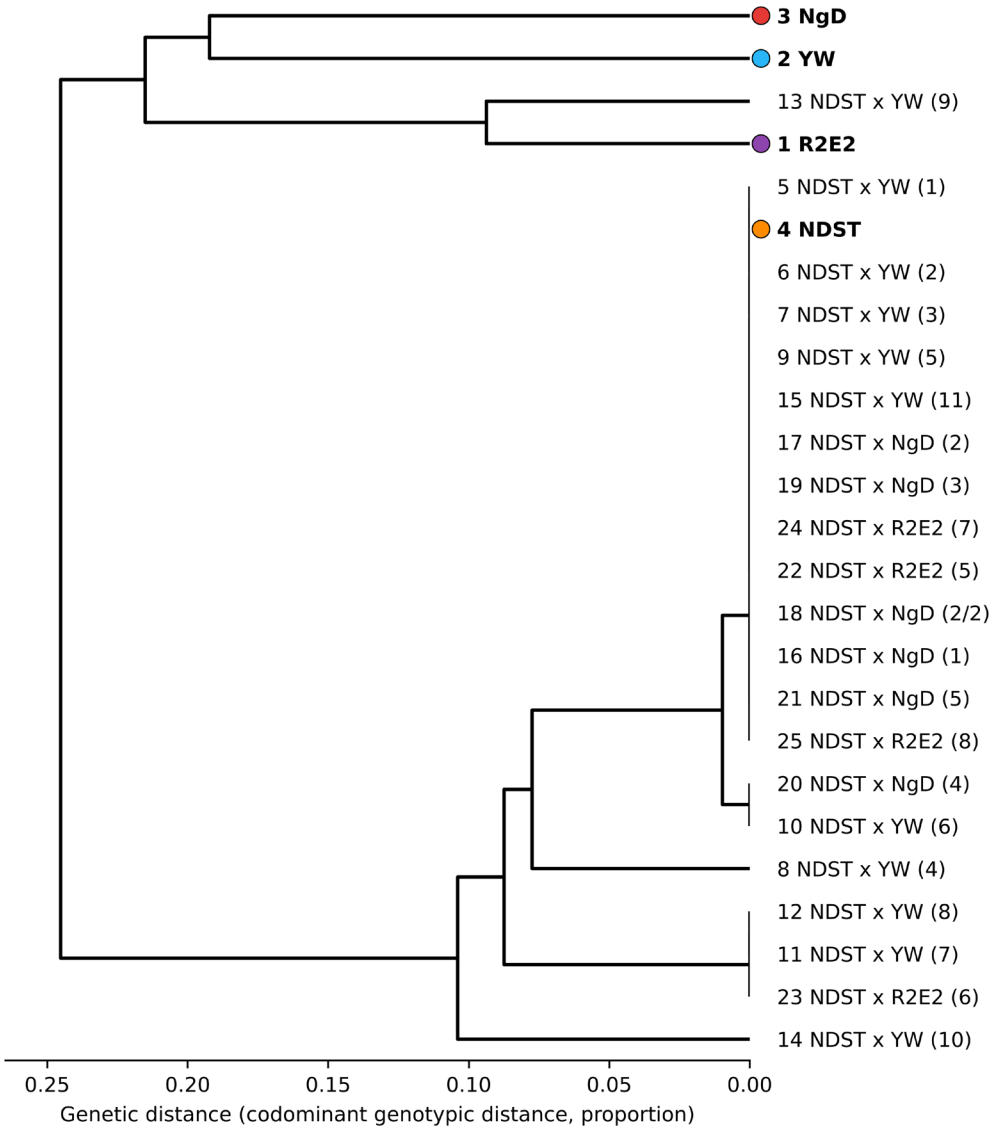


Figure 1 UPGMA dendrogram of 21 hybrid mango lines and their four parental cultivars based on co-dominant genotypic distance from 13 SSR markers (cophenetic r = 0.91). Colored circles indicate the parental cultivars. NDST = Nam Dokmai Si Thong; YW = Yu Wen; NgD = Ngachang Daeng.

