การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม (*Citrus* spp.) ในภาคใต้โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และไมโครแซทเทลไลท์

Genetic Diversity of *Citrus* spp. in Southern Thailand Based on RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and Microsatellite Techniques

บัณฑิตา คงพันธุ์

Buntita Kongpun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม (*Citrus* spp.) ในภาคใต้โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์

ผู้เขียน นางสาวบัณฑิตา คงพันธุ์

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..

(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

คณะกรรมการสอบ

……....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

……..กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

……....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

……..

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม (*Citrus* spp.) ในภาคใต้โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์
ผู้เขียน	นางสาวบัณฑิตา คงพันธุ์
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของส้มพื้นเมืองภาคใต้ (*Citrus* spp.) ที่เก็บรวบรวมจาก จังหวัดสงขลา ตรัง นครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี ทั้งหมด 10 ชนิด และไม่ทราบชนิดอีก 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 77 ตัวอย่าง โดยพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และ ไมโครแซทเทลไลท์ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ทำการบันทึกพบความแตกต่างของลักษณะรูปร่างแผ่นใบ ก้านใบ และปลายใบ 5, 4 และ 4 แบบ ตามลำดับ ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบ โดยใช้สารละลาย CTAB (Hexadecyl Trimethyl-Ammonium Bromide) และศึกษาโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี จากการทดสอบด้วยไพรเมอร์ ชนิด 10 เบส จำนวนทั้งสิ้น 23 ไพรเมอร์ คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและมีความแตกต่างกันในตัวอย่างที่ทดสอบ ได้จำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPA-04, OPAN-12, OPB-05, OPB-12, OPC-02, OPC-08 และ OPR-04 เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มทั้งหมด 77 ตัวอย่าง พบว่าให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 109 แถบ เฉลี่ย 15.57 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างจำนวน 106 แถบ หรือ 97.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการศึกษาด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทำการทดสอบกับไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ คือ AC01, AG14, CAG01 และ GT03 ให้แถบดีเอ็นเอ 116 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด เฉลี่ย 29 แถบต่อไพรเมอร์ เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจากทั้งสองเทคนิคมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อหาความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และสร้างเดนโดแกรมโดยใช้วิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) จากโปรแกรม NTSYS (Version 2.1) สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างพืชสกุลส้มทั้ง 77 ตัวอย่างได้เป็น 6 กลุ่ม โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.569 – 0.991 แสดงให้เห็นว่าประชากรพืชสกุลส้มที่นำมาทำการศึกษามีฐานพันธุกรรมค่อนข้างกว้าง โดยแต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยตัวอย่างส้มแต่ละชนิดปะปนกันไป และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มประชากรส้มชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือให้เอกลักษณ์อย่างชัดเจน ส่วนส้มจังกระ (ไม่ทราบชนิด) ทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ร่วมกันทั้งสองเทคนิคพบว่าจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *C. reticulata* Blanco

C. sinensis Osbeck และ *C. nobilis* Lour. ส่วนส้มอีก 1 ตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.)

Thesis Title	Genetic Diversity of *Citrus* spp. in Southern Thailand Based on RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and Microsatellite Techniques
Author	Miss Buntita Kongpun
Major Program	Plant Science
Academic Year	2009

Abstract

Genetic diversity of 77 samples belonging to 10 species and 5 unknown species of Citrus collected from different areas in Southern Thailand (Songkhla, Trang, Nakhon-Si-Thammarat and Surathani province) was investigated. Morphological characteristics of fruit and leaf were recorded and DNA from leaf samples were isolated using CTAB buffer for RAPD and microsatellite analysis. From morphological data, recorded leaf shape, petioles wing and leaf apices could be distinguished to 5, 4 and 4 type, respectively. For molecular analysis, twenty-three 10-base oligonucleotide primers for RAPD were first screened and 7 primers (OPA-04, OPAN-12, OPB-05, OPB-12, OPC-02, OPC-08 and OPR-04) that generated clear polymorphic fragments were chosen for genetic analysis in 77 accessions of *Citru*s spp. A total of 109 amplified fragments were obtained from 7 primers with an average of 15.57 fragments for each primer. From all fragments, 106 were polymorphic fragments (97.25%). Four microsatellite markers, AC01, AG14, CAG01 and GT03 produced total 116 amplified fragments, all fragments were polymorphic with an average of 29 fragments per primer. Dendrograms showing genetic similarities among *Citrus* spp. were constructed based on polymorphic bands of RAPD and microsatellite using UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average). Cluster analysis was performed by the NTSYS (Version 2.1). Based on RAPD and microsatellite techniques, 77 samples could be separated into 6 groups with similarity coefficients ranging from 0.569-0.991. The results indicated a wide genetic diversity of *Citrus* spp. in Southern Thailand. No specific fragment common to any group of samples was obtained from the present study. Results from microsatellite and RAPD markers indicated that four Junkra (unknown species) were grouped to the same cluster of *C. reticulata* Blanco, *C. sinensis* Osbeck and *C. nobilis*

Lour. Another sample (called as an unknown species) was classified in the same clustered with pummelo: *C. maxima* (Burm.) Merr.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	12
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	13
วัสดุและอุปกรณ์	13
วิธีการ	17
3. ผล	24
4. วิจารณ์	55
5. สรุป	62
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	69
ประวัติผู้เขียน	78

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ชนิด จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างส้มที่พบในภาคใต้ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี และไมโครแซทเทลไลท์ 19

2 รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 23 ไพรเมอร์ 32

3 ชนิดของไพรเมอร์ที่คัดเลือก ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในพืชสกุลส้ม 32

4 เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในประชากรพืชสกุลส้มชนิดต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี 38

5 ชนิดของไพรเมอร์ที่คัดเลือก ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ในพืชสกุลส้ม 43

6 เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในประชากรพืชสกุลส้มชนิดต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ 47

ตารางภาคผนวกที่

1 ชื่อเต็ม และคำย่อที่ใช้ในการกำหนดชื่อพืชสกุลส้มที่ใช้ในการศึกษา 73

2 ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ ลำดับเบสของไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทดสอบอาร์เอพีดี- พีซีอาร์กับดีเอ็นเอของพืชสกุลส้ม 76

3 ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ ลำดับเบสของไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทดสอบ ไมโครแซทเทลไลท์-พีซีอาร์ กับดีเอ็นเอของพืชสกุลส้ม 77

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	วงศ์ย่อย Aurantioideae	4
2	ความสัมพันธ์ภายใน และระหว่างพืชสกุลส้มบางชนิดกับสกุลใกล้เคียง	5
3	ลักษณะรูปร่างแผ่นใบของพืชสกุลส้ม	25
4	แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ เมื่อจำแนกตามลักษณะรูปร่างแผ่นใบ	25
5	ลักษณะรูปร่างก้านใบ	26
6	แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ เมื่อจำแนกตามลักษณะรูปร่างก้านใบ	27
7	ลักษณะรูปร่างปลายใบ	28
8	แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ เมื่อจำแนกตามลักษณะปลายใบ	28
9	ตัวอย่างลักษณะผลส้มแต่ละชนิด	30
10	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดีเมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAN-12	33
11	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPA-04	34
12	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-05	34
13	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-12	35
14	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-02	35
15	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-08	36
16	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPR-04	36

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
17	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของพืชสกุลส้มจำนวน 77 ต้น จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์	41
18	แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี	42
19	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เมื่อใช้ไพรเมอร์ AC01	44
20	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เมื่อใช้ไพรเมอร์ AG14	44
21	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เมื่อใช้ไพรเมอร์ CAG01	45
22	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เมื่อใช้ไพรเมอร์ GT03	45
23	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของพืชสกุลส้มจำนวน 77 ต้น จากการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ด้วยไพรเมอร์จำนวน 4 ไพรเมอร์	50
24	แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ จากการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์	51
25	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของพืชสกุลส้มจำนวน 77 ต้น จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์	53
26	แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์	54

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การอนุรักษ์พันธุ์พืชในท้องถิ่นนับว่ามีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องในปัจจุบัน อีกทั้งการขาดการส่งเสริม และสนับสนุนจากรัฐบาลทำให้พืชพันธุ์พื้นเมืองหลายชนิดถูกทำลายและสูญหาย ส้มพื้นเมืองก็เป็นหนึ่งในพืชพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ที่กำลังประสบปัญหาดังกล่าวอย่างเห็นได้ชัด ส่วนใหญ่ในประเทศไทยจะปลูกเพื่อบริโภคในครัวเรือนไม่ได้ปลูกเพื่อการค้า (Chomchalow, 1984) เกษตรกรได้โค่นล้มสวนผลไม้เหล่านี้ มาทำการปลูกยางพาราและปาล์มน้ำมันแทน เนื่องจากผลตอบแทนที่ได้สูงกว่า อีกทั้งยังมีการเข้าทำลายของโรคหลายชนิดจึงทำให้ส้มพันธุ์พื้นเมืองลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วในระยะไม่กี่ปีที่ผ่านมา อีกสาเหตุหนึ่งก็คือ รสชาติของพันธุ์พื้นเมืองไม่เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายของผู้บริโภค วิจิตต์และคณะ (2529) รายงานว่าในพื้นที่ของอำเภอหาดใหญ่มีการปลูกส้มโอพันธุ์สีดอกคำและพันธุ์คลานร่วมกับการปลูกส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่มานาน แต่ส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่มีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของตลาดมากกว่า ทำให้มีการทำลายส้มโอพันธุ์สีดอกคำและพันธุ์คลานให้เหลือน้อยลง พืชพันธุ์พื้นเมืองหลายชนิด แม้ยังไม่มีศักยภาพในเชิงเศรษฐกิจ แต่อาจมีลักษณะบางประการที่สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์หรือใช้ประโยชน์ในอนาคตได้ ดังนั้นการรักษาความหลากหลายของพืชท้องถิ่นจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง จากปัญหาดังกล่าวคณะทรัพยากรธรรมชาติจึงสนับสนุนให้มีการดำเนินงานวิจัยการเก็บรวบรวมพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์พืชท้องถิ่นภาคใต้ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 เป็นต้นมา และส้มก็เป็นอีกสกุลหนึ่งที่อยู่ในโครงการดังกล่าว นอกจากการเก็บและการอนุรักษ์แล้ว การศึกษาพันธุกรรมพืชที่เก็บรวบรวมนับเป็นสิ่งที่มีความสำคัญยิ่ง

การศึกษาพันธุกรรมพืชและการจำแนกกลุ่มพืช สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาโดยอาศัยความแตกต่างของสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าพืชเหล่านั้นมีลักษณะใกล้เคียงกันการจำแนกหรทอแยกความแตกต่างทำได้ยาก Dehesdtani และคณะ (2007) รายงานว่าพืชตระกูลส้มประกอบด้วย 6 สกุลใหญ่ ซึ่งทั่วโลกมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ยิ่งในบางสายพันธุ์ยังเป็นที่ถกเถียงกัน

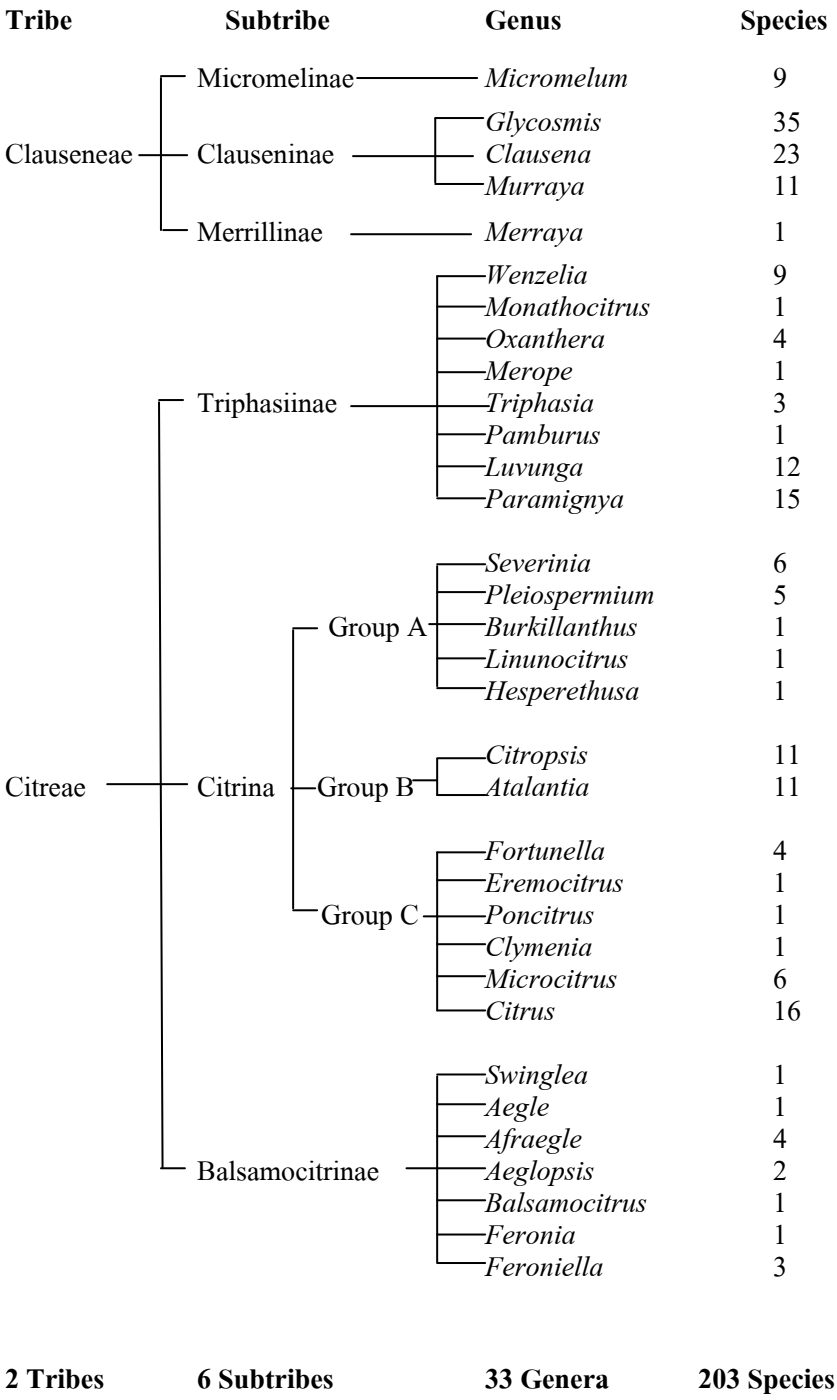
อยู่ เป็นผลทำให้เกิดความซับซ้อน และยุ่งยากในการจำแนกหมวดหมู่ ระบบที่นำมาใช้ในการจำแนกพืชสกุลส้มมีอยู่เป็นจำนวนมาก Swingle (1943) แบ่งพืชสกุลส้มออกได้ 16 ชนิด ในขณะที่ Tanaka (1977) แบ่งส้มออกได้ถึง 162 ชนิด อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพืชสกุล *Citrus* ประกอบด้วยส้มเพียง 4 ชนิด คือซิตรอน (*Citrus medica* L.) แมนดาริน (*C. reticulata* Blanco) และส้มโอ [*C. grandis* (L.) Osb., *C. maxima* (Burm.) Merr.] และ *C. halimii* Stone (Barrett and Rhodes, 1976) นอกเหนือจาก 4 ชนิดนี้ จะเป็นส้มลูกผสมที่เกิดมาจากการผสมข้ามกันเองของส้มทั้ง 4 ชนิด จากความซับซ้อนในการจำแนกพืชสกุลส้มดังที่ได้กล่าวมาแล้ว การนำเทคนิคทางด้านโมเลกุลเข้ามาช่วยจะทำให้การศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวมีความชัดเจน และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เทคนิคอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์เป็นหนึ่งในหลายเทคนิคที่สามารถทำได้รวดเร็ว ไม่ซับซ้อน มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายได้ทางพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ตรวจเอกสาร

1. ถิ่นกำเนิด และระบบการจำแนกพืชตระกูลส้ม

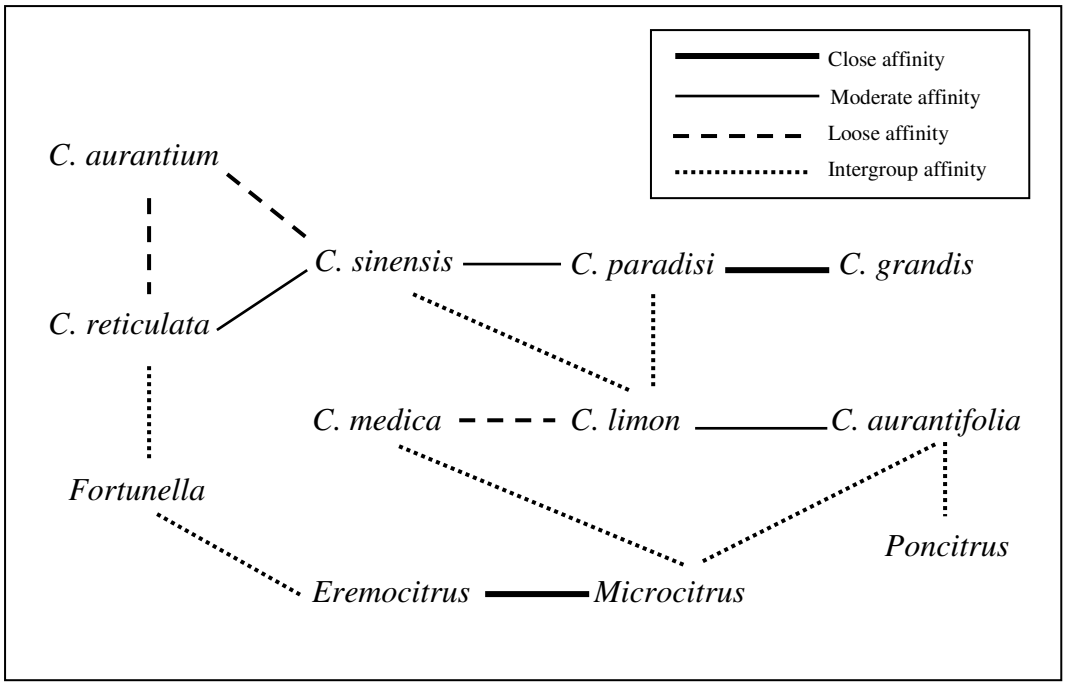
มงคล (2535) รายงานว่าถิ่นกำเนิดของพืชในสกุลส้มหลายชนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ แถบตอนใต้ของประเทศจีนหรือหมู่เกาะมาลายู โดยเชื่อกันว่าประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดของพืชตระกูลส้มแห่งหนึ่งด้วยเช่นกัน จากรายงานของ Chomchalow (1984) รายงานว่าส้มที่มีมาตั้งแต่ยุคแรกๆ ในประเทศไทยซึ่งเป็นพันธุ์ป่าได้แก่ ส้มโอผี (*Citrus macroptera* Montrouz.) และมะส้าน (*C. ichangensis*) นอกจากนี้ยังพบว่า การปลูกส้มได้แพร่กระจายไปยังประเทศต่างๆในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน ซึ่งมีความชื้นและสภาพอากาศที่เหมาะสม พื้นที่การปลูกส้มของโลกอยู่ที่บริเวณเส้นรุ้งที่ 37 องศาใต้ ถึง 44 องศาเหนือ (Nicolosi *et al*, 2000)

ส้มจัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae สกุล *Citrus* มีทั้งหมด 7 วงศ์ย่อย วงศ์ย่อยที่สำคัญคือ Aurantioideae ในวงศ์ย่อยนี้แบ่งได้ทั้งหมด 33 สกุล และมีมากกว่า 215 ชนิด (Mukhopadhyay, 2004; Davies and Albrigo, 1994) Nicolosi (2007) รายงานว่าวงศ์ย่อย Aurantioideae ประกอบด้วย 33 สกุล 203 ชนิด แบ่งออกเป็น 2 เผ่า (tribes) ได้แก่ เผ่า Clauseneae ประกอบไปด้วย 5 สกุล และเผ่า Citreae ประกอบด้วย 28 สกุล ได้แก่ สกุล *Citrus* และสกุลใกล้เคียง ยกตัวอย่างเช่น *Fortunella*, *Poncitrus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* และ *Clymenia* เป็นต้น (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตามการจัดจำแนกพืชสกุลส้มเพื่อ แบ่งเผ่า เผ่าย่อย สกุล และชนิด ภายใน วงศ์ย่อย Aurantioideae ยังมีข้อขัดแย้ง ทั้งนี้เป็นเพราะส้มหลายชนิดผสมข้ามกันทั้งภายนอกและในสกุลเดียวกันมาเป็นระยะเวลากว่าศตวรรษ Nicolosi (2007) รายงานว่าสามารถแบ่งส้มในสกุล *Citrus* ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 2 สกุลย่อย ได้แก่ *Eucitrus* และ *Papeda* ออกจากกันได้อย่างชัดเจนโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีของ ดอก ใบ และผล สกุลย่อย *Eucitrus* ดอกและเกสรตัวเมียมีกลิ่นหอม มีก้านใบและปีกใบ (winged petioles) เล็ก ไม่ถึง 3 ใน 4 ของแผ่นใบ และผลรับประทานสดได้ ตรงข้ามกันกับสกุลย่อย *Papeda* ส้มในสกุลย่อยนี้มีก้านใบและปีกใบใหญ่ ผลรับประทานสดไม่ได้เพราะมีรสขมและมีน้ำมันอยู่ในถุงน้ำหวานมาก Spiegel-Roy และGoldschmidt (1996) รายงานว่าถึงความสัมพันธ์ภายใน และระหว่างพืชสกุลส้มบางชนิดกับสกุลใกล้เคียง (รูปที่ 2) ยกตัวอย่างเช่น เป็นไปได้ว่าเกรฟฟรุทเกิดจากการกลายพันธุ์ของส้มโอ หรืออาจเกิดจากการผสมกันระหว่างส้มสวีทออเรนซ์ (*C. sinensis*) และ ส้มโอ (*C. grandis*) เป็นต้น



รูปที่ 1 วงศ์ย่อย Aurantioideae

ที่มา : Nicolosi (2007)



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ภายใน และระหว่างพืชสกุลส้มบางชนิดกับสกุลใกล้เคียง
ที่มา : Spiegel-Roy และ Goldschmidt (1996)

2. ลักษณะประจำพันธุ์

แม้ว่าถิ่นเดิมของพืชตระกูลส้มจะอยู่ในเอเชียอาคเนย์ แต่ได้มีการนำไปปลูกแพร่หลายในหลายท้องถิ่นเป็นเวลานาน จนกลายเป็นพืชสำคัญของท้องถิ่นนั้นๆ ไป สำหรับในประเทศไทยมีการปลูกพืชตระกูลส้มหลายชนิด ส้มที่ปลูกเป็นการค้า ได้แก่ ส้มเขียวหวาน (mandarin orange) ส้มโอ (pummelo) ส้มเกลี้ยง (sweet orange) มะนาว (common lime) และส้มจุก (neck orange) มีการจัดแบ่งกลุ่มของส้มตามหลักทางพืชสวน โดยอาศัยความสำคัญทางเศรษฐกิจ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ (มงคล, 2535) คือ

1. กลุ่มออเรนซ์ (orange) เป็นกลุ่มใหญ่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดในโลก มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย ทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดียทางแถบธิเบตไปจนถึงจีนและพม่า ส้มในกลุ่มนี้ที่พบในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ด้วยกัน เช่น ส้มตรา ส้มเกลี้ยง ส้มมือ เป็นต้น ในกลุ่มออเรนซ์นี้จะแบ่งออกเป็น

1.1 สวีทออเรนซ์ (sweet orange) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *C. sinensis* Osbeck ลำต้นมีขนาดปานกลางสามารถโตได้ถึง 12 เมตร ใบมีขนาดปานกลางมีวิงแคบ ดอกมีสีขาว มีก้านชูเกสรตัวผู้ 20-25 อัน รังไข่มี 10-14 ช่อง รูปร่างผลจะเป็นแบบ spheroid ผลมีสีส้มไปจนถึงสีแดง ลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีสีขาว (Doijode, 2001) Natividade และคณะ (2000) รายงานว่า ส้มในกลุ่ม

Sweet orange เมื่อนำมาจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่าง ขนาด สีผล จำนวนเมล็ดต่อผล ฤดูกาลในการออกดอก สามารถจำแนกส้มในกลุ่มนี้ได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ Common orange, Acidless, Blood และ Navel orange

1.2 ซาวออเรนซ์ (sour orange) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ใบเป็นแบบ ovate มีขนาดปานกลางและมีวิงกว้าง ดอกสีขาวขนาดใหญ่ มีก้านชูเกสรตัวผู้ 20-25 อัน รังไข่มี 10-12 ช่อง เปลือกผลหนาและขรุขระ ซาวออเรนซ์ใช้เป็นต้นตอให้กับสวีทออเรนซ์ เลมอน และเกรฟฟรุต (Doijode, 2001) มงคล (2535) กล่าวว่า ซาวออเรนซ์ และสวีทออเรนซ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก แตกต่างกันเล็กน้อยที่ใบของซาวออเรนซ์จะมีสีเข้มกว่า มีก้านใบยาว และวิงกว้างกว่า ลักษณะผลแบนและสีเข้มกว่า มีเปลือกหนากว่าสวีทออเรนซ์ ลักษณะลำต้นสูงใหญ่และมีหนามมาก สามารถทนต่อสภาพอากาศที่เย็นจัดหรือร้อนได้ดีกว่าส้มพันธุ์อื่น

2. กลุ่มแมนดาริน (mandarin) ส้มในกลุ่มนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในเขตร้อน มีลักษณะผลใกล้เคียงกับกลุ่มออเรนซ์ ส้มกลุ่มแมนดารินมีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย ทางแคว้นอัสสัม บางพันธุ์มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางอินโดจีน ลำต้นมีขนาดเล็กไปจนถึงขนาดกลางมีหนามเล็กน้อย ใบมีขนาดเล็กและมีก้านใบแคบ ดอกมีสีขาวขนาดเล็ก ก้านชูเกสรตัวผู้มี 20 อัน รังไข่มี 10-15 ช่อง รูปร่างผลเป็นแบบ oblate ผลสุกมีสีส้มแดง เขียว หรือเหลือง เปลือกบาง เมล็ดมีขนาดเล็ก ลำต้นเหนือใบเลี้ยงมีสีเขียว (Doijode, 2001) ส้มในกลุ่มนี้ที่พบในประเทศไทยมีหลายพันธุ์เช่น ส้มจุก ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มแก้ว เป็นต้น (มงคล, 2535)

3. กลุ่มส้มโอ และเกรฟฟรุท (pummelo and grapefruit) ส้มโอมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *C. grandis* (L.) Osbeck (Nicolosi *et al*, 2000) หรือ C. *maxima* (Burm.) Merr. (Corazza-Nunes *et al*, 2001) วิจิตต์ (2544) รายงานว่า แม้ว่าชื่อชนิดของส้มโอทั้ง 2 คำ คือ grandis และ maxima แตกต่างกัน แต่ให้ความหมายคล้ายกันคือแปลว่าใหญ่โต ฉะนั้นชื่อวิทยาศาสตร์ของส้มโอ *C. grandis* และ *C. maxima* จึงหมายถึงส้มที่มีขนาดใหญ่หรือส้มผลโต ส่วนเกรฟฟรุทมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *C. paradise* Macfad. ทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกันโดยเฉพาะลำต้นและทรงพุ่ม รูปร่างผลเป็นแบบ oblate แตกต่างกันที่ส้มโอมีลำต้นใหญ่และแข็งแรง แต่เกรฟฟรุทมีทรงพุ่มเล็กกว่าส้มโอ Gmitter (1995) อ้างโดย วิจิตต์ (2544) รายงานว่าความแตกต่างที่เห็นได้ชัดระหว่างเกรฟฟรุทและส้มโอคือ เกรฟฟรุทมีต้นอ่อนต่อเมล็ดมากกว่า 1 ต้น (polyembryony) ในขณะที่ส้มโอมีต้นอ่อนต่อ 1 เมล็ด เพียงต้นเดียว ส้มโอเป็นไม้ผลเขตร้อน สันนิษฐานว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในบริเวณคาบสมุทรมาลายาไปจนถึงคาบสมุทรอินเดียด้านตะวันออก ต่อมาได้มีผู้นำส้มโอจากแหล่งกำเนิดไปปลูกในที่อื่นๆ ทำให้มีการกระจายพันธุ์ของส้มโอไปยังบริเวณใกล้เคียง เช่น ประเทศอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ จีนตอนใต้ ญี่ปุ่น ฯลฯ และบริเวณที่ห่างไกล

ออกไป เช่น เอเชียกลาง ยุโรปตอนใต้ หมู่เกาะอินเดียตะวันตก และอเมริกาเหนือ (วิจิตต์, 2544) นอกจากนี้ในการสำรวจแหล่งพันธุกรรมของส้มโอในบริเวณที่ถือว่าเป็นถิ่นกำเนิดคือ ภาคใต้ของประเทศไทยและภาคเหนือของประเทศมาเลเซีย พบว่าบริเวณภาคใต้ของประเทศไทยมีการกระจายพันธุ์ของส้มโอสูงมาก และเชื่อว่าเป็นศูนย์กลางถิ่นกำเนิดของส้มโอ (Akihama *et al.* ,1985 อ้างโดย วิจิตต์, 2544) ส้มโอมีผลขนาดใหญ่ที่สุดในสกุล *Citrus* (Moore, 2001) สำหรับพันธุ์ส้มโอที่พบในภาคใต้ของไทย ได้แก่ พันธุ์หอมหาดใหญ่ พันธุ์สีดอกคำ และพันธุ์คลาน เป็นต้น

4. กลุ่มที่ผลมีรสเปรี้ยว ในกลุ่มนี้จะประกอบด้วย ซิตรอน (Citron) เลมอน (Lemon) และไลม์ (Lime) ชนิดที่พบในประเทศไทยจะเป็นกลุ่มของไลม์หรือมะนาว มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย พม่า และไทย ตลอดจนถึงประเทศมาเลเซีย (มงคล, 2535)

4.1 ซิตรอน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *C. medica* L. เป็นพันธุ์ที่แตกต่างจากส้มพันธุ์อื่นๆ ทั้งลักษณะลำต้นและผล มีอายุสั้น ต้นเล็ก มีหนามมาก เปลือกเป็นสีเทา ลักษณะเนื้อไม้เป็นไม้เนื้ออ่อน และไม่ทนทานต่อสภาพอากาศเย็นจัด ใบมีขนาดใหญ่รูปแบน ขอบใบหยัก ก้านใบสั้น ไม่มีวิง ผลมีขนาดใหญ่ ทรงผลยาวรีแบบ oblong คล้ายมะละกอส่วนของก้าน เกสรตัวเมียจะติดบนผลอยู่จนผลแก่ ผิวผลสีเหลือง เปลือกผลชั้นนอกหนามากและเชื่อมติดกับส่วนของผนังพูรังไข่แน่นจนไม่สามารถแยกออกได้ ถุงน้ำหวานมีจำนวนน้อย รสเปรี้ยวจัดและเมล็ดมาก

4.2 เลมอน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *C. limon* (L.) Burm.f. ในประเทศไทยเรียกว่ามะนาวฝรั่ง ลักษณะทั่วไปของเลมอน มีลำต้นแข็งแรง ทรงพุ่มขนาดใหญ่ หนาวเรียวสั้น ใบสีเขียวอ่อนอมเหลืองเป็นแบบ lanceolate ก้านใบมีวิง ลักษณะผลมีสีเขียวอมเหลือง ผลยาวเรียว ลักษณะประจำพันธุ์ที่เด่นชัดคือ ส่วนปลายผลนูนสูงขึ้น เรียกว่า นิบเปิ้ลหรือ apical mamilla (มงคล, 2535)

4.3 ไลม์ หรือมะนาว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *C. aurantifolia* (Christm.) Swing มะนาวเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ลำต้นมีลักษณะเป็นทรงพุ่ม แผ่กิ่งก้านสาขาออกรอบๆ ต้นค่อนข้างไม่เป็นระเบียบ มีอายุหลายปี ความสูงของลำต้นขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ที่ปลูก (ศุภกิจ, 2540) ลำต้นมีหนามคม ใบมีขนาดเล็ก รูปร่างใบเป็นแบบ ovate ดอกมีสีขาวขนาดเล็ก มีก้านชูเกสรตัวผู้ 20-25 อัน รังไข่มี 9-12 ช่อง ผลมีขนาดเล็กรูปร่างผลเป็นแบบ prolate ผลมีสีเหลืองหรือเขียว และประกอบด้วยต่อมน้ำมันเป็นจำนวนมาก (Doijode, 2001) พันธุ์มะนาวที่ปลูกในประเทศไทย มีหลายพันธุ์ได้แก่ มะนาวหนัง มะนาวไข่ มะนาวควาย เป็นต้น

3. การใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการจำแนกพันธุ์พืช

สุรินทร์ (2545) รายงานว่าที่มาของการศึกษาเครื่องหมายหรือ marker ก็เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่างและภายในสปีชีส์ระหว่างและภายในประชากรหรือแต่ละต้น การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตใช้วิธีเปรียบเทียบกับลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะใบ ดอก สีใบ สีดอก รูปร่าง และขนาดของผล เป็นต้น วิธีนี้ใช้กันมานาน และยังคงใช้ได้ผลดีในกรณีของสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้พบว่ามักแปรผันไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป อาจทำให้การตรวจสอบผิดพลาดได้ บางครั้งต้องอาศัยความชำนาญเป็นพิเศษ และต้องมีวิธีที่จะบอกจีโนไทป์ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ที่ตรวจสอบได้ ในกรณีของไม้ยืนต้น เช่น ไม้ผลหรือไม้ป่า ซึ่งระยะเวลาจนถึงออกดอกออกผลค่อนข้างยาวนาน จึงต้องใช้เวลามากในการตรวจสอบ อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีการตรวจสอบวิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้ Shaaban และคณะ (2006) ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของส้มหลายชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ ความกว้าง เส้นผ่านศูนย์กลางของผล น้ำหนักผล รูปร่างผล รูปร่างใบ จำนวนเมล็ด และใช้คุณสมบัติทางเคมี ร่วมกับการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการตรวจสอบหาความสัมพันธ์ รัฐพล และคณะ (2551) ตรวจสอบองุ่นพันธุ์ป๊อกดำและริเบียร์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี โดยทำการศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา 67 ลักษณะความต้านทานต่อโรค 3 ชนิด และลักษณะทางชีพลักษณ์ (phenology) 4 ลักษณะ รวมทั้งสิ้น 74 ลักษณะ ร่วมกับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบจำนวน 64 คู่ พบว่าองุ่นทั้ง 2 พันธุ์มีลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาเหมือนกันทุกประการ อีกทั้งยังมีลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีรูปแบบเดียวกัน จึงสรุปได้ว่าองุ่นทั้งสองพันธุ์นี้เป็นพันธุ์เดียวกัน การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีความสำคัญที่จะช่วยยืนยันผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เป็นอย่างดี

4. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาพันธุกรรมพืช

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อเป็นเครื่องมือตรวจสอบในระดับของยีนหรือดีเอ็นเอ เครื่องหมายโมเลกุลเป็นประโยชน์อย่างมากในการแยกสายพันธุ์ สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืช รวมทั้งใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) และหาตำแหน่งของ

ยีน (gene tagging) เครื่องหมายทางโมเลกุล มี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และลำดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของระดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อต่างๆ ในทุกระยะการเจริญเติบโตและสภาพทางสรีรวิทยาโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม การตรวจสอบดีเอ็นเออาจตรวจสอบจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีน และมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ จึงตรวจสอบได้ ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ ให้เลือกมากมายหลายแบบ ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ เช่น เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) อาร์เอพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) เอเอฟแอลพี (AFLP, Amplification Fragment Length Polymorplism) และไมโครแซทเทลไลท์ (microsattellite) เป็นต้น

4.1 เทคนิคอาร์เอพีดี

อาร์เอพีดี (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นวิธีวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์แต่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด หลักการของเทคนิคนี้คือ ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม ส่วนใหญ่ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ และแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในตัวกลางซึ่งเป็นวุ้นอะกาโรสเจล และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (สุรินทร์, 2545) มีการนำเครื่องหมายอาร์เอพีดี มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาและวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์พืช เช่น Sugawara และ Oowada (1995) ทำการจำแนกส้มที่เกิดเพอริคลินอลไคเมอราด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่ามีไพรเมอร์ 12 ไพรเมอร์จาก 124 ไพรเมอร์ ได้แก่ A-00, A-19, B-04, B-39, B-41, B-73, C-11, C-31, C-64, C-82, C-88 และ C-89 สามารถแยกส้มที่เกิดไคเมอราได้ ธีระชัย และนฤมล (2542) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ส้มโอในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างส้มโอ 18 สายพันธุ์มาตรวจสอบกับไพรเมอร์ 144 ชนิด พบว่ามี ไพรเมอร์ 131 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หรือคิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเลือกไพรเมอร์ 30 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของส้มทั้งหมด พบว่า สามารถ

แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ โดยสามารถแยกความแตกต่างของส้มโอ 18 สายพันธุ์ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว Corazza-Nunes และคณะ (2001) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเกรฟฟรุท 38 สายพันธุ์และส้มโอ 3 สายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้ไพรเมอร์ 198 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ คิดเป็น 49 % ของไพรเมอร์ทั้งหมดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างส้มโอและเกรฟฟรุทมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ สห และคณะ (2546) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาความสัมพันธ์ของส้มโชกุน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายน้ำผึ้ง สายสมรเบอร์ 1 เพชรยะลา น้ำผึ้งทอง และสายน้ำผึ้งธนาธร โดยใช้ไพรเมอร์ 28 ไพรเมอร์ พบว่า มี 2 ไพรเมอร์ คือ OPB-05 และ OPB-20 ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ จากข้อมูลดังกล่าวทำให้แยกความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มทั้ง 5 สายพันธุ์แบ่งออกได้ 2 กลุ่ม คือ ส้มสายน้ำผึ้งกับส้มน้ำผึ้งทอง มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ส่วนส้มสายสมรเบอร์1 กับส้มเพชรยะลามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าส้มสายน้ำผึ้งธนาธร จรัสศรี และคณะ (2546) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ และพันธุ์พื้นเมืองในเขตจังหวัดสงขลาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี เพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ จำนวน 85 ตัวอย่าง รวมทั้งพันธุ์พื้นเมือง 15 ตัวอย่าง ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ 5 ชนิด จากจำนวนไพรเมอร์ 88 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันชัดเจน Mariniello และคณะ (2004) จำแนกเลมอน (*C. limon* (L.) Burm.f.) ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 44 ไพรเมอร์ พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ที่ให้แถบจำเพาะเจาะจงกับเลมอน 4 สายพันธุ์ คือ OL2 และ OL16 สามารถจำแนกเลมอนสายพันธุ์ Sorrento ออกจากเลมอนสายพันธุ์อื่นได้ ไพรเมอร์ OL14 ให้แถบที่จำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ Amalfi OL31 ให้แถบที่จำเพาะเจาะจง Gloria' d Amalfit และ OL13 ให้แถบที่จำเพาะเจาะจงกับ Procida

นอกจากส้มแล้วในพืชชนิดอื่นมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น เฉลิมพล (2539) ได้จำแนกสายพันธุ์พลับ จำนวน 29 พันธุ์ โดยที่พันธุ์ Fuyu เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาทดลองปลูกจากหลายๆ ประเทศ การมีชื่อที่ซ้ำกันจึงใส่หมายเลขต่างๆ เอาไว้ ซึ่งภายหลังพบว่า Fuyu มีอยู่หลายหมายเลขด้วยกัน และต้องการที่จะทราบว่ามีความเหมือนมากหรือน้อยเพียงใด จึงใช้เทคนิคอาร์เอพีดี มาช่วยพิจารณาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ พบว่า Fuyu No.12 Fuyu No.9 Fuyu No.1 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน 85 เปอร์เซ็นต์ ธีรชัย และ นฤมล (2543) พบว่า มีไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะจำเพาะกับพริกแต่ละสายพันธุ์ซึ่งทำการทดลองจำนวน 14 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำไพรเมอร์ดังกล่าวไปใช้จำแนกพันธุกรรมของพริกจำนวน 14 สายพันธุ์นั้นได้ Dey และคณะ (2006) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะระ (bittle gourd) โดยศึกษา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะระนั้นมีความหลากหลายทั้งทางด้านขนาด รูปร่าง และสีผล เมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์ OPW03, OPW05 และ OPX01 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ธีระชัย (2550) ทำการจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 192 ชนิด พบว่า มีไพรเมอร์ 160 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่มีเพียงไพรเมอร์ OPU-10 เพียงไพรเมอร์เดียวเท่านั้นที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังออกจากกันได้

4.2 เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำสั้นมากเพียง 1-4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเบสซ้ำขนาดสั้นๆ ไม่ซับซ้อนจึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) โดยเบสซ้ำหนึ่งเบส เรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น $(A)_n$ ซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น $(CA)_n$ ซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น $(TAA)_n$ โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำ ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนมประมาณ 10^4-10^5 แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นการอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่มีในไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งเดียวกันในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างไม่เท่ากันซึ่งจะตรวจสอบได้ทันทีเมื่อนำมาแยกขนาดได้โดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ปัจจุบันมีการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอกันมากในการศึกษาแผนที่ของจีโนม และแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้การเพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์ จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก ไม่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีคุณภาพดีมากนัก ผลการตรวจสอบก็ยังมีความแม่นยำสูง (สุรินทร์, 2545) มีความเฉพาะเจาะจงให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูง สามารถแยกความแตกต่างได้ดี

Carlos และคณะ (2000) ได้ใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ในการจำแนกต้นกล้าของส้ม 2 กลุ่มที่เป็น zygotic และ nucellar embryo พบว่า ตัวอย่างของต้นกล้าส้มที่เป็น zygotic ทั้งหมดมีจีโนไทป์ที่ต่างจากไปจากต้นแม่ Barkley และคณะ (2006) ใช้เทคนิคไมโครแซทเทล