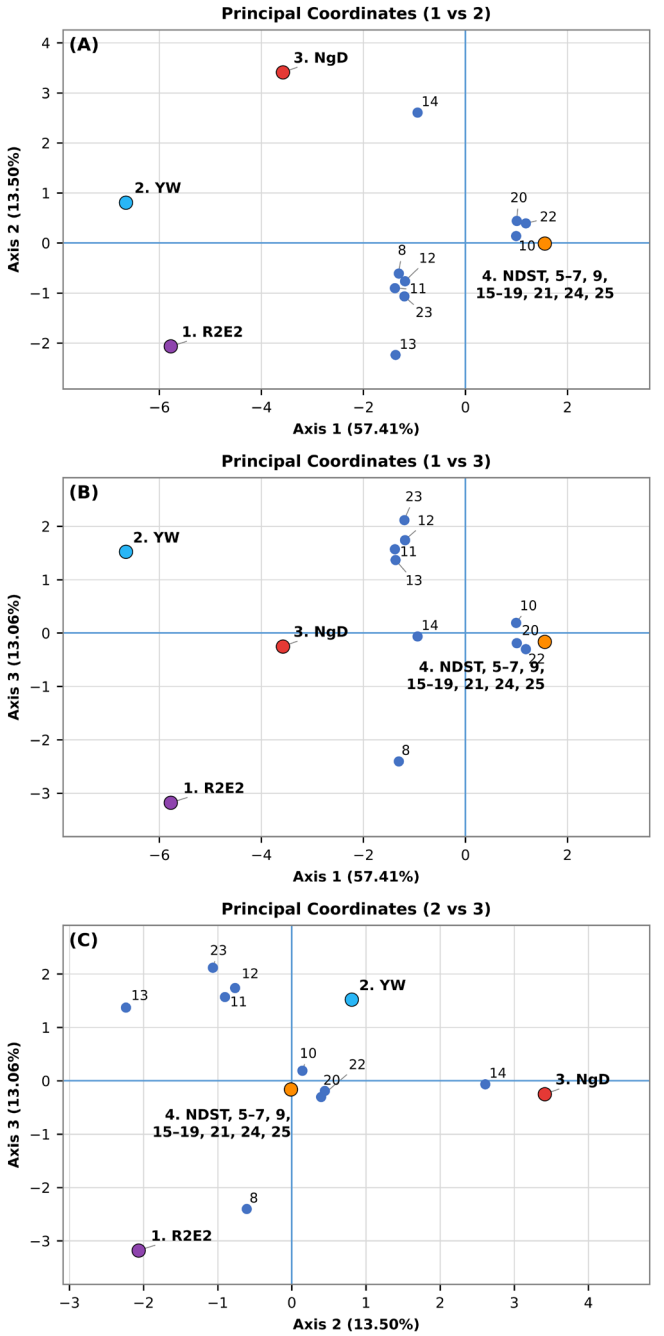


Figure 2 Principal coordinate analysis (PCoA) of 21 hybrid mango lines and their four parental cultivars based on co-dominant SSR genotypes. Principal coordinates Axis 1 vs Axis 2 (A), Axis 1 vs Axis 3 (B) and Axis 2 vs Axis 3 (C). Colored circles indicate the parental cultivars; numbers indicate sample numbers (Table 1). Lines 5-7, 9, 15-19, 21, 24 and 25 share the same coordinates as NDST. NDST = Nam Dokmai Si Thong; YW = Yu Wen; NgD = Ngachang Daeng.