ไลท์ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมส้มที่เก็บรวบรวมใน The Citrus Variety Collection (CVC) มหาวิทยาลัยแคลิฟอเนีย โดยเลือกส้มจากสกุลต่าง ๆ จำนวน 370 ชนิด ใช้ 24 ไพร์เมอร์ได้แก่ CAC23, TAA27, TAA15, TAA41, CAC39 TAA3, CAC33, CAC15, TAA33, CAGG9, CMS4, CMS7, CMS8, ATC09, GT03, CT19, AC01 CCT01, CAT01, AG14, CT21, CTT01, CT02 และ CAG01 ในการแยกความแตกต่าง พบว่าทั้ง 24 ไพรเมอร์สามารถแยกความแตกต่างระหว่างส้มหลาย ๆ ชนิดได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างส้มในกลุ่มสวีทออเรนซ์ คลีเมนไทน์ (clementines) ซัสซูมา และกลุ่มที่มีรสเปรี้ยว ออกจากกันได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากส้มเหล่านี้เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ เสาวณี และ อุณารุจ (2551) ทำการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของส้มโอในประเทศไทย จำนวน 53 พันธุ์ และเกรฟฟรุท 1 พันธุ์ ที่เก็บรวบรวมจากเขตภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์ที่เป็นพันธุ์ทางการค้าและพันธุ์ที่เป็นพันธุ์พื้นเมือง ด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวน 13 ไพรเมอร์ (13 ตำแหน่ง) พบว่าเครื่องหมาย SSR จำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ AC01, AG14, CMS4, CMS24, CT19, GT03, P73, P620, P1826 และ TAA41 สามารถอ่านผลได้ชัดเจนและให้ความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของส้มโอ ส่วนเครื่องหมายตำแหน่ง CAC23, CT02 และ CT21 ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของส้มโอได้ เนื่องจากดีเอ็นเอเครื่องหมายในบริเวณนี้ไม่เกิดความแปรปรวนของลำดับเบสซ้ำ และเมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มและสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มส้มโอได้ 8 กลุ่ม โดยที่พันธุ์พื้นเมืองจากภาคเหนือ ภาคใต้และพันธุ์จากต่างประเทศมีลักษณะทางพันธุกรรมต่างไปจากกลุ่มอื่นมากที่สุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มที่พบในภาคใต้
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มในภาคใต้โดยอาศัยเครื่องหมายอาร์เอพีดีและเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์
3. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มสำหรับการใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และประโยชน์ด้านอื่นๆในอนาคต

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

ทำการเก็บตัวอย่างพืชสกุลส้มที่พบได้ในภาคใต้ของประเทศไทย จากสถานที่ต่างๆ ดังนี้

- ตำบล สนามชัย อำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา
- ตำบลกระดังงา อำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลา
- ตำบลควนลัง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
- ตำบลหูแร่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
- ตำบลเกาะยอ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา
- ตำบลป่าชิง อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา
- ตำบลชะอวด อำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช
- ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา
- ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง
- เกาะบางค้างคาว ตำบลเขาไม้แก้ว อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง
- ตำบลบางด้วน อำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง
- บริเวณอุทยานแห่งชาติเขาศก อำเภอพนม จังหวัดสุราษฎร์ธานี

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- CTAB
- β-mercaptoethanol
- Polyvinyl pyrrolidone (PVP-40)
- Sodium chloride (NaCl)
- Disodium ethylene diaminetetraacetate (Na_2EDTA)
- Tris-HCI pH 8.0
- Chloroform
- Isopropanol
- TE buffer
- Ethanol

1.2.2 สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

- Agarose gel electrophoresis
- LE agarose (FMC Bioproduct, USA)
- Seakem agarose (FMC Bioproduct, USA)
- Glacial acetic acid
- Boric acid
- Tris-base
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- Lamda DNA (λ DNA)
- 100 bp และ 500 bp DNA Ladder (Operon, USA)
- denaturing polyacrylamide gel electrophoresis
- Acrylamide : bis-acrylamide solution (29:1)
- Bind silane

- Repel silane
- Formamind
- Formaldehyde
- Urea
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethyethyenediamine)
- Ammonium persulfate
- Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)
- Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- Silver nitrate ($AgNO_3$)

1.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- RAPD Primer จำนวน 23 primer คือ OPA-01, OPA-02, OPA-03,OPA-04, OPA-10, OPA-12, OPA-18, OPB-01, OPB-04, OPB-05, OPB-12, OPB-18, OPB-20, OPC-02, OPC-08, OPC-09, OPC-11, OPC-13, OPE-11, OPE-14, OPN-12, OPR-03, OPR-04 (Operon, USA)
- Microsatellite Primer จำนวน 6 primer คือ AC01, AG14, CAG01, GT03
- $MgCl_2$
- 10X *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase B (Promega, USA)

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างใบพืช

- ถุงพลาสติก
- กรรไกร
- กล่องโฟม
- ปากกาเขียนเครื่องแก้ว

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส และการทำพีซีอาร์

- ตู้เย็นและตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ - 30 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซนตริฟิวก์
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- แท่งแม่เหล็ก
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า
- หม้อนึ่งความดันไอ
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส
- เครื่องพีซีอาร์
- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอดเอฟเพนดอร์ฟ
- ตู้ไมโครเวฟ
- ตู้ดูดควัน
- UV transilluminator
- Tip
- Gel Documentation
- น้ำแข็ง และ กระติกน้ำแข็ง
- เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดต่างๆ

วิธีการ

1. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในสกุลส้ม (*Citrus* spp.) ในภาคใต้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างพืชสกุลส้ม จากบางพื้นที่ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง และจังหวัดสงขลา (ตารางที่ 1) โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง ใบแก่ และผล ทำการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังต่อไปนี้

1. ลักษณะรูปร่างแผ่นใบ (leaf shape) โดยพิจารณาตำแหน่งของส่วนที่กว้างที่สุดของแผ่นใบว่าอยู่ที่ตำแหน่งใด หากส่วนที่กว้างที่สุดของแผ่นใบอยู่บริเวณโคนใบ รูปร่างแผ่นใบจะอยู่ในกลุ่มของ "ovate" หากส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณปลายใบ จะอยู่ในกลุ่มของ "obovate" ถ้าส่วนที่กว้างที่สุดของแผ่นใบอยู่บริเวณกึ่งกลางใบ จะอยู่ในกลุ่ม "elliptic" แต่ถ้าส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ที่ตรงกลาง ๆ ของใบ และขอบใบมีลักษณะที่ขนานกัน รูปร่างของแผ่นใบจะจัดอยู่ในกลุ่ม "oblong" และถ้าใบมีอัตราส่วนความกว้างต่อความยาวเท่ากับ 1:1 ขอบใบโค้ง จะจัดอยู่ในกลุ่ม "orbicular" (ชุมพล, 2551)

2. ลักษณะก้านใบ (Petioles) หากไม่ปรากฏว่ามีก้านใบ จะจัดอยู่ในกลุ่ม "ไม่มีก้านใบ" (Chomchalow, 1984) หากมีก้านใบปรากฏเพียงเล็กน้อย และไม่แผ่ออกกว้าง จะจัดอยู่ในกลุ่ม "มีก้านใบแคบ" (Mukhopadhyay, 2004) หากความกว้างของก้านใบมีขนาดใกล้เคียงหรือแคบกว่าความกว้างของแผ่นใบเล็กน้อย และมีความยาวไม่เกิน 1/2 ของแผ่นใบ จะจัดอยู่ในกลุ่ม "มีก้านใบกว้าง" และหากก้านใบมีขนาดเป็น 2/3 ของแผ่นใบ จะจัดอยู่ในกลุ่ม "มีก้านใบใหญ่" (Chomchalow, 1984)

3. ลักษณะปลายใบ (leaf apices) หากขอบใบที่มาบรรจบตรงปลายยอดมักตรงหรือโค้งมน ทำมุมน้อยกว่า 90 องศา จะอยู่ในกลุ่มปลายแหลม (acute) หากมีลักษณะคล้ายปลายแหลม แต่ขอบใบมักโค้งเว้าสอบเข้ามาเป็นมาตรงปลายยอด จะอยู่ในกลุ่มปลายเรียวแหลม (acuminate) ถ้าปลายใบโค้ง หรือมน หรืออาจมีลักษณะเป็นมุมป้าน (ขอบใบทำมุมมากกว่า 90 องศา) จะอยู่ในกลุ่มปลายมน (obtuse) และหากปลายใบมีลักษณะคล้ายกับปลายมน แต่จะหยักเว้าเข้ามาตื้นๆ ตรงตำแหน่งของเส้นกลางใบ จะอยู่ในกลุ่มปลายเว้าตื้น (retuse) (ชุมพล, 2551)

4. ลักษณะผล (fruit character) จำแนกส้มแต่ละตัวอย่างออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามชื่อวิทยาศาสตร์ โดยยึดหลักในการจำแนกชื่อตามการรายงานของ เต็ม (2523) และ Chomchalow

(1984) การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ ยึดตามแบบสากลในฐานข้อมูล The International Plant Names Index (IPNI)

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชสกุลส้มในภาคใต้ โดยอาศัยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์

2.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของส้มในภาคใต้ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบพืชสกุลส้ม (*Citrus* spp.) จากบางพื้นที่ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง และจังหวัดสงขลา จำนวนทั้งหมด 77 ต้น (ตารางที่ 1) โดยเก็บตัวอย่างใบประมาณ 1-2 ใบต่อต้น ใส่ถุงพลาสติกเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบพืชส้มที่สุ่มเก็บ โดยใช้สารละลาย CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) ซึ่งดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) ใช้ตัวอย่างใบส้มประมาณ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสด บดใน CTAB บัฟเฟอร์ (PVP-40, NaCl, EDTA 0.5 M pH 8.0, CTAB 2%) ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2% ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในโกร่งให้ละเอียด จากนั้นใส่ในหลอดแอฟเพนดอร์ฟ เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารละลายที่แยกชั้นใสดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดแอฟเพนดอร์ฟใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดแอฟเพนดอร์ฟใหม่เติมไอโซโพรพานอล 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ หรือวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ - 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล ความเข้มข้น 70% ที่ผ่านการแช่เย็น 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ 70 ไมโครลิตร [Tris-HCl (pH 7.5) 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA (pH 7.0) 1 มิลลิโมลาร์] ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ตารางที่ 1 ชนิด จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างส้มที่พบในภาคใต้ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี และไมโครแซทเทลไลท์

ชนิด	สถานที่เก็บ	จำนวน (ต้น)
ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.)	อำเภอปะเหลียน จ. ตรัง	2
ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr	อำเภอสิเกา จ. ตรัง	1
ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.)	อำเภอเมือง จ. สงขลา	1
ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.)	อำเภอจะนะ จ. สงขลา	2
ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	14
ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.)	สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง จ. สงขลา	1
ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.)	คณะทรัพยากรธรรมชาติ จ. สงขลา	1
ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.)	อุทยานแห่งชาติเขาศก จ. สุราษฎร์ธานี	1
ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.)	อำเภอชะอวด จ. นครศรีธรรมราช	2
ส้มแป้นขี้ม้า (*C. reticulata* Blanco)	อำเภอสทิงพระ จ. สงขลา	4
ส้มแป้นขี้ม้า (*C. reticulata* Blanco)	สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง จ. สงขลา	1
ส้มแป้นขี้ม้า (*C. reticulata* Blanco)	อำเภอชะอวด จ. นครศรีธรรมราช	1
ส้มเขียวหวาน (*C. reticulata* Blanco)	อุทยานแห่งชาติเขาศก จ. สุราษฎร์ธานี	1
ส้มโชกุน (*C. reticulata* Blanco)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1
ซัสซูมา (*C. reticulata* Blanco)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1
เจซี (*C. reticulata* Blanco)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1
คลีโอพัตรา (*C. reticulata* Blanco)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1
มะนาวพวง (*C. medica* L.)	อำเภอหาดใหญ่ จ. สงขลา	2
ส้มมือ (*C. medica* L.)	อำเภอหาดใหญ่ จ. สงขลา	1
ส้มมือ (*C. medica* L.)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1
ส้มมือ (*C. medica* L.)	สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง จ. สงขลา	1
มะนาวไข่แพะ (*C. medica* L.)	อำเภอหาดใหญ่ จ. สงขลาอำเภอ	12
มะนาวควาย (*C. medica* L.)	หาดใหญ่ จ. สงขลา	1
มะนาวพิมพ์พร(*C. medica* L.)	คณะทรัพยากรธรรมชาติ จ. สงขลา	1
มะนาวเปลือกหนา (*C. medica* L.)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิด	สถานที่เก็บ	จำนวน (ต้น)
มะงั่ว (*C. medica* L.)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1
มะงั่ว (*C. medica* L.)	สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง จ. สงขลา	1
มะนาว (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle)	อุทยานแห่งชาติเขาศก จ. สุราษฎร์ธานี	1
มะนาว (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	3
มิดถัง (*C. sinensis* Osbeck)	อำเภอหาดใหญ่ จ. สงขลา	1
มะกรูด (*C. hystrix* DC.)	อำเภอชะอวด จ. นครศรีธรรมราช	2
มะกรูดหวาน (*C. aurantium* L.)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	2
มะกรูดหวาน (*C. aurantium* L.)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1
มะกรูดหวาน (*C. aurantium* L.)	สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง จ. สงขลา	9
ส้มจุก (*C. nobilis* Lour.)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1
ส้มจุกใหญ่ (*C. nobilis* Lour.)	อำเภอหาดใหญ่ จ. สงขลา	1
ส้มหัวเสือ (*C. nobilis* Lour.)	อำเภอหาดใหญ่ จ. สงขลา	1
ส้มโอผี (*C. macroptera* Montrouz.)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	1
เลมอน (*C. limon* (L.) Burm.f.)	อำเภอเมือง จ. สงขลา	2
จังกระ (Unknown species)	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จ. ตรัง	2
จังกระ (Unknown species)	สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง จ. สงขลา	1
ไม่ทราบชื่อ (Unknown species)	เกาะบางค้างคาว อำเภอกันตัง จ. ตรัง	
รวม		**77**

2.3 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็คโตรโฟรีซิสบนอะกาโรส (LE Agarose, Promega,USA) เข้มข้น 0.75% แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation

2.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมส้มในภาคใต้โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

ทำการทดสอบไพรเมอร์ขนาด 10 เบสจากที่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน จำนวน ทั้งสิ้น 23 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA-01, OPA-02, OPA-04, OPA-05, OPA-06, OPA-12, OPA-18, OPB-01, OPB-04, OPB-05, OPB-12, OPB-18, OPC-02, OPC-05, OPC-08, OPC-09, OPC-11, OPC-13, OPE-11, OPE-14, OPN-12, OPR-03 และOPR-04 (Operon, USA) คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และทำการแยกความแตกต่างระหว่างตัวแทนของกลุ่มประชากรต่างๆ ของพืชสกุลส้ม เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต 10X *Taq* บัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTP เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ตั้งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ อุณหภูมิที่ใช้เริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 41 รอบ ด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 37 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และรอบสุดท้ายตามด้วย 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที หลังทำพีซีอาร์ นำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว จำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้น LE อะกาโรส ที่มีความเข้มข้น 1.5% ละลายใน TBE บัฟเฟอร์ (Tris Base, Boric acid, Na_2EDTA 0.5 โมลาร์; pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ 60 นาที ย้อมแถบ ดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำ 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ และให้แถบดีเอ็นเอ ที่มีความแตกต่างระหว่างตัวแทนประชากร

2.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมส้มในภาคใต้โดยใช้เทคนิคเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

ทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำไมโครแซทเทลไลท์ในพืชสกุลส้ม จากการศึกษาของ Barkley และคณะ (2006) ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ 6 ชนิด คือ AC01, AG14 CAG01, CTT01, CT19 และGT03 นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 ชนิด ซึ่งเป็น forward และ reverse โดยวิธีพีซีอาร์ จากปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 20 นาโนกรัม ไพรเมอร์แต่ละชนิดเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 0.7 ยูนิต 10X *Taq* บัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร dNTP เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ตั้งอุณหภูมิในแต่ละไพรเมอร์ดังนี้

ไพรเมอร์ AC01 มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิที่ใช้เริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการทำ touch-down พีซีอาร์ ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที (และลดอุณหภูมิลงถึง 43 องศาเซลเซียส ในแต่ละรอบ) 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 27 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส อีก 7 นาที

ไพรเมอร์ AG14 มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศา เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ในรอบสุดท้าย

ไพรเมอร์ CAG01 มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิที่ใช้เริ่มต้น 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยการทำ touch-down พีซีอาร์ ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที (และลดอุณหภูมิลงถึง 50 องศาเซลเซียส ในแต่ละรอบ) 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส อีก 7 นาที

ไพรเมอร์ GT03 มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 36 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ในรอบสุดท้าย

หลังทำพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่จะนำไปวิเคราะห์มาทำให้เสียสภาพก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการเสียสภาพธรรมชาติในเวลาต่างกันเมื่ออยู่ในเจล โดยผสมกับฟอร์มาไมด์ 95% ซึ่งเป็นส่วนประกอบใน loading buffer นำไปเพิ่มอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยการทำอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นของเจล 6% และย้อมแถบดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative (10% acetic acid) นาน 20 นาที เขย่าเบา ๆ เมื่อครบเวลานำไปล้างในน้ำกลั่น 15 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่แล้วล้างต่ออีก 5 นาที นำแผ่นเจลมาย้อมในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 0.2% เป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ หลังจากนั้นนำแผ่นเจลจุ่มน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วเพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรทที่มากเกินพอ 5 วินาที แล้วนำแผ่นเจลใส่ในสารละลาย developer (sodium carbonate 25%, formaldehyde 40%, sodium thiosulfate 50 mg/ml) ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เขย่าสม่ำเสมอ จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยแช่สารละลายกรดอะซิติก (stop solution) นาน 3-5 นาที นำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่น แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของประชากรทั้งหมด คัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างประชากร ศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผล แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอพืชสกุลส้ม

2.7 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชสกุลส้ม ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ โดยแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นแบบ binary คือให้ตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอ มีค่าเท่ากับ 1 และตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0 เปรียบเทียบ ณ บริเวณเดียวกัน โดยคิดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและเพิ่มปริมาณได้สม่ำเสมอเมื่อมีการทำพีซีอาร์ซ้ำ วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) cluster analysis หาค่า Similarity coefficient ตามวิธีของ Jaccard (1908) ด้วยโปรแกรม NTSYS pc-2.1 (Rohlf, 2002)

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในสกุลส้ม (*Citrus* spp.) ในภาคใต้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.1 ลักษณะรูปร่างแผ่นใบ

ลักษณะรูปร่างแผ่นใบพืชสกุลส้ม สามารถแยกความแตกต่างของตามลักษณะของแผ่นใบได้ 5 แบบ (รูปที่ 3) ซึ่งแต่ละตัวอย่างกระจายตัวอยู่ในกลุ่มต่าง ๆ (รูปที่ 4) ดังนี้

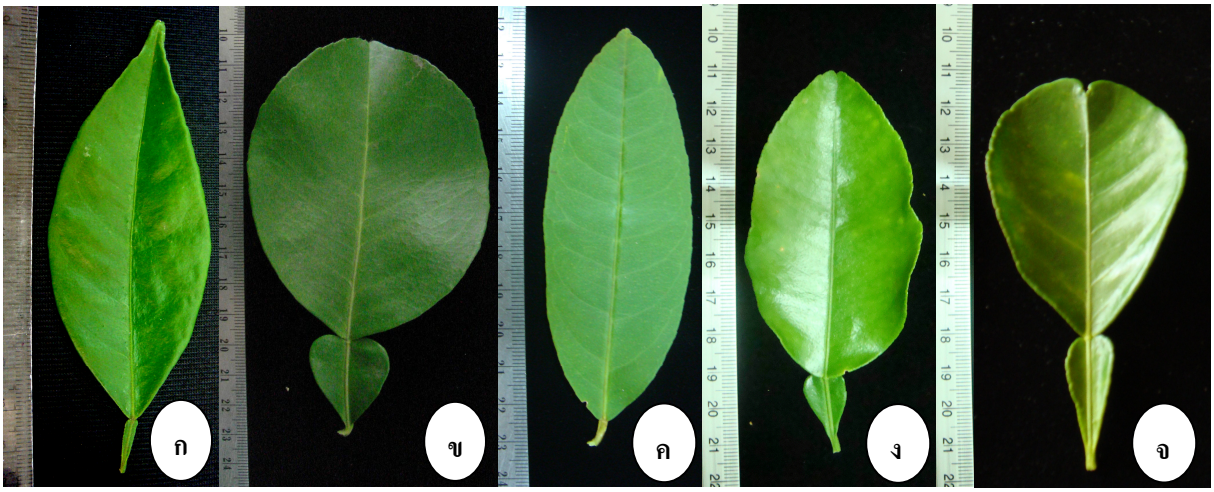
- แบบที่ 1 รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปรี (elliptic) (รูปที่ 3 ก) พบในกลุ่มประชากรส้มโอ 20 ตัวอย่าง ส้มแป้นขี้ม้า ส้มโชกุน ซัสซูมา ส้มเจซี คลีโอพัตรา และส้มเขียวหวาน ทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ส้มจุกทั้งหมด 10 ตัวอย่าง มะนาว 2 ตัวอย่าง มะนาวพวง มะนาวควาย มะนาวไข่แพะ และมะงั่ว รวมทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ส้มผี 1 ตัวอย่าง มิดถัง 3 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน 3 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบในส้มที่ไม่ทราบชนิดอีก 1 ตัวอย่าง และส้มจังกระ 2 ตัวอย่าง

- แบบที่ 2 รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปกลม (orbicular) (รูปที่ 3 ข) พบเฉพาะในส้มโอ 4 ตัวอย่าง

- แบบที่ 3 รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปขอบขนาน (oblong) (รูปที่ 3 ค) พบในมะนาวพิมพ์พร 1 ตัวอย่าง และ ส้มมือ 2 ตัวอย่าง

- แบบที่ 4 รูปไข่ (ovate) (รูปที่ 3 ง) พบในของส้มโอ 1 ตัวอย่าง มะนาวเปลือกหนา 2 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน 1 ตัวอย่าง และจังกระ 2 ตัวอย่าง และมะกรูดอีก 1 ตัวอย่าง

- แบบที่ 5 รูปไข่กลับ (obovate) (รูปที่ 3จ) พบในกลุ่มประชากรมะกรูดหวาน 1 ตัวอย่าง และพบในเลมอนอีก 1 ตัวอย่าง



รูปที่ 3 ลักษณะรูปร่างแผ่นใบของพืชสกุลส้ม

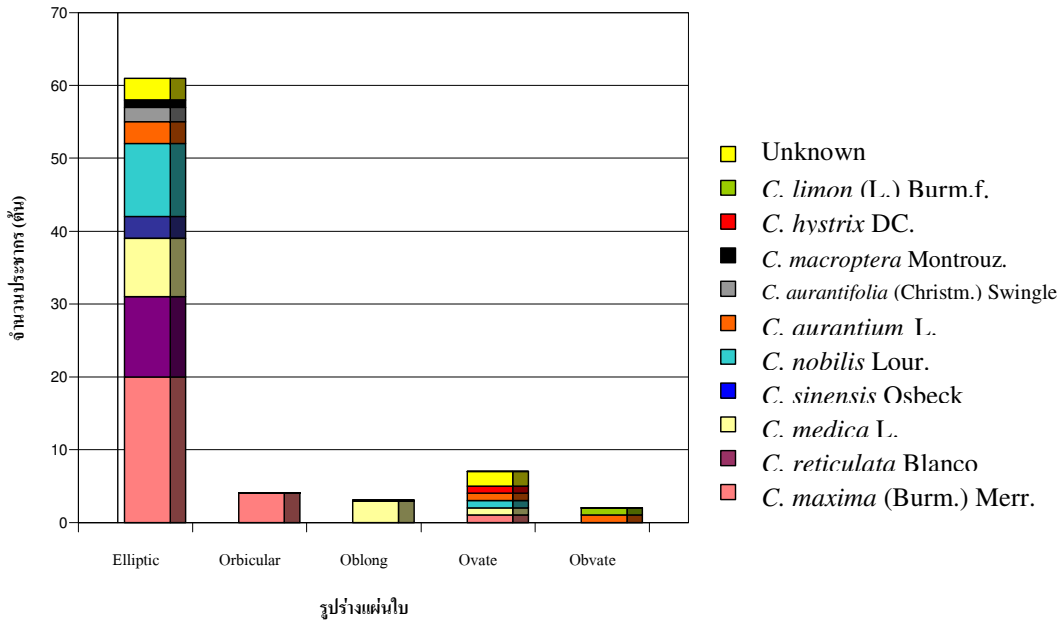
(ก) รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปรี (elliptic)

(ข) รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปกลม (orbicular)

(ค) รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปขอบขนาน (oblong)

(ง) รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปไข่ (ovate)

(จ) รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปไข่กลับ (obovate)



รูปที่ 4 แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ เมื่อจำแนกตามลักษณะรูปร่างแผ่นใบ

1.2 ลักษณะก้านใบ

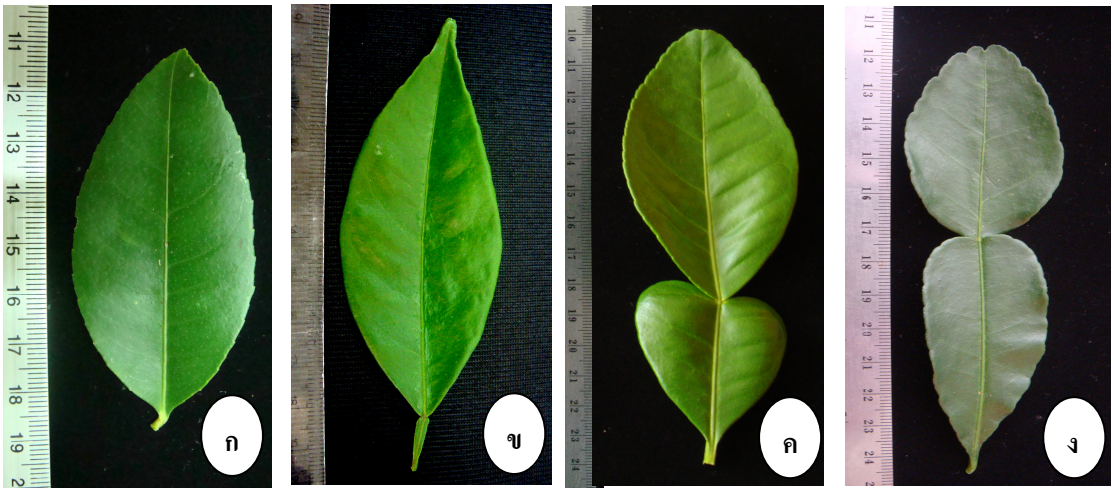
พืชสกุลส้มบางชนิด จะมีก้านใบที่แผ่ออกไปเป็นแผ่น หรือมีลักษณะคล้ายปีก เรียก “wing petiole” ลักษณะรูปร่างก้านใบพืชสกุลส้มที่ศึกษาครั้งนี้สามารถแยกความแตกต่างได้เป็น 4 กลุ่ม (รูปที่ 5) ซึ่งแต่ละตัวอย่างกระจายตัวอยู่ในกลุ่มต่าง ๆ (รูปที่ 6) ดังนี้

- แบบที่ 1 ไม่มีก้านใบ (absent) (รูปที่ 5 ก) พบใน มะนาวพวง มะนาวไข่แพะ มะนาวพิมพ์พร มะนาวเปลือกหนา ส้มมือ และมะนาวควายจำนวนทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ส้มเขียวหวาน ส้มเจซี และคลีโอพัตรา ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง เลมอนอีก 1 ตัวอย่าง

- แบบที่ 2 มีก้านใบแคบ (narrow winged) (รูปที่ 5 ข) พบในส้ม มิดถัง 3 ตัวอย่าง โชกุน ซัสซูมา และส้มแป้นขี้ม้าทั้งหมด 4 ตัวอย่าง มะนาว 2 ตัวอย่าง ส้มจุก 8 ตัวอย่าง ส้มโอ 1 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน 2 ตัวอย่าง และพบในจังกระอีก 4 ตัวอย่าง

- แบบที่ 3 มีก้านใบกว้าง (broad winged) (รูปที่ 5 ค) พบในกลุ่มส้มโอ 24 ตัวอย่าง ส้มแป้นขี้ม้า 4 ตัวอย่าง มะนาวควาย และมะงั่วทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ส้มจุก 3 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน 2 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบในจังกระ 4 ตัวอย่าง และส้มที่ไม่ทราบชนิดอีก 1 ตัวอย่าง

- แบบที่ 4 มีก้านใบใหญ่ (large winged) (รูปที่ 5 ง) พบในมะกรูด มะกรูดหวาน และส้มผีชนิดละ 1 ตัวอย่าง



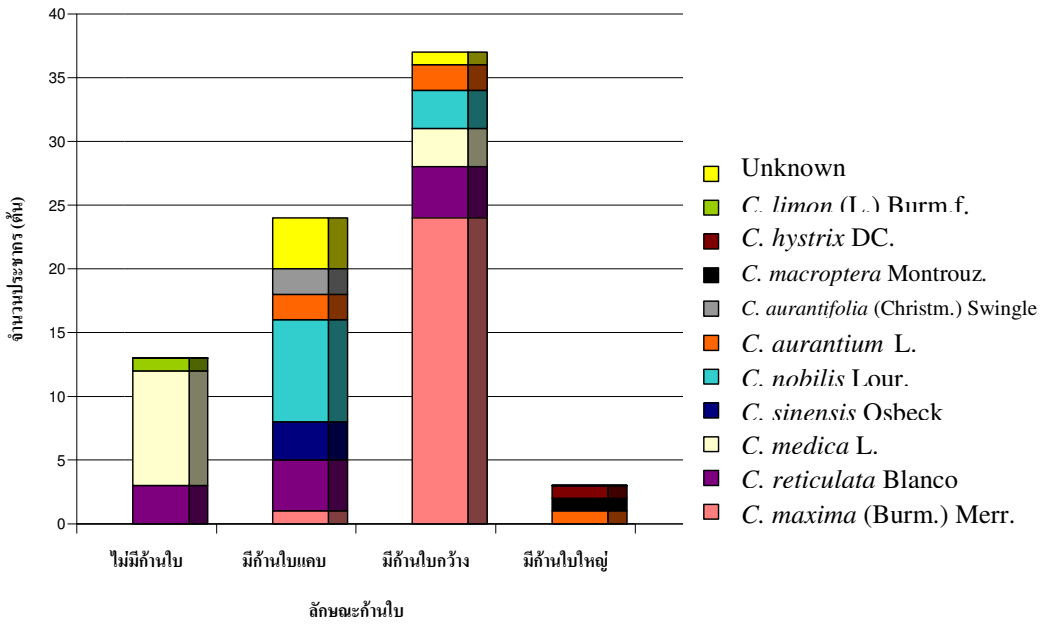
รูปที่ 5 ลักษณะรูปร่างก้านใบ

(ก) ไม่มีก้านใบ (absent)

(ข) มีก้านใบแคบ (narrow winged)

(ค) มีก้านใบกว้าง (broad winged)

(ง) มีก้านใบใหญ่ (large winged)



รูปที่ 6 แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ เมื่อจำแนกตามลักษณะรูปร่างก้านใบ

1.3 ลักษณะปลายใบ

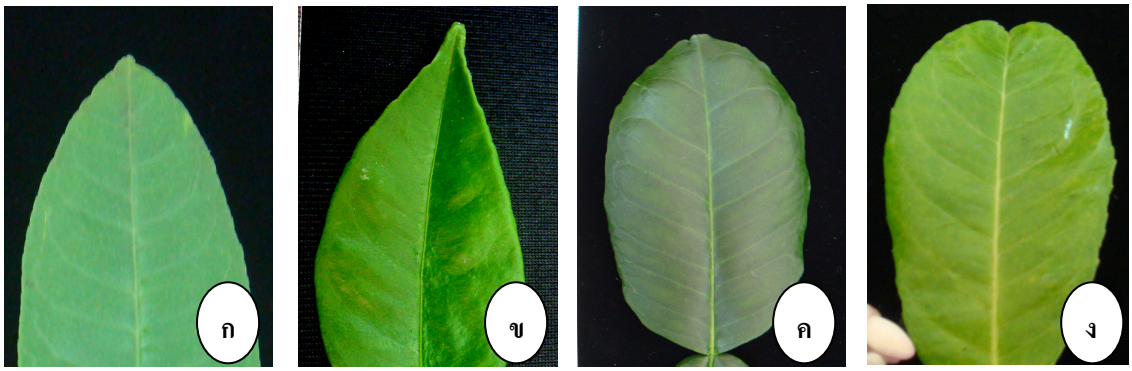
ลักษณะปลายใบพืชสกุลส้ม ในพืชสกุลส้มที่ศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกความแตกต่างได้เป็น 4 กลุ่ม (รูปที่ 7) ซึ่งแต่ละตัวอย่างกระจายตัวอยู่ในกลุ่มต่างๆ (รูปที่ 8) ดังนี้

- แบบที่ 1 ปลายแหลม (acute) พบในกลุ่มส้มโอ 8 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน 3 ตัวอย่าง มะนาวเปลือกหนา มะนาวควาย มะนาวไข่แพะ มะงั่ว และมะนาวพิมพ์พร ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ส้มจุก 3 ต้น ส้มเจซี คลีโอพัตรา ทั้งหมด 2 ตัวอย่าง และพบในมะนาวทั้ง 2 ตัวอย่าง

- แบบที่ 2 ปลายเรียวแหลม (acuminate) พบในกลุ่มประชากรส้มโอ 1 ตัวอย่าง ส้มจุก 5 ตัวอย่าง ส้มแป้นขี้ม้า ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน และซัสซูมาทั้งหมด 4 ตัวอย่าง และพบในจังกระทั้ง 4 ตัวอย่าง

- แบบที่ 3 ปลายมน (obtuse) พบเฉพาะในกลุ่มส้มโอเพียง 2 ตัวอย่าง

- แบบที่ 4 ปลายเว้าตื้น (retuse) พบในกลุ่มประชากรส้มจุก 3 ตัวอย่าง ส้มโอ 14 ตัวอย่าง ส้มแป้นขี้ม้า 5 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน 2 ตัวอย่าง มะนาวควาย ส้มมือ และมะนาวพวงทั้งหมด 6 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบในส้มผี และมะกรูดอย่างละ 1 ตัวอย่าง และในส้มมิดถังอีก 3 ตัวอย่าง



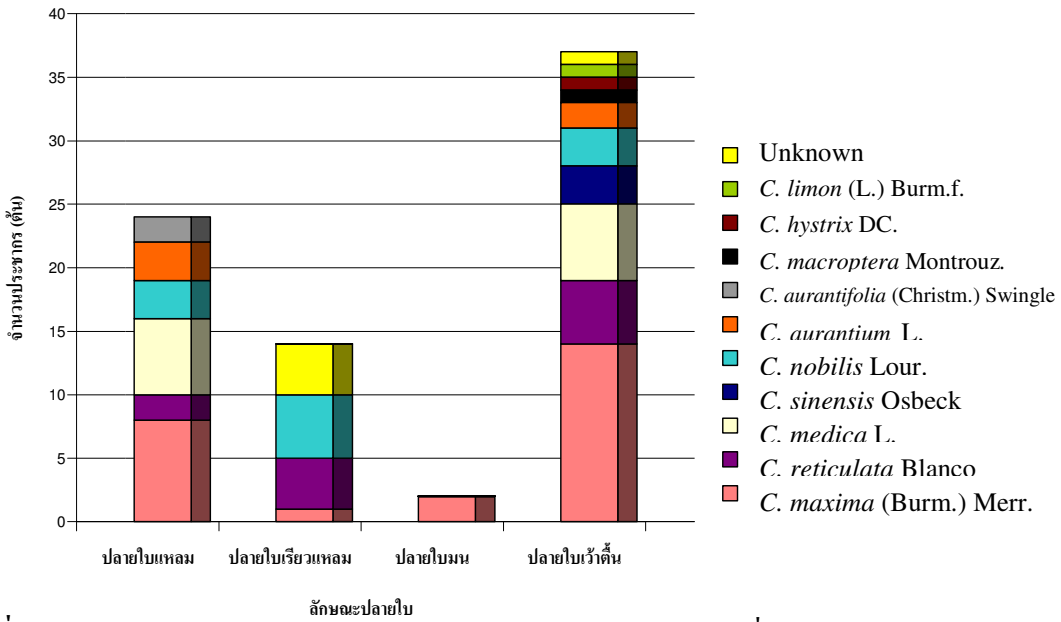
รูปที่ 7 ลักษณะรูปร่างปลายใบ

(ก) ปลายแหลม (acute)

(ข) ปลายเรียวแหลม (acuminate)

(ค) ปลายมน (obtuse)

(ง) ปลายเว้าตื้น (retuse)



รูปที่ 8 แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ เมื่อจำแนกตามลักษณะปลายใบ

1.4 ลักษณะผล

ลักษณะของผลในแต่ละชนิดของพืชสกุลส้ม พบว่ามีความแตกต่างค่อนข้างมาก บางชนิดสามารถจำแนกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เช่น ส้มโอ มะกรูด และมะนาว เป็นต้น จากการศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วยส้ม 10 ชนิด ได้แก่

- ชนิดที่ 1 ส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.) (รูปที่ 9 ก) ส้มโอจัดเป็นส้มชนิดที่มีผลขนาดใหญ่ที่สุดในบรรดาพืชวงศ์ส้มทั้งหมด ผลมีลักษณะกลม หรือรูปไข่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ การศึกษาในครั้งนี้มีหลายสายพันธุ์ เช่น สายน้ำผึ้ง หอมหาดใหญ่ โคกยาง ขาวแป้น เป็นต้น

- ชนิดที่ 2 *C. medica* L. (รูปที่ 9 ข) ได้แก่ มะนาวพวง มะนาวไข่แพะ มะนาวพิมพ์พร มะนาวควาย มะงั่ว ส้มมือ เป็นต้น ส้มชนิดนี้ในกลุ่มเดียวกันมีลักษณะผลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และในบางตัวอย่างผลมีเอกลักษณ์เฉพาะตัว เช่น ส้มมือ เป็นต้น

- ชนิดที่ 3 *C. reticulata* Blanco (รูปที่ 9 ค) ผลมีขนาดกลาง-ใหญ่ เปลือกบาง และล่อนปอกได้ง่าย เช่น ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน ซัสซูมา ส้มแป้นขี้ม้า คลีโอพัตรา ส้มเจซี

- ชนิดที่ 4 *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle (รูปที่ 9 ง) ลักษณะผลมีขนาดเล็ก ผิวเรียบ ได้แก่ มะนาว

- ชนิดที่ 5 *C. aurantium* L. (รูปที่ 9 จ) ได้แก่ มะกรูดหวาน ลักษณะผลส้มชนิดนี้ผิวผลมีลักษณะขุรขระ ผลแก่มีสีน้ำตาล

- ชนิดที่ 6 *C. sinensis* Osbeck ได้แก่ มิดถัง (รูปที่ 9 ฉ) ผิวผลเรียบ กลม ผลมีสีเขียวเข้ม

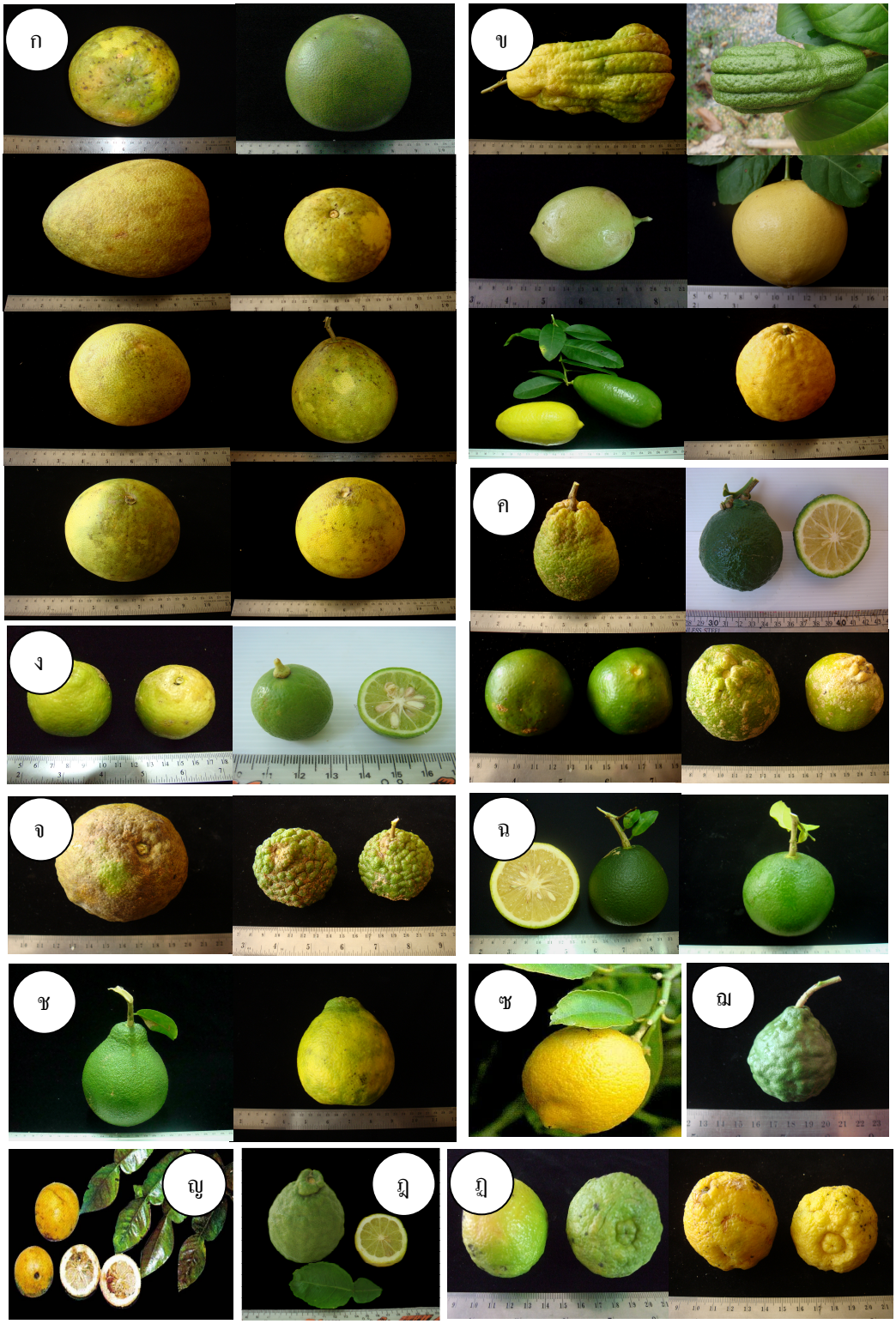
- ชนิดที่ 7 *C. nobilis* Lour. (รูปที่ 9 ช) ลักษณะของผลส้มชนิดคือ มีผลขนาดใหญ่ รูปร่างผลเป็นแบบรูปไข่ ทางด้านฐานของผลมีจุก เปลือกหนาล่อนปอกออกได้ง่าย