ดังนั้น K = 2 จึงใช้เพื่ออธิบายการแยกกลุ่มระดับกว้างระหว่างน้ำดอกไม้สีทองกับพ่อพันธุ์ ขณะที่ค่า ΔK สูงสุดที่ K = 6 (3.010; Figure 3A) สามารถอธิบายโครงสร้างย่อยทางพันธุกรรม (genetic sub-structure) ที่เป็นไปได้ (Figure 4)

ที่ K = 2 น้ำดอกไม้สีทองและลูกผสมกลุ่ม I–II ทั้ง 15 สายต้นมีสัดส่วนของกลุ่มแม่พันธุ์ (QNDST) ร้อยละ 97.5-98.5 ขณะที่พ่อพันธุ์มีสัดส่วนของกลุ่มที่สองร้อยละ 90.4-96.9 ลูกผสม 6 สายต้นที่มีอัลลีลซึ่งไม่ได้มาจากแม่พันธุ์ แสดงองค์ประกอบผสมจากทั้งสองกลุ่ม ได้แก่ หมายเลข 14 (QNDST ร้อยละ 42.6), 23 (39.4), 8 (31.6), 12 (25.9), 11 (18.7) และ 13 (15.0) (Table 3; Figure 4) ลูกผสมระหว่างพ่อแม่ที่อยู่คนละกลุ่มอย่างสมบูรณ์ควรมี QNDST ประมาณร้อยละ 50 ค่าของหมายเลข 14 และ 23 จึงใกล้เคียงกับที่คาดไว้ ขณะที่หมายเลข 8, 11, 12 และ 13 มีค่าต่ำกว่าที่คาด อย่างไรก็ตาม หมายเลข 11, 12 และ 23 มีจีโนไทป์เหมือนกันทุกตำแหน่งที่ตรวจได้ร่วมกัน แต่มีค่า QNDST ต่างกัน (ร้อยละ 18.7-39.4) ความแตกต่างนี้จึงน่าจะเกิดจากจำนวนข้อมูลขาดหาย (หมายเลข 11 ขาดหาย 6 ตำแหน่ง) มากกว่าความแตกต่างของพ่อพันธุ์ ค่า QNDST จึงใช้สนับสนุนความเป็นลูกผสมได้ แต่ไม่สามารถใช้ระบุพ่อพันธุ์ได้

ผลจากทั้ง 4 วิธี ได้แก่ การทดสอบการตัดออก (parentage exclusion) UPGMA, PCoA และ STRUCTURE สอดคล้องกันทุกสายต้น (Table 3) สายต้นที่แยกออกจากแม่พันธุ์ในการจัดกลุ่มทุกวิธีเป็นชุดเดียวกับสายต้นที่มีอัลลีลซึ่งไม่ได้มาจากแม่พันธุ์ (หมายเลข 8, 11, 12, 13, 14 และ 23) ส่วนสายต้นที่ไม่มีอัลลีลของพ่อพันธุ์ทั้ง 15 สายต้นอยู่ในกลุ่มเดียวกับแม่พันธุ์ในทุกวิธี เครื่องหมายชุดนี้แยกน้ำดอกไม้สีทองออกจากพ่อพันธุ์ได้ชัดเจน แต่แยกยู่เหวิน อาร์ทูอีทู และงาช้างแดงออกจากกันได้จำกัด ซึ่งสอดคล้องกับภูมิหลังของพ่อพันธุ์ โดยอาร์ทูอีทูคัดเลือกจากต้นกล้าของ Kent [2] และงานปรับปรุงพันธุ์ในไต้หวันใช้ Kent และพันธุ์กลุ่มฟลอริดาเป็นฐานพันธุกรรม [3] พ่อพันธุ์อย่างน้อยสองพันธุ์จึงอาจมีบรรพบุรุษร่วมกัน

เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานที่ใช้เครื่องหมาย SSR แบบเรืองแสงระบุลูกผสมชั่วที่ 1 ได้ร้อยละ 95.38 [6] ซึ่งเป็นการผสมระหว่าง Jinhuang กับ Renong No.1 และระบุพ่อแม่ของลูกผสมในออสเตรเลียได้ถูกต้องร้อยละ 95 [4] สัดส่วนลูกผสมในการศึกษานี้ต่ำกว่ามาก โดยมีเพียง 6 จาก 21 สายต้นที่มีอัลลีลซึ่งไม่ได้มาจากแม่พันธุ์ ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับลักษณะหลายเอ็มบริโอของ

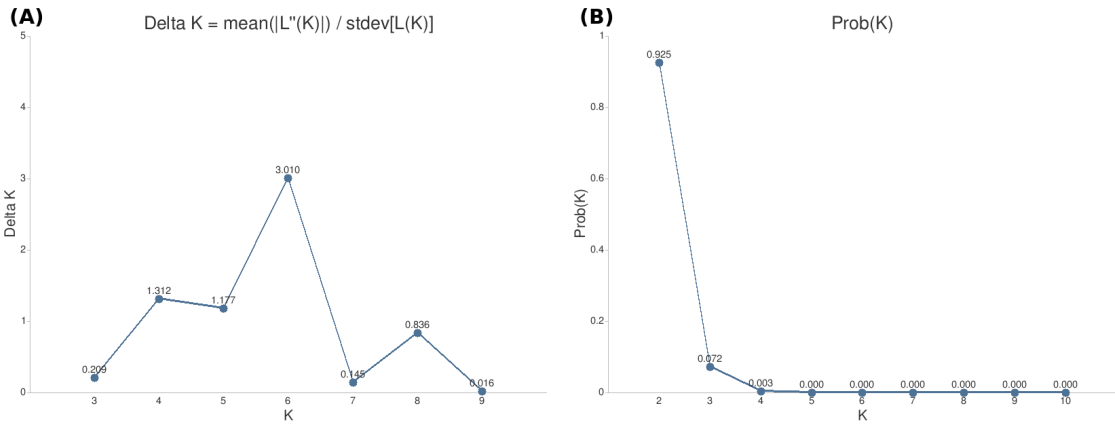


Figure 3 Selection of the number of clusters (K) in STRUCTURE: (A) ΔK [17] and (B) posterior probability of each K, Prob(K) [15].