- ชนิดที่ 8 *C. limon* (L.) Burm.f. ส้มชนิดนี้มีลักษณะประจำพันธุ์ที่เด่นชัดคือ ส่วนปลายผลจะนูนสูงขึ้น เรียกว่า นิบเปิ้ล หรือ apical mamilla (รูปที่ 9 ซ)

- ชนิดที่ 9 *C. hystrix* DC. (รูปที่ 9 ฌ) หรือ มะกรูด ผิวผลขรุขระคล้ายกับมะกรูดหวาน ผลแก่มีสีเขียว

- ชนิดที่ 10 *C. macroptera* Montrouz. (รูปที่ 9 ญ)

ส่วนส้มที่ไม่ทราบชนิดมีอยู่ด้วยกัน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ส้มไม่ทราบชื่อ 1 ตัวอย่าง และส้มจังกระ 4 ตัวอย่าง ลักษณะผลของส้มที่ไม่ทราบชื่อ (รูปที่ 9 ฎ) ผลมีสีเขียวเข้ม ผลสุกเต็มที่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ผิวผลขรุขระเล็กน้อย บริเวณขั้วผลมีจุก และขนาดของผลใกล้เคียงกับส้มจุกใหญ่ ส่วนส้มจังกระ (รูปที่ 9 ฏ) ผลมีเขียว หรือเหลือง ปลายผลบุ๋ม ขนาดผลใกล้เคียงกับส้มเขียวหวาน มะกรูด และมะกรูดหวาน



รูปที่ 9 ตัวอย่างลักษณะผลส้มแต่ละชนิด

(ก) *C. maxima* (Burm.) Merr. (ข) *C. medica* L. (ค) *C. reticulata* Blanco (ง) *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle (จ) *C. aurantium* L. (ฉ) *C. sinensis* Osbeck (ช) *C. nobilis* Lour. (ซ) *C. limon* (L.) Burm.f. (ฌ) *C. hystrix* DC. (ญ) *C. macroptera* Montrouz. (ฎ) และ (ฏ) Unknown species

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสกุลส้มในภาคใต้โดยอาศัยเครื่องหมายอาร์เอพีดีและเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

2.1 การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนพืชในสกุลส้ม โดยบดตัวอย่างร่วมกับสารละลาย CTAB บัฟเฟอร์ พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ครั้งละประมาณ 2.5 - 3.0 ไมโครกรัมต่อ 200 มิลลิกรัมน้ำหนักใบสด ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

2. 2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มในภาคใต้ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

2.2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างตัวแทนประชากรพืชสกุลส้มแต่ละชนิด โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างตัวแทนส้มแต่ละชนิด โดยใช้ตัวอย่างส้ม 6 ชนิด คือส้มโอ มะนาวควาย ส้มแป้นขี้ม้า ส้มโอผี มะนาว มะกรูด ตัวอย่างละ 1 ต้น โดยทดสอบกับไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จากไพรเมอร์ที่เคยมีผู้ศึกษามาก่อนในพืชสกุลส้ม จำนวน 23 ไพรเมอร์ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ จำนวน 17 ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน 4 ไพรเมอร์ และ 2 ไพรเมอร์ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 2) จากจำนวนไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเบื้องต้นทั้งหมด 17 ไพรเมอร์ นำมาทดสอบรอบที่สอง เพื่อคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนที่สุด โดยใช้ตัวอย่างส้ม จำนวน 10 ชนิด โดย ประกอบด้วย ส้มโอ มะนาวควาย ส้มแป้นขี้ม้า ส้มผี มะนาว มะกรูด เลมอน มิดถัง มะกรูดหวาน ส้มจุก ตัวอย่างละ 1 ต้น จากไพรเมอร์จำนวน 17 ไพรเมอร์ ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ พบว่า มีไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนที่สุด จำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPA-04, OPB-05, OPB-12, OPC-02, OPC-08, OPAN-12 และ OPR-04 นำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มทั้งหมดที่สุ่มเก็บจากบางพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศไทย จำนวนทั้งหมด 77 ต้น ชนิดทราบ 72 ต้น (10 ชนิด) และที่ไม่ทราบว่าเป็นชนิดใดอีก 5 ต้น จากการทดสอบพบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 109 แถบ เฉลี่ย 15.57 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 106 แถบ (97.25%) และอีก 3 แถบ (2.75%) เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่าง

กัน ไพรเมอร์ OPA-04 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 21 แถบ ไพรเมอร์ OPR-04 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด จำนวน 10 แถบ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 23 ไพรเมอร์

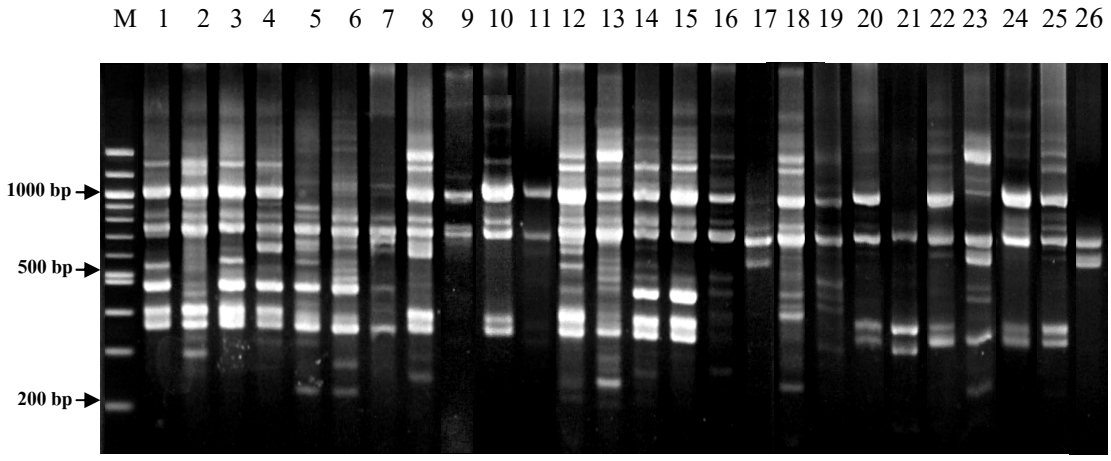
DNA patterns	**No. of primers**
Polymorphism	17
Monomorphism	0
Not clear	4
Unamplifiable	2
Total	**23**

ตารางที่ 3 ชนิดของไพรเมอร์ที่คัดเลือก ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในพืชสกุลส้ม

Primer	**Sequence (5'≫ 3')**	**Amplified fragments**	**Monomorphic fragments**	**Polymorphic fragments**	**Polymorphism (%)**
OPA-04	AATCGGGCTG	21	0	21	100
OPAN-12	AACGGCCGTC	15	1	14	93.33
OPB-05	TGCGCCCTTC	14	1	13	92.86
OPB-12	CCTTGACGCA	16	0	16	100
OPC-02	GTGAGGCGTC	15	1	14	93.33
OPC-08	TGGACCGGTG	18	0	18	100
OPR-04	CCCGTAGCAC	10	0	10	100
Total		**109**	**3**	**106**	**97.25**

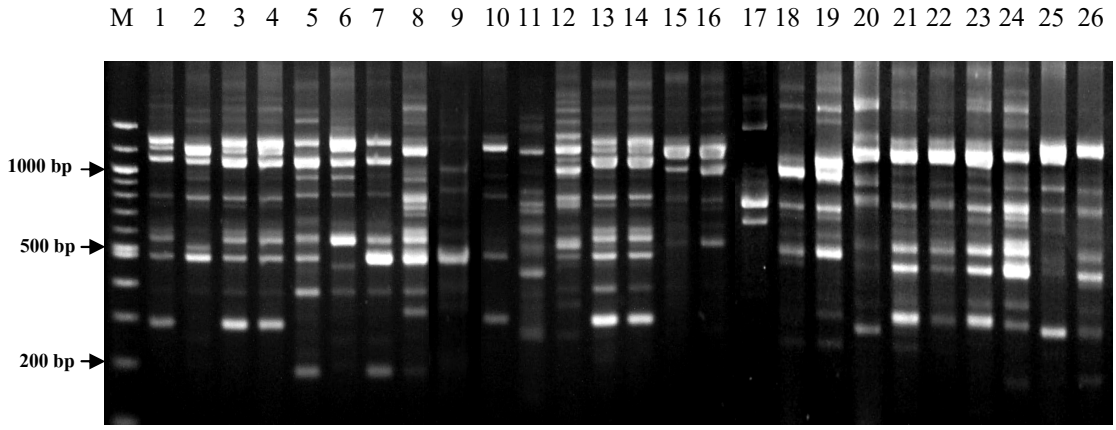
รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี - พีซีอาร์ แต่ละไพรเมอร์มีความแตกต่างกันในพืชสกุลส้ม โดยไพรเมอร์ OPAN-12 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 15 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างจำนวน 14 แถบ (รูปที่ 10) ไพรเมอร์ OPA-04 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 21 แถบ ซึ่งทั้ง 21 แถบเป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (รูปที่ 11) ไพรเมอร์ OPB-05

ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 14 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างจำนวน 13 แถบ (รูปที่ 12) ไพรเมอร์ OPB-12 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 16 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (รูปที่ 13) ไพรเมอร์ OPC-02 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 15 แถบ เป็นแถบที่มีความแตกต่างจำนวน 14 แถบ (รูปที่ 14) ไพรเมอร์ OPC-08 ให้แถบ ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 18 แถบ เป็นแถบที่มีความแตกต่างทั้งหมด (รูปที่ 15) ไพรเมอร์ OPR-04 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณทั้งหมด 10 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (รูปที่ 16)



รูปที่ 10 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAN-12

lane 1-4: *C. nobilis* Lour.
lane 5-7: *C. maxima* (Burm.) Merr.
lane 8-11:*C. reticulata* Blanco
lane 12-13: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle
lane 14-15: *C. sinensis* Osbeck
lane 16-18: *C. medica* L.
lane 19: *C. limon* (L.) Burm.f.
lane 20: *C. macroptera* Montrouz.
lane 21: *C. hystrix* DC.
lane 22-23: *C. aurantium* L.
lane 24-26: unknown species
M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



รูปที่ 11 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPA-04

lane 1-4: *C. nobilis* Lour. lane 5-7: *C. maxima* (Burm.) Merr.

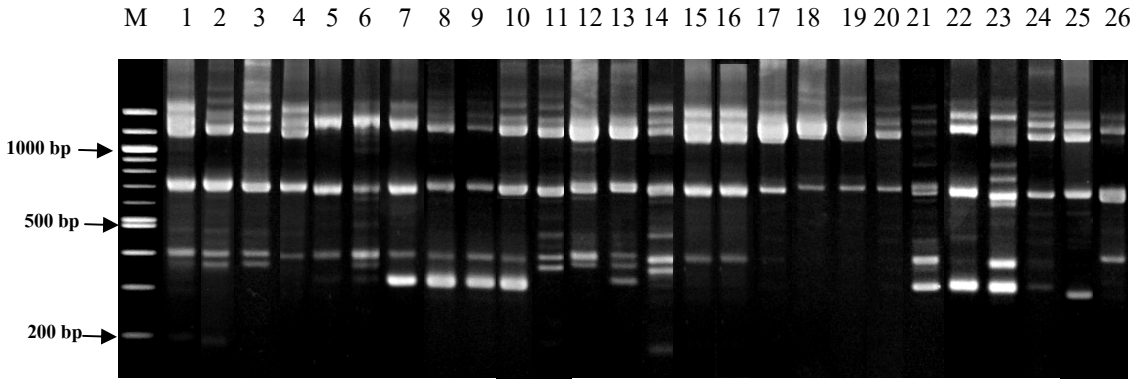
lane 8-11: *C. reticulata* Blanco lane 12-13: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle

lane 14-15: *C. sinensis* Osbeck lane 16-18: *C. medica* L.

lane 19: *C. limon* (L.) Burm.f. lane 20: *C. macroptera* Montrouz.

lane 21: *C. hystrix* DC. lane 22-23: *C. aurantium* L.

lane 24-26: unknown species M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



รูปที่ 12 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPB-05

lane 1-4: *C. nobilis* Lour. lane 5-7: *C. maxima* (Burm.) Merr.

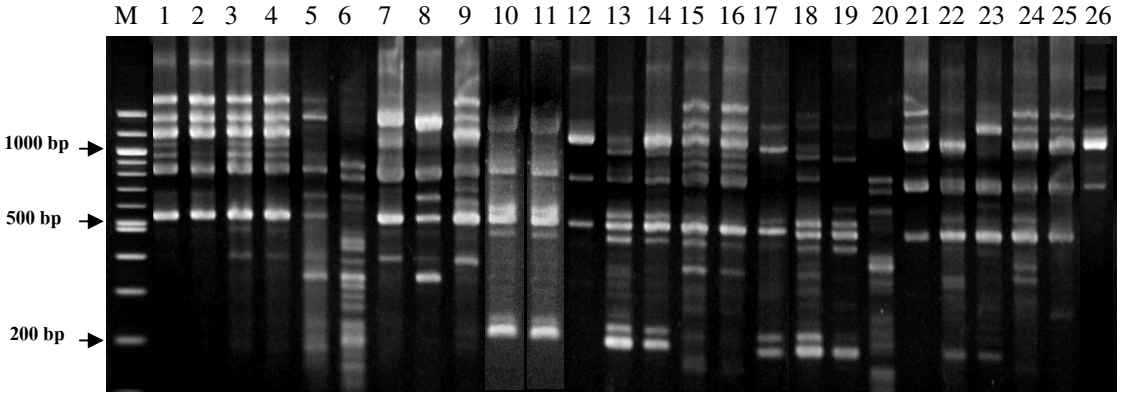
lane 8-11: *C. reticulata* Blanco lane 12-13: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle

lane 14-15: *C. sinensis* Osbeck lane 16-18: *C. medica* L.

lane 19: *C. limon* (L.) Burm.f. lane 20: *C. macroptera* Montrouz.

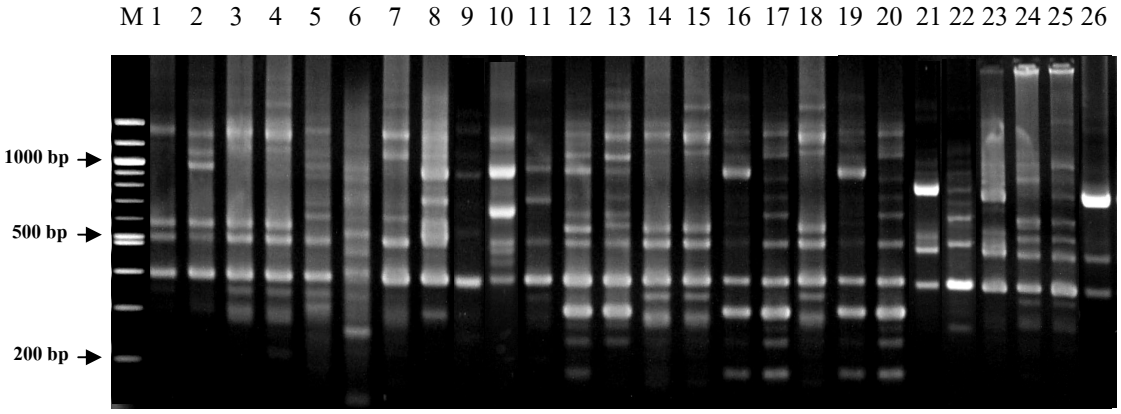
lane 21: *C. hystrix* DC. lane 22-23: *C. aurantium* L.

lane 24-26: unknown species M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



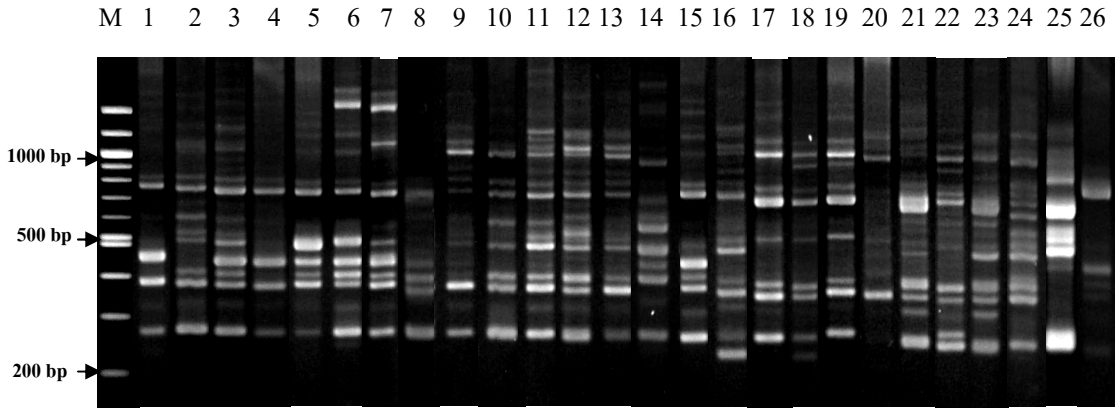
รูปที่ 13 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ ไพรเมอร์ OPB-12

lane 1-4: *C. nobilis* Lour.
lane 5-7: *C. maxima* (Burm.) Merr.
lane 8-11: *C. reticulata* Blanco
lane 12-13: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle
lane 14-15: *C. sinensis* Osbeck
lane 16-18: *C. medica* L.
lane 19: *C. limon* (L.) Burm.f.
lane 20: *C. macroptera* Montrouz.
lane 21: *C. hystrix* DC.
lane 22-23: *C. aurantium* L.
lane 24-26: unknown species
M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



รูปที่ 14 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-02

lane 1-4: *C. nobilis* Lour.
lane 5-7: *C. maxima* (Burm.) Merr.
lane 8-11: *C. reticulata* Blanco
lane 12-13: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle
lane 14-15: *C. sinensis* Osbeck
lane 16-18: *C. medica* L.
lane 19: *C. limon* (L.) Burm.f.
lane 20: *C. macroptera* Montrouz.
lane 21: *C. hystrix* DC.
lane 22-23: *C. aurantium* L.
lane 24-26: unknown species
M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



รูปที่ 15 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPC-08

lane 1-4: *C. nobilis* Lour. lane 5-7: *C. maxima* (Burm.) Merr.

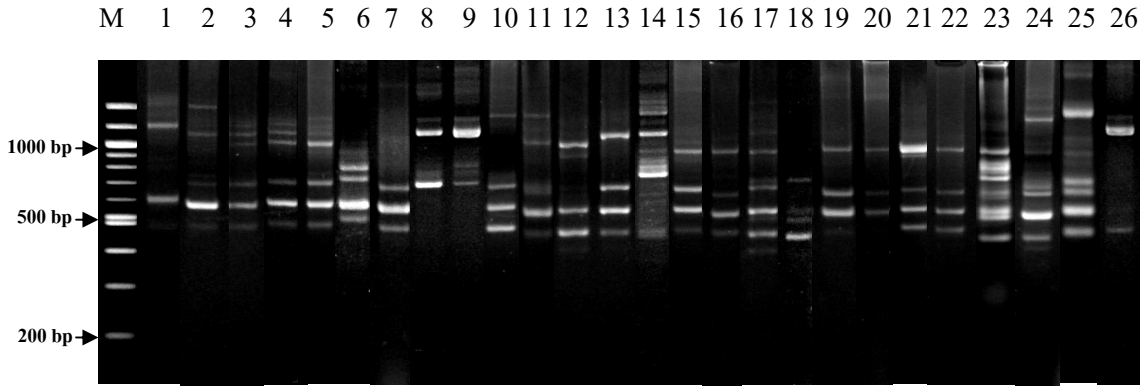
lane 8-11: *C. reticulata* Blanco lane 12-13: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle

lane 14-15: *C. sinensis* Osbeck lane 16-18: *C. medica* L.

lane 19: *C. limon* (L.) Burm.f. lane 20: *C. macroptera* Montrouz.

lane 21: *C. hystrix* DC. lane 22-23: *C. aurantium* L.

lane 24-26: unknown species M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



รูปที่ 16 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPR-04

lane 1-4: *C. nobilis* Lour. lane 5-7: *C. maxima* (Burm.) Merr.

lane 8-11: *C. reticulata* Blanco lane 12-13: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle

lane 14-15: *C. sinensis* Osbeck lane 16-18: *C. medica* L.

lane 19: *C. limon* (L.) Burm.f. lane 20: *C. macroptera* Montrouz.

lane 21: *C. hystrix* DC. lane 22-23: *C. aurantium* L.

lane 24-26: unknown species M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

2.2.2 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ในพืชสกุลส้ม

ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 106 แถบ ที่ได้จากการทดสอบดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของกลุ่มพืชแต่ละกลุ่มได้อย่างชัดเจน (ตารางที่ 4) เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอพบว่าแถบดีเอ็นเอหลายตำแหน่งมีแนวโน้มที่จะเป็นเอกลักษณ์กับกลุ่มประชากร เช่น แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPB-05 พบปรากฏเฉพาะในส้ม *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle, *C. medica* L. และ *C. limon* (L.) Burm.f. 100, 91.67 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่พบในส้มชนิดอื่น นอกจากนี้ยังปรากฏแถบดีเอ็นเอ OPAN-12/5 ที่ได้จากไพรเมอร์ OPAN-12 ขนาด 1,000 คู่เบส ปรากฏในส้มเกือบทุกชนิดในเปอร์เซ็นต์สูง (50-100 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบในกลุ่มส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.) และส้มผี (*C. macroptera* Montrouz.)

แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในส้มกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งพบว่ามีอยู่หลายแถบด้วยกัน แต่เปอร์เซ็นต์ที่เกิดแถบในกลุ่มตัวอย่างนั้นไม่สูงมากนัก เช่น OPB-05/14 ไม่ปรากฏในส้มชนิดใดยกเว้น มิดถัง (*C. sinensis* Osbeck) จำนวน 2 ต้น คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,800 คู่เบส ที่ได้จากไพรเมอร์ OPC-08 (OPC-08/1) และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส ที่ได้จากไพรเมอร์ OPC-08 (OPC-08/2) เช่นเดียวกัน ปรากฏแถบทั้งสองเฉพาะในกลุ่มส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.) ในเปอร์เซ็นต์ที่เท่ากัน คือ 56 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในประชากรพืชสกุลส้มชนิดต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

primer	fragment size (bp)	marker	DNA fragment (%)										
			C. nobilis	*C. maxima*	*C. reticulata*	*C. aurantifolia*	*C. sinensis*	*C. medica*	*C. limon*	*C. macroptera*	*C. hystrix*	*C. aurantium*	unknown species
OPC-08	1,800	OPC-08/1	0.00	56.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1,600	OPC-08/2	0.00	56.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1,150	OPC-08/5	9.09	0.00	63.64	100.00	0.00	18.18	100.00	100.00	100.00	100.00	80.00
	820	OPC-08/8	0.00	4.00	9.09	0.00	0.00	8.33	0.00	0.00	100.00	60.00	80.00
	510	OPC-08/12	45.45	84.00	0.00	0.00	100.00	8.33	0.00	0.00	0.00	0.00	20.00
OPB-05	1,520	OPB-05/1	90.91	36.00	27.27	0.00	100.00	8.33	100.00	100.00	100.00	0.00	80.00
	1,100	OPB-05/4	0.00	8.00	9.09	100.00	0.00	91.67	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	290	OPB-05/13	0.00	72.00	72.73	50.00	0.00	41.67	0.00	0.00	100.00	100.00	40.00
	120	OPB-05/14	0.00	0.00	0.00	0.00	66.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
OPB-12	1,520	OPB-12/1	100.00	12.00	36.36	0.00	100.00	36.36	0.00	100.00	0.00	0.00	80.00
	600	OPB-12/8	9.09	8.00	18.18	50.00	0.00	83.33	0.00	0.00	100.00	40.00	20.00
	180	OPB-12/15	0.00	4.00	9.09	100.00	0.00	83.33	0.00	0.00	100.00	40.00	20.00
OPC-02	1,517	OPC-02/1	18.18	80.00	18.18	0.00	100.00	41.67	100.00	0.00	0.00	0.00	20.00
	650	OPC-02/8	63.64	0.00	9.09	50.00	100.00	16.67	100.00	0.00	100.00	60.00	80.00
OPAN-12	1,000	OPAN-12/5	90.91	0.00	90.91	100.00	100.00	50.00	100.00	0.00	100.00	80.00	100.00
	490	OPAN-12/13	18.18	72.00	0.00	0.00	100.00	25.00	0.00	0.00	0.00	20.00	0.00

ตารางที่ 4 (ต่อ)

primer	fragment size (bp)	marker	DNA fragment (%)										
			C. nobilis	*C. maxima*	*C. reticulata*	*C. aurantifolia*	*C. sinensis*	*C. medica*	*C. limon*	*C. macroptera*	*C. hystrix*	*C. aurantium*	unknown species
OPA-04	900	OPA-04/10	18.18	20.00	18.18	100.00	0.00	66.67	100.00	0.00	0.00	60.00	60.00
	400	OPA-04/18	63.64	64.00	63.64	50.00	33.33	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	60.00
OPR-04	1,200	OPR-04/4	45.45	20.00	45.45	50.00	100.00	50.00	100.00	0.00	100.00	0.00	60.00
	900	OPR-04/6	18.18	48.00	36.36	0.00	66.67	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	40.00

หมายเหตุ

จำนวนตัวอย่าง	*C. nobilis* Lour.	11	ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	*C. aurantium* L.	5	ตัวอย่าง
จำนวนตัวอย่าง	*C. medica* L.	12	ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	*C. limon* (L.) Burm.f.	1	ตัวอย่าง
จำนวนตัวอย่าง	*C. hystrix* DC.	1	ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	*C. maxima* (Burm.) Merr.	25	ตัวอย่าง
จำนวนตัวอย่าง	*C. reticulata* Blanco	11	ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	*C. macroptera* Montrouz.	1	ตัวอย่าง
จำนวนตัวอย่าง	*C. sinensis* Osbeck	3	ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle	2	ตัวอย่าง
จำนวนตัวอย่าง	unknown species	5	ตัวอย่าง				

2.2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม จากเทคนิคอาร์เอพีดี

จากจากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มทั้ง 10 ชนิด คือ *C.maxima* (Burm.) Merr., *C. reticulata* Blanco, *C. medica* L., *C. macroptera* Montrouz., *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle, *C. hystrix* DC., *C. sinensis* Osbeck, *C. aurantium* L., *C. nobilis* Lour., *C. limon* (L.) Burm.f. และที่ไม่ทราบว่าเป็นชนิดใดอีก 5 ต้น รวมทั้งหมด 77 ต้น เก็บจากพื้นที่บางส่วนของภาคใต้ในประเทศไทย โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ทั้งหมด 109 แถบ นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis หาค่า similarity coefficient ของ Jaccard โดยโปรแกรม NTSYS พบว่าตัวอย่างพืชทั้งหมด มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.523-0.982 โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.709 โดยมิดถังที่เก็บในพื้นที่บริเวณเดียวกัน 2 ต้น และมะนาวพวงจากต้นเดียวกัน แต่ลักษณะผลแตกต่างกัน มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.982) ส่วนเลมอนกับส้มโอที่เก็บจากอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (0.523) (รูปที่ 17)

และสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้เป็น 5 กลุ่ม (รูปที่ 17) โดยมีสมาชิกจากทั้ง 6 กลุ่มกระจายตัวอยู่ในกลุ่มต่าง ๆ (รูปที่ 18) ดังนี้

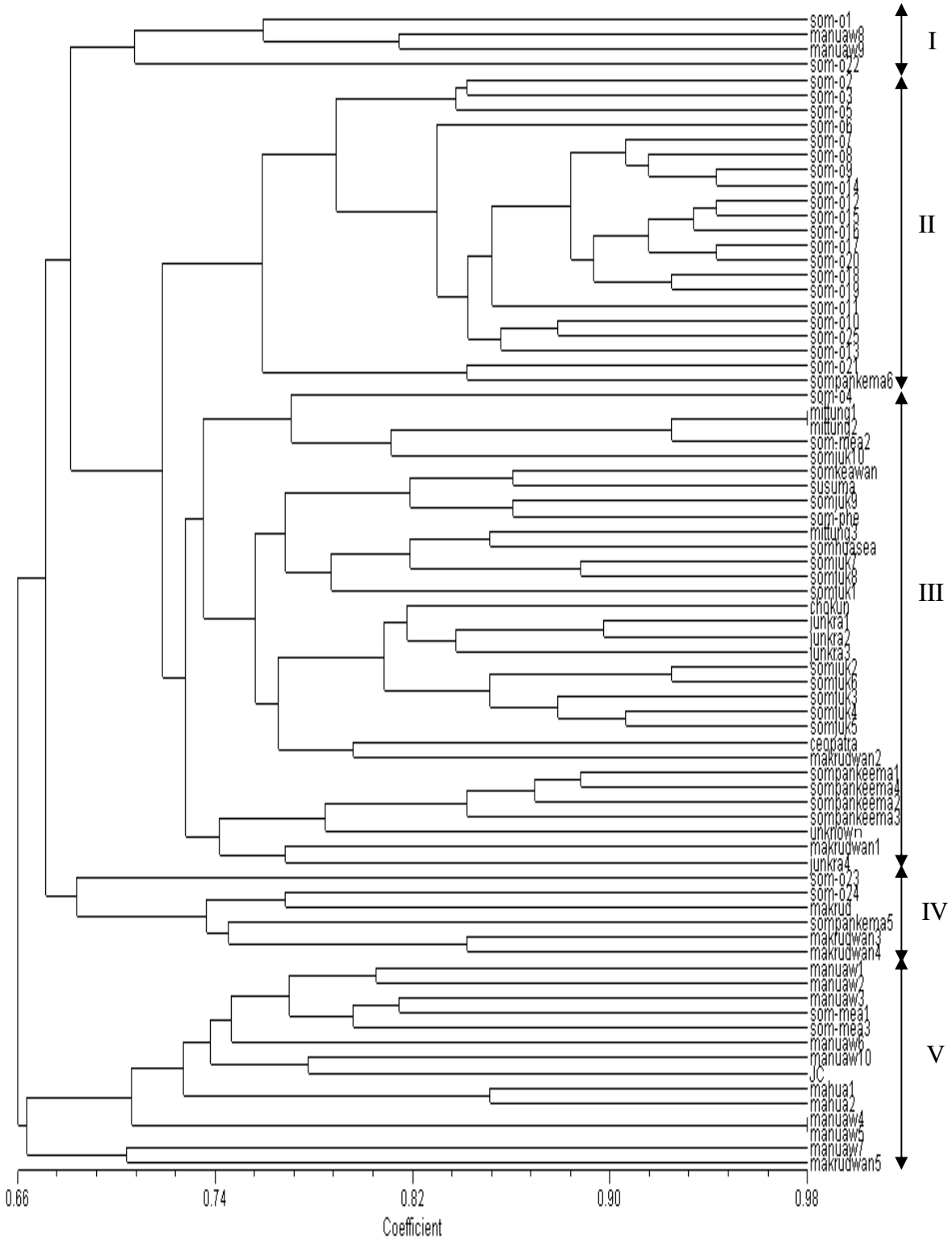
กลุ่มที่ 1 มี 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ส้มโอ 2 ตัวอย่าง มะนาวควาย และมะนาวพิมพ์พร รวม 2 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 2 มี 21 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ส้มโอ 20 ตัวอย่าง และส้มแป้นขี้ม้า 1 ตัวอย่าง

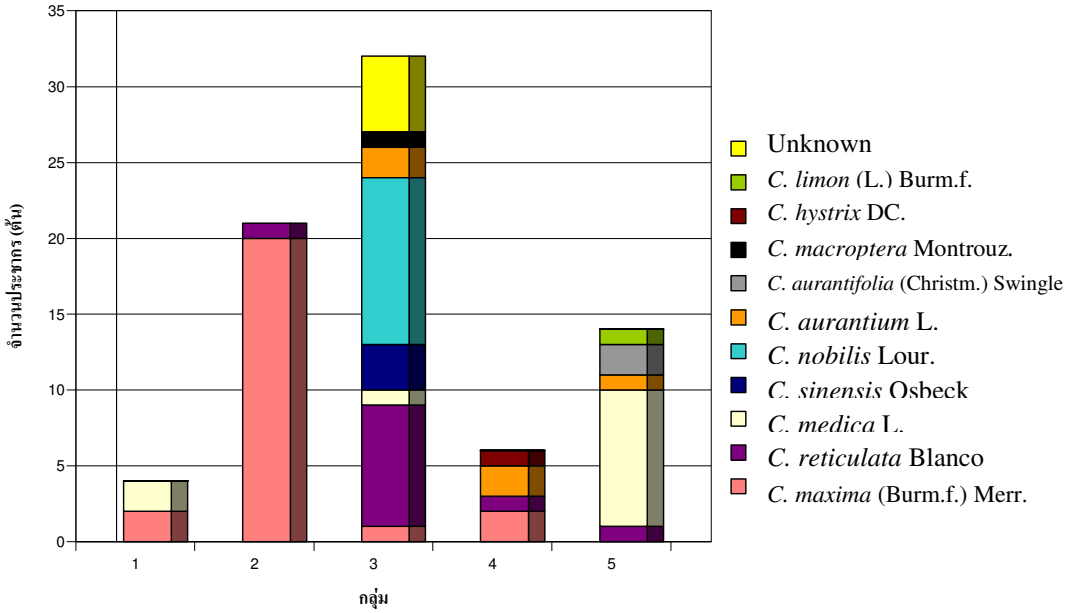
กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีจำนวนตัวอย่างมากที่สุดคือ 32 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ส้มโอ 1 ตัวอย่าง มิดถัง 3 ตัวอย่าง ส้มจุก 11 ตัวอย่าง ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน คลีโอพัตรา และ ซัสซูมา 8 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน 2 ตัวอย่าง ส้มผี และส้มมืออย่างละ1 ตัวอย่าง จังกระ 4 ตัวอย่าง และส้มที่ไม่ทราบชนิด 1 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 4 มี 6 ต้น ประกอบด้วย ส้มโอ 2 ตัวอย่าง มะกรูด 1 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน 2 ตัวอย่าง ส้มแป้นขี้ม้า 1 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 5 มี 14 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มะนาว 2 ตัวอย่าง ส้มเจซี 1 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน มะนาวเปลือกหนา มะนาวควาย มะนาวไข่แพะ อย่างละ 1 ตัวอย่าง มะนาวพวง ส้มมือ และมะงั่วอย่างละ 2 ตัวอย่าง



รูปที่ 17 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของพืชสกุลส้มจำนวน 77 ต้น จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์



รูปที่ 18 แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่าง ๆ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

2. 3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มในภาคใต้ โดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

2.3.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพืชสกุลส้มโดยปฏิกิริยา PCR

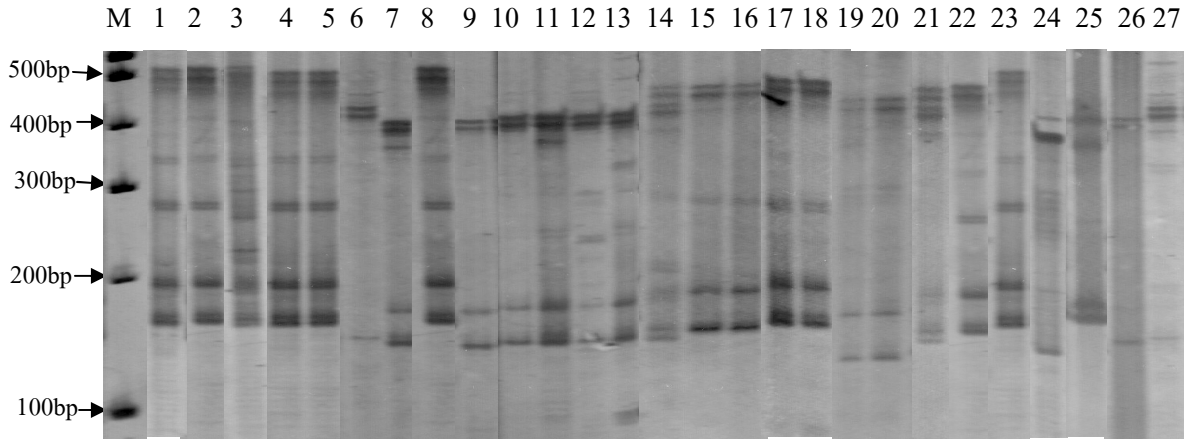
ผลการใช้ไพรเมอร์สำหรับเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 6 ไพรเมอร์ คัดเลือกมาจาก 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ AC01, AG14, CAG01, GT03, CTT01 และ CT19 ซึ่งเป็นไพรเมอร์จากการศึกษาของ Barkley และคณะ (2006) นำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลส้ม โดยใช้ตัวอย่างส้ม 6 ชนิด คือส้มโอ มะนาวควาย ส้มแป้นขี้ม้า ส้มผี มะนาว และมะกรูด ตัวอย่างละ 1 ต้น เพิ่มปริมาณและทดสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตโฟรีซีส คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่าง จากการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ AC01 AG14 CAG01 และ GT03 4 ไพรเมอร์ เป็นไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างชัดเจนมากที่สุด นำมาทดสอบกับพืชสกุลส้มทั้ง 77 ต้น พบว่าทั้ง 4 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 116 แถบ เฉลี่ย 29 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 116 แถบ (100%) ไพรเมอร์ AG14 ให้จำนวนแถบดีเอ็น

เอสูงสุด จำนวน 40 แถบ ไพรเมอร์ CAG01 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด จำนวน 19 แถบ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ชนิดของไพรเมอร์ที่คัดเลือก ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จากการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ในพืชสกุลส้ม

Primer	**Sequence (5'➢ 3')**	**Amplified fragments**	**Polymorphic fragments**	**Polymorphism (%)**
AC01	TTTGACATCAACATAAAACAAGAAA (F)	30	30	100
	TTTTAAAATCCCTGACCAGA (R)			
AG14	AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA (F)	40	40	100
	CTTCCTCTTGCGGAGTGTTC (R)			
CAG01	AACACTCGCACCAAATCCTC (F)	19	19	100
	TAAATGGCAACCCCAGCTTTG (R)			
GT03	GCCTTCTTGATTTACCGGAC (F)	27	27	100
	TGCTCCGAACTTCATCATTG (R)			
Total		**116**	**116**	**100**

รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ แต่ละไพรเมอร์มีความแตกต่างกันในพืชสกุลส้ม ทุกไพรเมอร์เป็นไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด ดังนี้โดยไพรเมอร์ AC01ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 30 (รูปที่ 19) ไพรเมอร์ AG14 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 40 แถบ (รูปที่ 20) ไพรเมอร์ CAG01ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 19 แถบ (รูปที่ 21) ไพรเมอร์ GT03ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 27 แถบ (รูปที่ 22)



รูปที่ 19 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ AC01

lane 1: *C. macroptera* Montrouz. lane 2: *C. hystrix* DC.

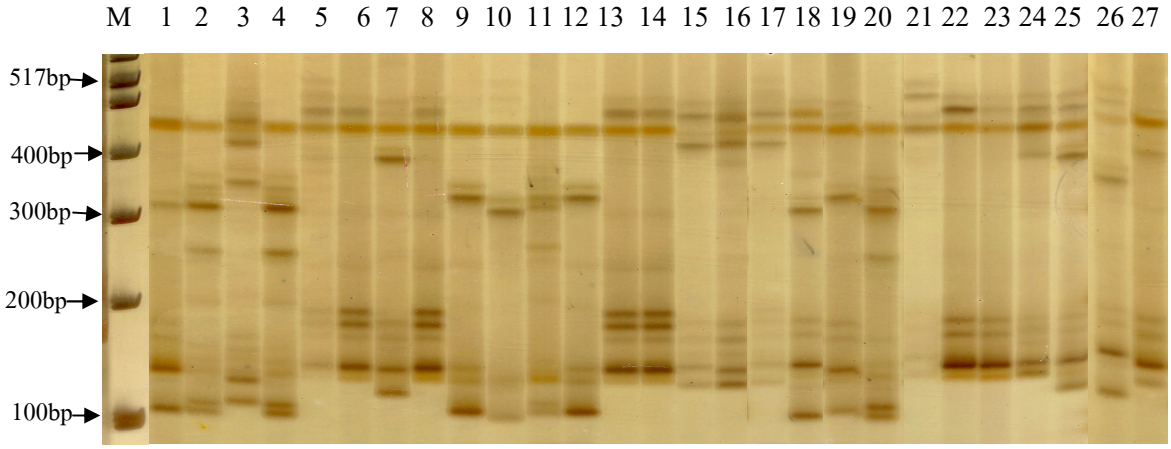
lane 3-4: *C. aurantium* L. lane 5-8: *C. nobilis* Lour.

lane 9: *C. limon* (L.) Burm.f. lane 10-12: *C. medica* L.

lane 13-14: *C. sinensis* Osbeck lane 15-18: *C. reticulata* Blanco

lane 19-20: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle lane 21-25:*C. maxima* (Burm.) Merr.

lane 26-27: unknown species M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



รูปที่20 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เมื่อใช้ไพรเมอร์ AG14

lane 1: *C.macroptera* Montrouz. lane 2: *C. hystrix* DC.