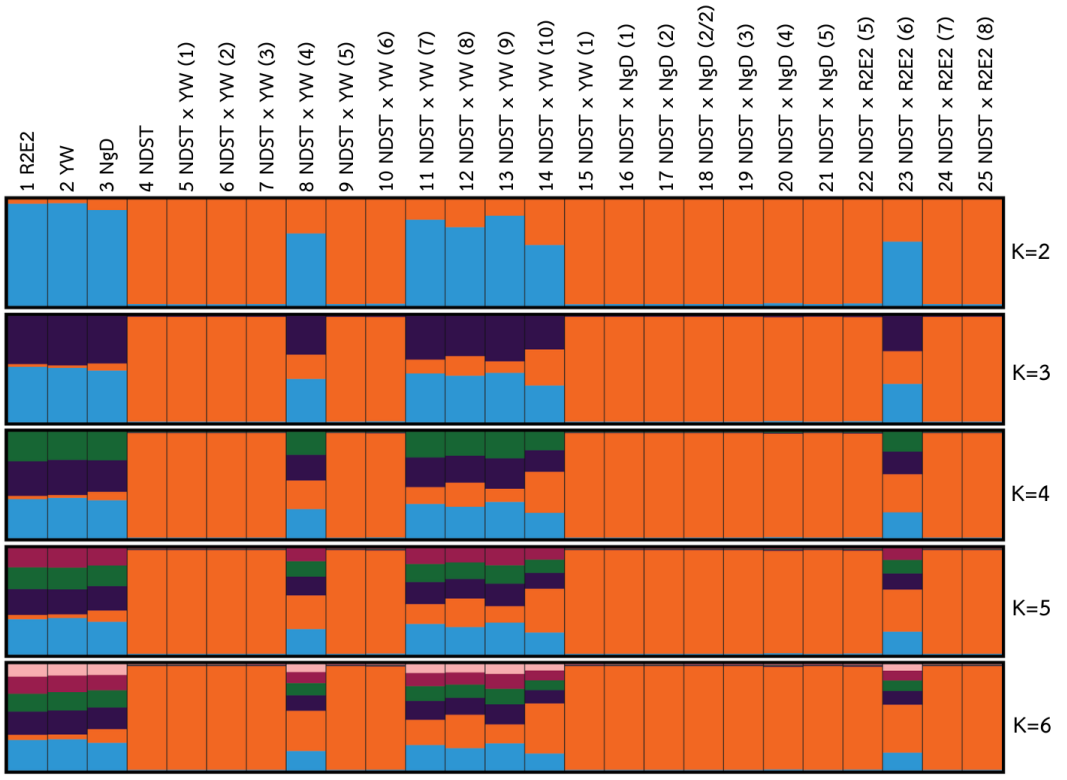


Figure 4 Bar plots of STRUCTURE results for K = 2 to 6. Each individual is represented by a vertical bar partitioned into K colored segments representing its estimated membership in each cluster. NDST = Nam Dokmai Si Thong; YW = Yu Wen; NgD = Ngachang Daeng.

น้ำดอกไม้สีทอง นอกจากนี้ การศึกษานี้มีตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะเพียง 3-4 ตำแหน่งในคู่ผสมกับยู่เหวินและอาร์ทูอีทู ส่วนคู่ผสมกับงาช้างแดงมีเพียง 2 ตำแหน่ง จึงควรเพิ่มเครื่องหมายที่มีอัลลีลจำเพาะของพ่อพันธุ์จากการประเมินลูกผสมในครั้งนี้สามารถคัดสายต้นหมายเลข 8, 11, 12 และ 23 เป็นลูกผสมที่ควรคัดเก็บไว้ประเมินต่อ ในขณะที่สายต้นกลุ่ม I น่าจะเป็นต้นที่มีพันธุกรรมเหมือนแม่พันธุ์ และสายต้นหมายเลข 10, 13 และ 14 ควรตรวจจีโนไทป์ซ้ำก่อนตัดสินใจ

การประเมินนี้มีข้อจำกัดที่ควรพิจารณา ได้แก่ (1) เครื่องหมายมีความหลากหลายต่ำ (PIC เฉลี่ย 0.183) และมีตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะเพียง 2-4 ตำแหน่งต่อคู่ผสม (2) SSR15 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พ่อพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะในทุกคู่ผสม และลูกผสมที่มีอัลลีลจากพ่อบางสายต้นเป็นโฮโมไซกัสที่ตำแหน่งนี้ (หมายเลข 14 และ 23) ซึ่งอาจเกิดจาก null allele หรือการหลุดหายของอัลลีล หากพ่อพันธุ์ที่ปรากฏเป็นโฮโมไซกัสมี null allele การตัดออก ณ ตำแหน่งดังกล่าวอาจคลาดเคลื่อนโดยเฉพาะกับสายต้นกลุ่ม IV และ V และ (3) ขนาดอัลลีลวัดด้วยเครื่อง Qsep 100 ซึ่งมีความละเอียดในการแยกขนาดต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ติดสีเรืองแสง และขนาดที่วัดได้บางตำแหน่งอยู่นอกช่วงที่รายงานไว้ [8] ดังนั้นสถานะความเป็นลูกผสมที่รายงานในการศึกษานี้จึงเป็นผลการประเมินเบื้องต้น

4. สรุปผลการทดลอง

การใช้เครื่องหมาย SSR 13 ตำแหน่ง ที่บันทึกข้อมูลแบบ co-dominant ร่วมกับการทดสอบการตัดออกทางพันธุกรรมรายตำแหน่ง ช่วยแยกต้นกล้าที่เกิดจากเนื้อเยื่อของแม่ออกจากลูกผสมได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า ซึ่งการคัดเลือกด้วยลักษณะปรากฏแบบดั้งเดิมทำได้ยาก เนื่องจากต้นกล้าจากเนื้อเยื่อ nucellus มีลักษณะคล้ายลูกผสม และการยืนยันจากลักษณะผลต้องรอให้ต้นมะม่วงออกผลซึ่งใช้เวลาหลายปี จากการประเมินมะม่วงลูกผสม 21 สายต้น พบว่า 14 สายต้น (ร้อยละ 66.7) มีจีโนไทป์เหมือนน้ำดอกไม้สีทองและไม่มีอัลลีลของพ่อพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับต้นกล้าที่เกิดจากเนื้อเยื่อของแม่ หากไม่ได้ตรวจด้วยเครื่องหมาย ต้นเหล่านี้จะถูกปลูกดูแลและประเมินต่อในฐานะลูกผสม ทำให้สิ้นเปลืองพื้นที่ แรงงาน และเวลาในโครงการปรับปรุงพันธุ์

นอกจากการคัดแยกต้นกล้าแล้ว เครื่องหมายยังช่วยตรวจสอบความถูกต้องของประวัติคู่ผสม โดยพบลูกผสม 4 สายต้น (หมายเลข 8, 11, 12 และ 23) ที่มีอัลลีลจากพ่อชัดเจน แต่พ่อที่แท้จริงน่าจะไม่ตรงกับที่บันทึกไว้ หมายเลข 8 สอดคล้องกับอาร์ทูอีทู และหมายเลข 11, 12 และ 23 น่าจะมีโอกาสรับละอองเรณูจากต้นอื่นนอกเหนือจากพ่อพันธุ์ทั้งสาม ความคลาดเคลื่อนลักษณะนี้ตรวจพบได้ยากจากการสังเกตลักษณะภายนอก ผลการจัดกลุ่มด้วย UPGMA, PCoA และ STRUCTURE สอดคล้องกับการทดสอบการตัดออก อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายชุดนี้แยกแม่พันธุ์ออกจากพ่อพันธุ์ได้ แต่ยังแยกพ่อพันธุ์ทั้งสามออกจากกันได้ไม่ชัดเจน

ในการนำไปใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ ควรตรวจต้นกล้าด้วยเครื่องหมาย SSR ก่อนย้ายปลูกลงแปลง เพื่อคัดเฉพาะต้นที่เป็นลูกผสมไปประเมินต่อ สำหรับลูกผสมชุดนี้มีข้อเสนอแนะ ได้แก่ (1) คัดเก็บสายต้นหมายเลข 8, 11, 12 และ 23 ไว้ประเมินลักษณะทางการเกษตรต่อ (2) ตรวจจีโนไทป์ซ้ำสายต้นหมายเลข 10, 13 และ 14 ก่อนตัดสินใจคัดทิ้ง และ (3) เพิ่มเครื่องหมายที่พ่อพันธุ์แต่ละพันธุ์มีอัลลีลเฉพาะ โดยเฉพาะงาช้างแดง โดยคัดกรองเครื่องหมายที่ให้แถบต่างกันระหว่างพ่อแม่พันธุ์ก่อน แล้วทดสอบกับลูกผสมบางส่วน ตามแนวทางของ Li et al. [6] หรือใช้เครื่องหมาย SNPs เพื่อเพิ่มความสามารถในการยืนยันความเป็นลูกผสมและระบุพ่อพันธุ์ในการคัดเลือกระยะต้นกล้า

5. คำขอบคุณ

คณะผู้ดำเนินงานขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษและศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัย ที่เป็นแหล่งรวบรวมและดูแลสายพันธุ์มะม่วงที่ศึกษาในครั้งนี้ และขอขอบคุณนักวิจัยและทีมงานห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Office of Trade Policy and Strategy, 2025, Thai Mango, a Rising Star of Fruit Exports: South Korea Becomes Thailand's Top Export Market, Ministry of Commerce, Available Source: https://tpso.go.th/news/2502-0000000040, January 27, 2026. (in Thai)

[2] Department of Primary Industries Queensland, 1999, Mango Information Kit, Agrilink Series, Queensland Horticulture Institute, Brisbane.