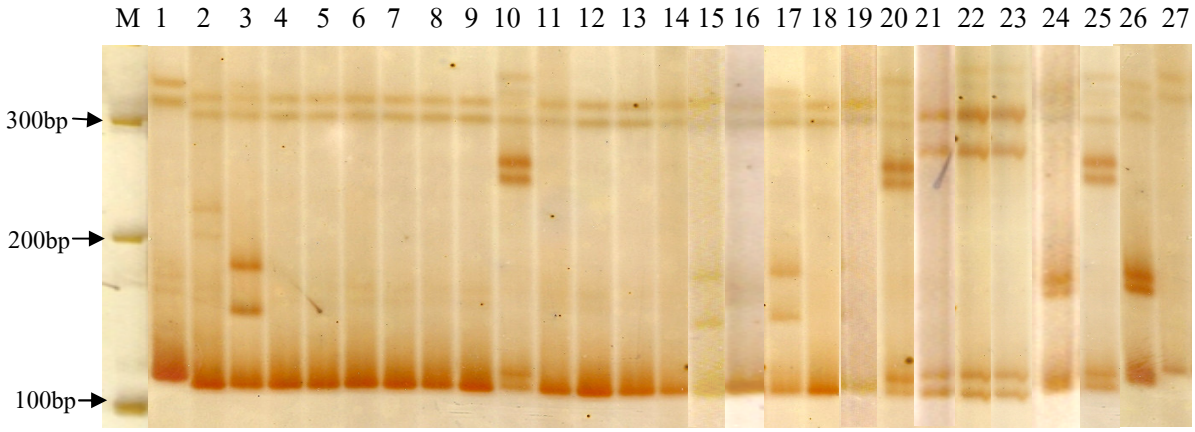
lane 3-4: *C. aurantium* L. lane 5-8: *C. nobilis* Lour.

lane 9: *C. limon* (L.) Burm.f. lane 10-12: *C. medica* L.

lane 13-14: *C. sinensis* Osbeck lane 15-18: *C. reticulata* Blanco

lane 19-20: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle lane21-25: *C. maxima* (Burm.) Merr.

lane 26-27 unknown species M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



รูปที่ 21 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เมื่อใช้ไพรเมอร์ CAG01

lane 1: *C. macroptera* Montrouz. lane 2: *C. hystrix* DC.

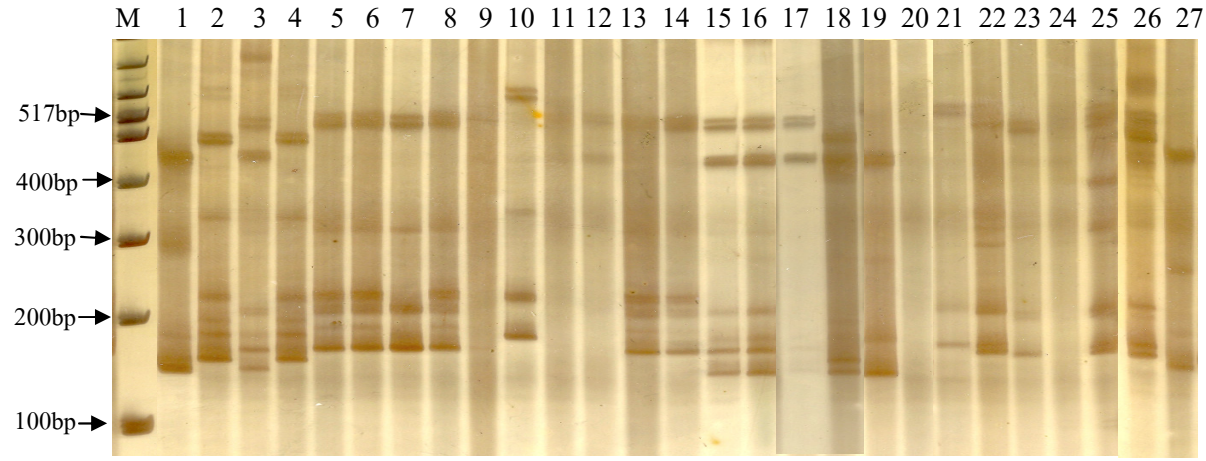
lane 3-4: *C. aurantium* L. lane 5-8: *C. nobilis* Lour.

lane 9: *C. limon* (L.) Burm.f. lane 10-12: *C. medica* L.

lane 13-14: *C. sinensis* Osbeck lane15-16: *C .aurantifolia* (Christm.) Swingle

lane 17-20: *C. reticulata* Blanco lane 21-25: *C. maxima* (Burm.) Merr.

lane 26-27: unknown species M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



รูปที่ 22 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างส้มจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ เมื่อใช้ไพรเมอร์ GT03

lane 1: *C. macroptera* Montrouz. lane 2: *C. hystrix* DC.

lane 3-4: *C. aurantium* L. lane 5-8: *C. nobilis* Lour.

lane 9: *C. limon* (L.) Burm.f. lane 10-12: *C. medica* L.

lane 13-14: *C. sinensis* Osbeck lane 15-16: *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle

lane 17-20: *C. reticulata* Blanco lane 21-25: *C. maxima* (Burm.) Merr.

lane 26-27: unknown species M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส

2.3.2 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ ไมโครแซทเทลไลท์-พีซีอาร์ในพืชสกุลส้ม

ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 116 แถบ ที่ได้จากการทดสอบดีเอ็นเอของพืชสกุลส้มด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 4 ไพรเมอร์ พบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของกลุ่มพืชแต่ละกลุ่มได้อย่างชัดเจน (ตารางที่ 6) เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอพบว่ามีแถบดีเอ็นเอหลายตำแหน่งมีแนวโน้มที่จะเป็นเอกลักษณ์กับกลุ่มประชากร เช่น แถบ AC01/5 พบในประชากรส้มทุกกลุ่มยกเว้น ส้มมิดถัง ส่วน *C. nobilis* Lour., *C. reticulata* Blanco ,*C. medica* L. และส้มที่ไม่ทราบชนิด พบในเปอร์เซ็นต์ต่ำ (18.18-25.00) AC01/2 พบเฉพาะในส้มกลุ่ม *C. nobilis* Lour. 81.82 เปอร์เซ็นต์ *C. reticulata* Blanco 63.64 เปอร์เซ็นต์ และส้มที่ไม่ทราบชนิด 40 เปอร์เซ็นต์ แถบ AG14/6 ไม่ปรากฏในมะนาว (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle) และ *C. medica* L.ในเปอร์เซ็นต์ต่ำ (16.67 เปอร์เซ็นต์) CAG01/3 พบเฉพาะในส้มกลุ่มส้มโอ (*C. maxima* (Burm.) Merr.) จำนวน 84 เปอร์เซ็นต์ ส้มผี (*C. macroptera* Montrouz.) 100 เปอร์เซ็นต์ มะกรูดหวาน (*C. aurantium* L.) 60 เปอร์เซ็นต์ และส้มที่ไม่ทราบชนิด 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในประชากรพืชสกุลส้มชนิดต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

primer	fragment size (bp)	marker	DNA fragment (%)										
			C. nobilis	*C. maxima*	*C. reticulata*	*C. aurantifolia*	*C. sinensis*	*C. medica*	*C. limon*	*C. macroptera*	*C. hystrix*	*C. aurantium*	unknown species
AC01	440	AC01/24	0.00	100.00	36.36	0.00	0.00	8.33	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
	430	AC01/23	0.00	100.00	36.36	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	100.00
	405	AC01/21	81.82	64.00	72.73	0.00	0.00	16.67	0.00	100.00	100.00	0.00	100.00
	190	AC01/8	0.00	12.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
	170	AC01/5	18.18	96.00	18.18	100.00	0.00	25.00	100.00	100.00	100.00	100.00	20.00
	150	AC01/2	81.82	0.00	63.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	40.00
AG14	400	AG14/6	100.00	100.00	72.73	0.00	100.00	16.67	100.00	100.00	100.00	100.00	80.00
	300	AG14/13	0.00	0.00	45.45	50.00	0.00	33.33	0.00	0.00	0.00	80.00	20.00
	190	AG14/23	100.00	20.00	27.27	50.00	100.00	8.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	170	AG14/26	90.91	76.00	63.64	50.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	40.00	40.00
	155	AG14/30	100.00	92.00	72.73	100.00	100.00	8.33	0.00	0.00	100.00	40.00	60.00
CAG01	320	CAG01/18	0.00	68.00	72.73	100.00	0.00	33.33	0.00	100.00	100.00	80.00	80.00
	310	CAG01/17	100.00	40.00	81.82	0.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	60.00	40.00
	300	CAG01/15	100.00	44.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	100.00	60.00	80.00
	140	CAG01/4	0.00	0.00	27.27	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	60.00	80.00
	130	CAG01/3	0.00	84.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	60.00	80.00
	125	CAG01/2	100.00	12.00	45.45	100.00	100.00	83.83	100.00	0.00	100.00	40.00	20.00

ตารางที่ 6 (ต่อ)

primer	fragment size (bp)	marker	DNA fragment (%)										
			C. nobilis	*C. maxima*	*C. reticulata*	*C. aurantifolia*	*C. sinensis*	*C. medica*	*C. limon*	*C. macroptera*	*C. hystrix*	*C. aurantium*	unknown species
GT03	480	GT03/9	9.09	84.00	0.00	0.00	100.00	58.33	0.00	0.00	100.00	40.00	20.00
	450	GT03/10	9.09	52.00	0.00	0.00	100.00	58.33	0.00	0.00	100.00	40.00	20.00
	400	GT03/13	0.00	4.00	100.00	50.00	33.33	41.67	100.00	100.00	0.00	60.00	80.00
	395	GT03/14	0.00	0.00	100.00	50.00	33.33	0.00	100.00	100.00	0.00	60.00	80.00
	195	GT03/20	63.64	88.00	18.18	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	40.00
	190	GT03/21	54.55	64.00	18.18	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	40.00
	180	GT03/23	9.09	80.00	0.00	50.00	0.00	25.00	0.00	100.00	100.00	40.00	0.00

หมายเหตุ

จำนวนตัวอย่าง *C. nobilis* Lour. 11 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง *C. aurantium* L. 5 ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่าง *C. medica* L. 12 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง *C. limon* (L.) Burm.f. 1 ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่าง *C. hystrix* DC. 1 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง *C. maxima* (Burm.) Merr. 25 ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่าง *C. reticulata* Blanco 11 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง *C. macroptera* Montrouz. 1 ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่าง *C. sinensis* Osbeck 3 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่าง *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle 2 ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่าง unknown species 5 ตัวอย่าง

2.3.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม จากการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม 10 ชนิด ที่เก็บจากพื้นที่บางส่วนทางภาคใต้ของประเทศไทยได้แก่ *C. maxia* (Burm.) Merr., *C. reticulata* Blanco, *C. medica* L., *C. macroptera* Montrouz., *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle, *C. hystrix* DC., *C. sinensis* Osbeck, *C. aurantium* L., *C. nobilis* Lour., *C. limon* (L.) Burm.f. และที่ไม่ทราบว่าเป็นชนิดใดอีก 5 ต้น รวมทั้งหมด 77 ต้น โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ทั้งหมด 116 แถบ นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis หาค่า Similarity coefficient ของ Jaccard โดยโปรแกรม NTSYS ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม มีค่าอยู่ในช่วง 0.534- 1.000 โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.728 และมะนาวพวงจากต้นเดียวกัน แต่ลักษณะผลแตกต่างกัน มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด (1.000) ส่วนมะนาวควายกับส้มโอที่เก็บจากศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง จังหวัดตรัง มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (0.534) สามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เป็น 5 กลุ่ม (รูปที่ 23) โดยมีสมาชิกจากทั้ง 5 กลุ่ม กระจายตัวอยู่ในกลุ่มต่างๆ (รูปที่ 24) ดังนี้

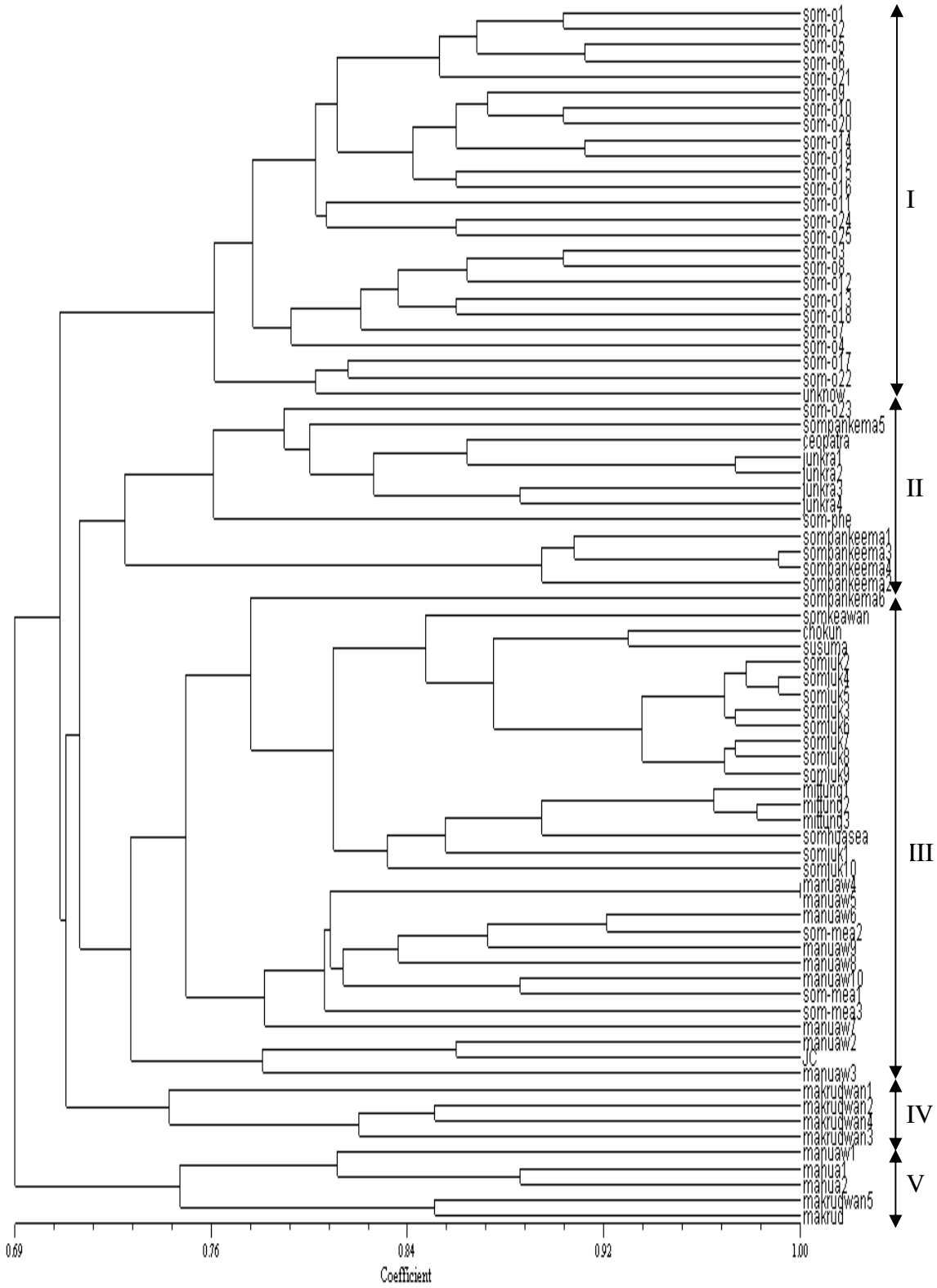
กลุ่มที่ 1 มี 25 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ส้มโอ 24 ตัวอย่าง และส้มที่ไม่ทราบชนิด 1 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 2 มี 12 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ส้มโอ 1 ตัวอย่าง ส้มแป้นขี้ม้า 5 ตัวอย่าง คลีโอพัตรา และส้มผี อย่างละ 1 ตัวอย่าง และจังกระ 4 ตัวอย่าง

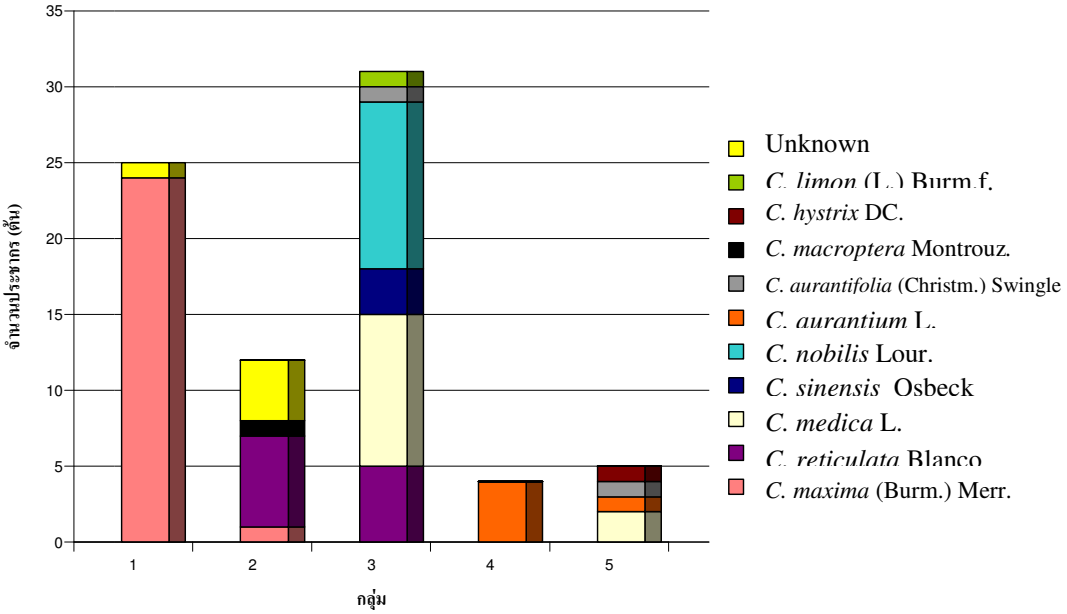
กลุ่มที่ 3 มี 31 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ส้มแป้นขี้ม้า ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ซัสซูมา และ ส้มเจซี อย่างละ 1 ตัวอย่าง ส้มจุก 11 ตัวอย่าง มะนาว เลมอน มะนาวไข่แพะ และมะนาวพิมพ์พร อย่างละ 1 ตัวอย่าง ส้มมิดถัง และส้มมืออย่างละ 3 ตัวอย่าง มะนาวเปลือกหนา มะนาวพวง และ มะนาวควายอย่างละ 2 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 4 มี 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วยมะกรูดหวาน 4 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 5 มี 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วยมะนาว 1 ตัวอย่าง มะกรูดหวาน 1 ตัวอย่าง มะงั่ว 2 ตัวอย่าง และมะกรูด 1 ตัวอย่าง



รูปที่ 23 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของพืชสกุลส้มจำนวน 77 ต้น จากการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ด้วยไพรเมอร์จำนวน 4 ไพรเมอร์



รูปที่ 24 แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ จากการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ร่วมกับไมโครแซทเทลไลท์

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มทั้ง 10 ชนิด ได้แก่ *C. maxima* (Burm.) Merr., *C. reticulata* Blanco, *C. medica* L., *C. macroptera* Montrouz., *C. aurantifolia* (Christm.) Swingle, *C. hystrix* DC, *C. sinensis* Osbeck, *C. aurantium* L., *C. nobilis* Lour., *C. limon* (L.) Burm.f. และที่ไม่ทราบว่าเป็นชนิดใดอีก 5 ต้น รวมทั้งหมด 77 ต้น ที่เก็บจากพื้นที่บางส่วนของภาคใต้ในประเทศไทยโดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ร่วมกับไมโครแซทเทลไลท์ ทั้งหมด แถบ นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ด้วยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis หาค่า Similarity coefficient ของ Jaccard โดยโปรแกรม NTSYS ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม มีค่าอยู่ในช่วง 0.569 – 0.991 โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.719 และมะนาวพวงจากต้นเดียวกัน แต่ลักษณะผลแตกต่างกัน มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.991) ส่วนมะกรูดจากอำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช กับส้มโอที่เก็บจากอำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (0.569) สามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความ

ใกล้ชิดทางพันธุกรรม เป็น 6 กลุ่ม (รูปที่ 25) โดยมีสมาชิกจากทั้ง 6 กลุ่มกระจายตัวอยู่ในกลุ่มต่าง ๆ (รูปที่ 26) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยส้มโอ 24 ตัวอย่าง และส้มไม่ทราบชนิด 1 ตัวอย่าง