[3] Lin, C.-H., Chiou, K.-D., Lee, S.-R., Shih, P.-Y., Lee, C.-R. and Lin, Y.-R., 2026, The genetic diversity of mango (*Mangifera indica L.*) germplasm in Taiwan by high-throughput single-nucleotide polymorphism genotyping, Plants People Planet 8(1): 301-315, https://doi.org/10.1002/ppp3.70080.

[4] Dillon, N.L., Bally, I.S.E., Hucks, L.A., Wright, C.L., Innes, D.J. and Dietzgen, R.G., 2013, Implementation of SSR markers in mango breeding in Australia, Acta Hortic. 992: 259-267.

[5] Ravishankar, K.V., Dinesh, M.R., Nischita, P. and Sandya, B.S., 2015, Development and characterization of microsatellite markers in mango (*Mangifera indica*) using next-generation sequencing technology and their transferability across species, Mol. Breed. 35(3): 93.

[6] Li, X., Zheng, B., Xu, W., Ma, X., Wang, S., Qian, M. and Wu, H., 2022, Identification of F1 hybrid progenies in mango based on fluorescent SSR markers, Horticulturae 8(12): 1122.

[7] Kumar, G., Srivastav, M., Sreekanth, H.S., Kumar, C., Prakash, J., Singh, S.K. and Vinod, 2023, SSR assisted identification of mango (*Mangifera indica* L.) hybrids and development of DNA barcodes, Indian J. Genet. Plant Breed. 83(3): 437-445.

[8] Begum, H., Reddy, M.T., Malathi, S., Reddy, B.P., Archak, S., Nagaraju, J. and 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, Asian Australas. J. Plant Sci. Biotechnol. 6(1): 24-37.

[9] Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.

[10] Nei, M., 1978, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, Genetics 89(3): 583-590.

[11] Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, Am. J. Hum. Genet. 32(3): 314-331.

[12] Peakall, R. and Smouse, P.E., 2006, GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, Mol. Ecol. Notes 6(1): 288-295.

[13] Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T.E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., et al., 2020, SciPy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in Python, Nat. Methods 17(3): 261-272.

[14] Gower, J.C., 1966, Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis, Biometrika 53(3-4): 325-338.

[15] Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P., 2000, Inference of population structure using multilocus genotype data, Genetics 155(2): 945-959.

[16] Falush, D., Stephens, M. and Pritchard, J.K., 2003, Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies, Genetics 164(4): 1567-1587.

[17] Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J., 2005, Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study, Mol. Ecol. 14(8): 2611-2620.

[18] Earl, D.A. and vonHoldt, B.M., 2012, STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method, Conserv. Genet. Resour. 4(2): 359-361.

[19] Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A. and Mayrose, I., 2015, CLUMPAK: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K, Mol. Ecol. Resour. 15(5): 1179-1191.

[20] Rosenberg, N.A., 2004, DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure, Mol. Ecol. Notes 4(1): 137-138.

[21] Kumar, M., Ponnuswami, V., Nagarajan, P., Jeyakumar, P. and Senthil, N., 2013, Molecular characterization of ten mango cultivars using simple sequences repeat (SSR) markers, Afr. J. Biotechnol. 12(47): 6568-6573.



พิมพ์ที่: สำนักงานบริหารการพิมพ์ธรรมศาสตร์, พ.ศ. 2569
http://www.thammasatprintinghouse.com