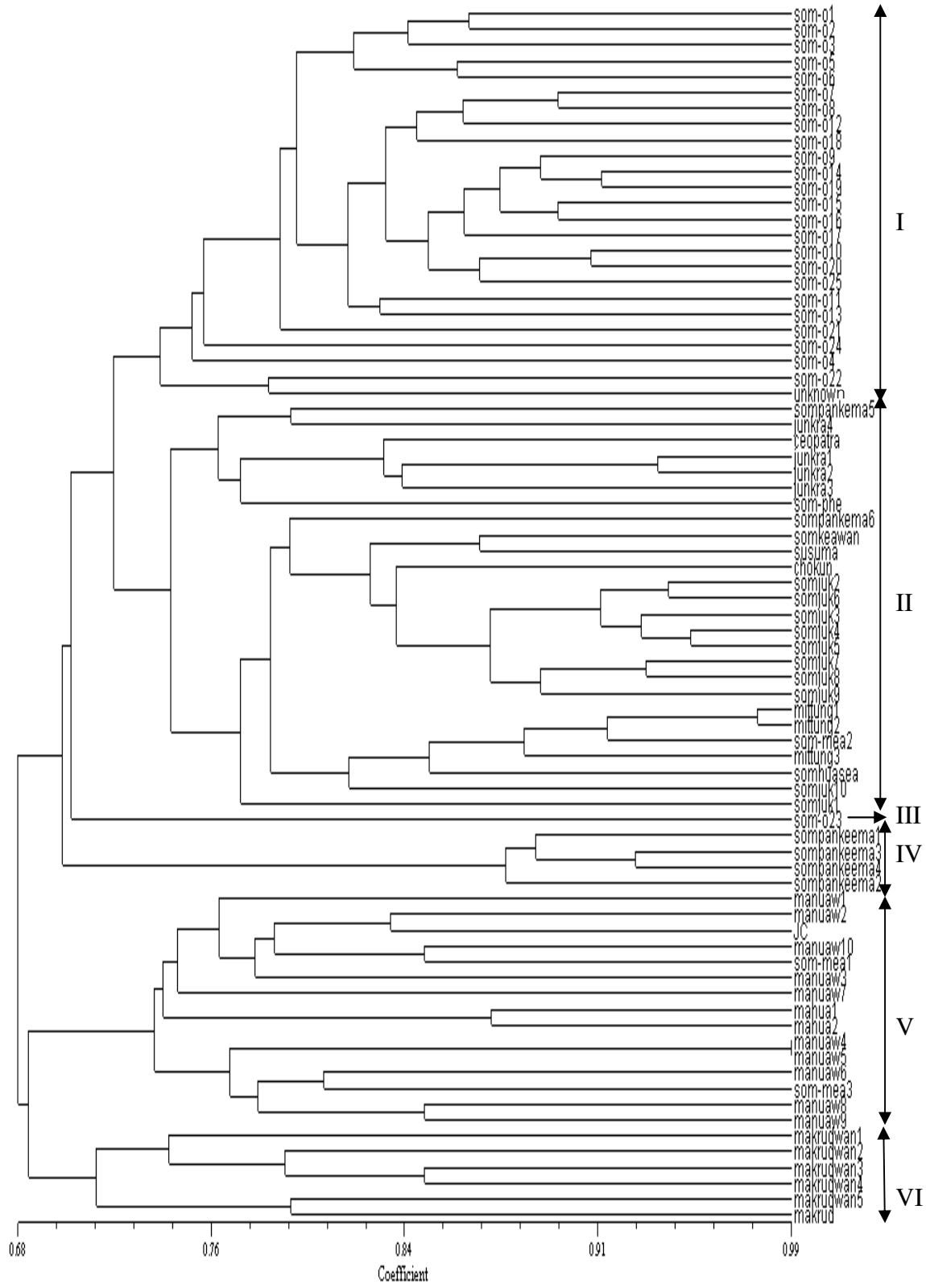
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ส้มจุก 11 ตัวอย่าง ส้มมิดถัง 3 ตัวอย่าง ส้มผี 1 ตัวอย่าง จังกระ 4 ตัวอย่าง ส้มมือ 1 ตัวอย่าง ส้มแป้นขี้ม้า 2 ตัวอย่าง ส้มคลีโอพัตรา ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน และซัสซูมาอย่างละ 1 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย ส้มโอ 1 ตัวอย่าง

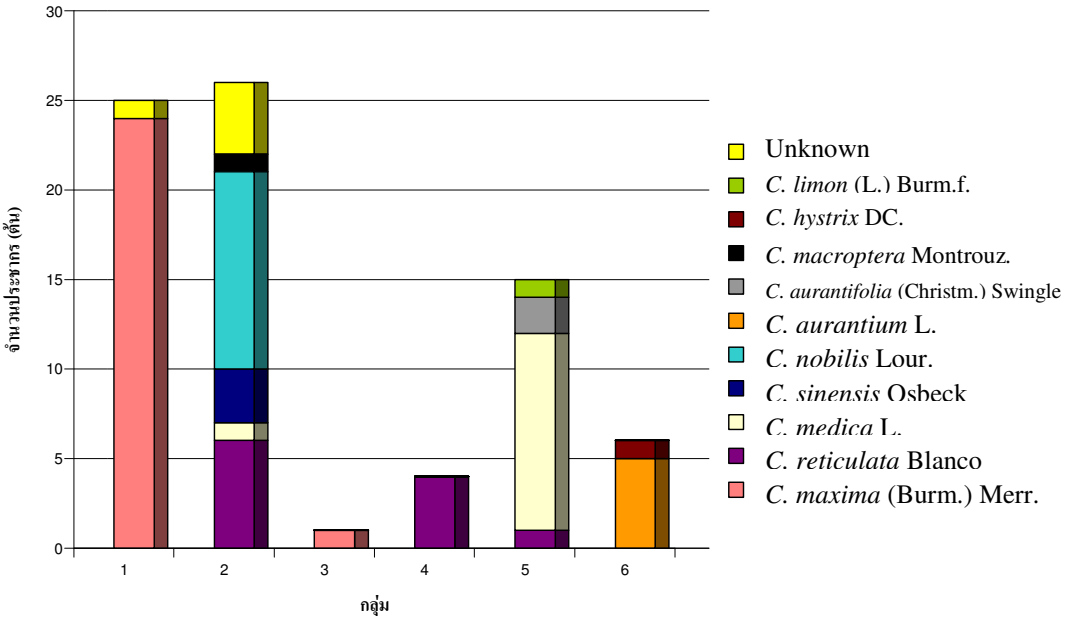
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย ส้มแป้นขี้ม้า 4 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย มะนาว 2 ตัวอย่าง ส้มเจซี 1 ตัวอย่าง มะนาวพวง ส้มมือ มะงั่ว และมะนาวควายอย่างละ 2 ตัวอย่าง มะนาวไข่แพะ มะนาวเปลือกหนา และมะนาวพิมพ์พร อย่างละ 1 ตัวอย่าง และเลมอนอีก 1 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย มะกรูด 5 ตัวอย่าง และมะกรูด 1 ตัวอย่าง



รูปที่ 25 เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของพืชสกุลส้มจำนวน 77 ต้น จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์



รูปที่ 26 แผนภูมิแท่งแสดงการกระจายตัวของประชากรในกลุ่มต่างๆ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในสกุลส้ม (*Citrus* spp.) ในภาคใต้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรพืชสกุลส้มโดยเก็บตัวอย่างจากบางพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสงขลา จังหวัดตรัง จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่าลักษณะใบ และรูปร่างผล เป็นลักษณะทางสัณฐานที่มีความแตกต่างค่อนข้างชัดเจน และในการศึกษาครั้งนี้ใช้ลักษณะดังกล่าวเป็นพื้นฐานในการสุ่มเก็บตัวอย่างพืช ลักษณะใบที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้นได้แก่ ลักษณะแผ่นใบ รูปร่างก้านใบ และปลายใบ พบว่าลักษณะแผ่นใบสามารถแยกความแตกต่างได้ 5 แบบ รูปร่างก้านใบ และปลายใบสามารถแยกความแตกต่างได้ 4 แบบ อย่างไรก็ตามอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ เพราะพบว่าส้มทั้ง 10 ชนิด และที่ไม่ทราบชนิดอีก 5 ตัวอย่าง บางชนิดมีการกระจัดกระจายอยู่แทบทุกกลุ่ม ในพืชสกุลส้มมีรายงานในการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายลักษณะที่นำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ส้มออกจากกัน ซึ่งพบว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในหลาย ๆ ลักษณะไม่สามารถจำแนกส้มออกจากกันได้อย่างชัดเจน เช่น รายงานของ Mariniello และคณะ (2004) ที่กล่าวว่าส้มบางชนิดสามารถจำแนกได้ง่ายจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่สำหรับบางชนิดหรือบางสายพันธุ์ต้องอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจำแนก เช่น RFLP, SSR และ AFLP เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้ในทุกลักษณะที่นำมาใช้ในการจำแนกส้มออกเป็นกลุ่ม ๆ นั้น เกณฑ์ที่นำมาใช้ในการจำแนก เป็นการจำแนกโดยใช้รูปร่างทั้งหมด จึงสามารถทำการประเมินโดยใช้สายตาได้ เช่น ลักษณะรูปร่างแผ่นใบ ซึ่งประกอบไปด้วย 4 ลักษณะ คือ รูปร่างแผ่นใบเป็นรูปรี รูปกลม รูปขอบขนาน รูปไข่ และรูปไข่กลับ เป็นต้น และพบว่าการจำแนกชนิดส้มจากลักษณะรูปร่างของก้านใบ ในกลุ่มที่มีก้านใบเล็กน้อยประกอบด้วย มิดถัง จังกระ ส้มจุกบางตัวอย่าง โชกุน ซัสซูมา มะกรูดหวานบางตัวอย่าง ส้มแป้นขี้ม้าบางตัวอย่าง มะนาว และส้มโอบางตัวอย่าง เมื่อจัดกลุ่มแล้วให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในกลุ่มที่ 3 ประมาณ 70.83 เปอร์เซ็นต์

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในสกุลส้มในภาคใต้โดยอาศัยเครื่องหมายอาร์เอพีดีและเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

การสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชสกุลส้ม ประมาณ 200 มิลลิกรัมต่อ CTAB บัฟเฟอร์ 700 ไมโครลิตร พบว่าได้ปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอมากเพียงพอต่อการนำไปเพิ่มปริมาณโดยการทำ PCR โดยไม่จำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนเหลวในการสกัดดีเอ็นเอ ทั้งนี้คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพืชสกุลส้มขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของใบที่นำมาใช้ในการสกัดเป็นหลัก เมื่อนำใบพืชสกุลส้มที่เพิ่งแตกยอดอ่อนมาใช้ในการศึกษา ดีเอ็นเอที่ได้จะได้ในปริมาณมากกว่า 80 นาโนกรัม เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA) และดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนเกาะกันแน่น ทำให้ล้างตะกอนดีเอ็นเอได้ไม่สะอาด และเมื่อนำใบแก่มาใช้สกัดดีเอ็นเอ ได้ปริมาณดีเอ็นเอปริมาณน้อย มีตะกอนสีขาวเล็กๆ ปะปนมากับตะกอนดีเอ็นเอ บางครั้งมีสีน้ำตาล ทั้งนี้สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นคือสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) (Prakash *et al*., 2002) ใบพืชสกุลส้มในระยะเพสลาดจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากให้ปริมาณ และให้คุณภาพดีเอ็นเอสูงกว่าใบในระยะอื่น มีสิ่งที่ปนออกมากับดีเอ็นเอน้อยหรือไม่มีเลย และเมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำพีซีอาร์พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะคมชัด ไม่เข้มและหนา เหมือนกับดีเอ็นเอที่ได้จากใบอ่อน สุรินทร์ (2545) ทดลองหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอพีดีโดยใช้ปริมาณตั้งแต่ 5-1,000 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา 15 ไมโครลิตร พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้เหมือนกันในช่วง 5-100 นาโนกรัม โดยที่ 5-10 นาโนกรัมแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่เข้มเท่ากับที่ 50 และ 100 นาโนกรัม ที่ปริมาณ 500 นาโนกรัม พบว่าแถบดีเอ็นเอบางแถบจางลง และที่ 1,000 นาโนกรัม แถบดีเอ็นเอบางส่วนหายไป สาเหตุที่ใช้ดีเอ็นเอปริมาณมากแล้วทำให้แถบดีเอ็นเอบางแถบหายไป เนื่องจากเมื่อใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นมาก ในขั้นตอนหลังจากที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแล้ว ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์เข้ามาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบนั้น ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีปริมาณมากอาจเกิดการคืนสภาพกลับมาจับตัวกันเองเป็นเกลียวคู่ใหม่ จึงขัดขวางการจับของไพรเมอร์ นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมาก สารเจือปนที่อยู่ในสารละลายดีเอ็นเอก็จะมีปริมาณมากขึ้นด้วย ทำให้มีผลต่อการปฏิกิริยาพีซีอาร์

การศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบหาความแตกต่างเบื้องต้นจำนวน 23 ไพรเมอร์ คัดเลือกมาจากไพรเมอร์ที่มีการรายงานว่าสามารถจำแนกความแตกต่างใน และระหว่างพืชสกุลส้ม ได้แก่ รายงานของ จรัสศรี และคณะ (2546) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ พบว่าไพรเมอร์ OPB-04 OPC-09 OPR-03 OPR-04 OPR-15 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรส้มโอหอมหาดใหญ่มากที่สุด Filho และคณะ (2000) ศึกษาความแปรปรวนในส้มกลุ่ม

Ponkan mandarin (*C. reticulata* Blanco) พบว่า ไพรเมอร์ OPA-01 OPA-18 ให้ความแตกต่างระหว่างประชากรมากที่สุด Dehesdtani และคณะ (2007) ใช้ไพรเมอร์ OPA-06 OPB-18 ในการคัดเลือกต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีในส้มสวีทออเรนซ์ Asadi และ Isshiki (2002) ศึกษาความหลากหลายของส้มที่มีรสเปรี้ยวในประเทศญี่ปุ่น จำนวน 31 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-04 OPA-05 OPA-12 OPB-12 พบว่าไพรเมอร์เหล่านี้ ให้แถบที่มีความจำเพาะกับส้มที่มีรสเปรี้ยวในบางสายพันธุ์ Cevik และ Moore (2007) สร้างแผนที่ยีนและจำแนกลูกผสมของพืชสกุลส้มโดยใช้ไพรเมอร์ OPA-02 OPB-01 OPB-05 OPC-02 OPC-05 OPC-08 OPE-11 OPC-11 OPE-14 และ OPC-13 จาก 23 ไพรเมอร์ ที่ทำการทดสอบ คัดเลือกเพียง 7 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน จากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 109 แถบที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี เป็นแถบที่ให้ความแตกต่าง (polymorphism) จำนวน 106 แถบ คิดเป็น 97.25% จากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชสกุลส้มชนิดใดชนิดหนึ่ง เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วย UPGMA cluster analysis หาค่า similarity coefficient โดยวิธีการของ Jaccard ในโปรแกรม NTSYS ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มจำนวน 77 ต้น อยู่ในช่วง 0.523-0.982 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.709 สามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ เป็น 5 กลุ่ม และพบว่าจะมีส้มบางพันธุ์กระจายอยู่ในกลุ่มของส้มชนิดอื่น เช่น ส้มแป้นขี้ม้าที่เก็บจากอำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ส้มตัวอย่างนี้ผลสุกแก่เต็มที่มีสีส้มในขณะที่ส้มแป้นขี้ม้าตัวอย่างอื่น ๆ ผลสุกแก่เต็มที่มีสีเขียวเข้ม ซึ่งอาจเกิดจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของพืช และยังพบว่าส้มกลุ่ม *C. reticulata* Blanco กระจายอยู่ในกลุ่ม II III IV และ V อีกหลายตัวอย่าง สอดคล้องกับ Fang และ Roose (1997) ที่สรุปว่าส้มในกลุ่มแมนดาริน (*C. reticulata* Blanco) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มมากกว่าส้มชนิดอื่นๆ เช่น สวีทออเรนซ์ เกรฟฟรุท เลมอน trifoliate oranges และ Citranges นอกจากนี้มะกรูดหวานเป็นส้มอีกชนิดหนึ่งที่พบความหลากหลายค่อนข้างมากซึ่งกระจายตัวอยู่ในกลุ่มที่ 3 4 และ5 เป็นต้น ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเป็นเพราะการผสมข้ามภายใน และระหว่างชนิดของพืชตระกูลส้มนั่นเอง Swingle (1943) แบ่งพืชสกุลส้มออกได้ 16 ชนิด ในขณะที่ Tanaka (1977) แบ่งส้มออกได้ถึง 162 ชนิด Moore (2001) ให้ความเห็นว่า Swingle และTanaka จำแนกส้มต่างกันมาก ตัวอย่างเช่น Swingle จัดส้มแมนดารินพันธุ์ป่าของญี่ปุ่นและอินเดียเป็น *C. reticulata* Blanco ในขณะที่ Tanaka แยกส้มแมนดารินพันธุ์ป่าญี่ปุ่น และอินเดียเป็น *C. tachibana* และ *C.indica* ตามลำดับ โดยรวม Tanaka แยกส้มกลุ่มแมนดารินได้มากถึง 36 ชนิด อย่างไรก็ตาม Barrett และ Rhodes (1976) สรุปว่าพืชสกุล *Citrus* ประกอบด้วยส้มเพียง 4 ชนิด คือซิตรอน (*C. medica* L.) แมนดาริน (*C. reticulata* Blanco)

ส้มโอ [*C. grandis* (L.) Osb., *C. maxima* (Burm.) Merr.] และ *C. halimii* Stone นอกเหนือจากทั้ง 4 ชนิดนี้แล้ว เป็นส้มที่เกิดการผสมข้ามระหว่างส้ม 4 ชนิดนี้ทั้งสิ้น

การศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ที่ทำการทดสอบให้แถบที่มีความแตกต่างทั้งหมด โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.534-1.000 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.728 ซึ่งสูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดีเล็กน้อย และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างสูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Manimekalai และ Kumaran (2006) ทำการศึกษาในมะพร้าวจำนวน 33 พันธุ์ พบว่าเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง หรือมีค่า polymorphism 100% ในขณะที่เครื่องหมายอาร์เอพีดีให้ค่า polymorphism 76.7% การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวป่าของ Guo-qin และคณะ (2005) พบว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดีให้แถบที่แตกต่างกันคิดเป็น 4.70% ส่วนไมโครแซทเทลไลท์ให้แถบที่แตกต่างกันคิดเป็น 47.62% จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจะมีมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืชที่ศึกษาด้วย เช่นหากเป็นพืชผสมตัวเอง เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจะน้อยกว่าพืชผสมข้าม นอกจากนี้แล้วความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอยังขึ้นกับเครื่องหมายที่ใช้ศึกษาด้วยเช่นกัน เช่นการศึกษาของ Belaj และคณะ (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในมะกอกโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เอเอฟแอลพี และไมโครแซทเทลไลท์ เปรียบเทียบผลที่ได้จากเทคนิคเหล่านี้พบว่า เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ให้เปอร์เซ็นต์ความเป็น polymorphism สูงและสามารถแสดงความเป็น heterozygosity ได้มากกว่าอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี ทั้งนี้เพราะไมโครแซทเทลไลท์หรือลำดับเบสซ้ำ เป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดของชุดซ้ำสั้นมากเพียง 1-4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส จะพบกระจายอยู่ทั่วไปทั้งจีโนม และมีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิต ซึ่งชุดเบสซ้ำ 3-4 คู่เบส จะพบน้อยกว่าชุดเบสซ้ำ 2 คู่เบส ลำดับเบสซ้ำนี้จะให้ข้อมูลมาก เพราะว่าเป็นเครื่องหมายแบบข่มร่วม (codominant) ในขณะที่อาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี เป็นเครื่องหมายที่แสดงออกแบบข่ม (dominant) (สุรินทร์, 2545) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงกว่า ไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์จากเทคนิคอาร์เอพีดี และไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ที่มีชุดเบสซ้ำ 2 คู่เบส (ไพรเมอร์ AC01, AG14 และGT03) ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่าไพรเมอร์ที่มีชุดเบสซ้ำ 3 คู่เบส (CAG01) ชุดเบสซ้ำที่มีลำดับเบส AG/TC ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดจำนวน 40 แถบ สอดคล้องกับรายงานของ สุรีพร (2546) รายงานว่าในจีโนมของพืชเขตร้อนส่วนใหญ่ เช่น ข้าวโพด จะพบลำดับเบสซ้ำ $(GT)_n$ และ$(AG)_n$ ในปริมาณมาก Novelli และคณะ (2006) ทดลองหาไพรเมอร์ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจำนวนมาก

ในส้มกลุ่มสวีทออเรนซ์ พบชุดเบสซ้ำ AG/TC มากที่สุดคิดเป็น 69% ในขณะที่พบเบสซ้ำ 3 ตัว คิดเป็น 14.2% โดย 8 % เป็นเบสซ้ำTCA/AGT และ 6.2 % เป็นเบสซ้ำ AAC/TTG

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกันของเทคนิคอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์ ให้ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.569-0.991 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.719 ส่วนส้มโอพันธุ์คลานเป็นส้มโอเพียงตัวอย่างเดียวที่ปรากฏในกลุ่มที่ III ซึ่งแตกต่างจากส้มโอตัวอย่างอื่นที่ปรากฏในกลุ่มที่ I อย่างไรก็ตาม จรัสศรี และคณะ (2546) รายงานว่า ลักษณะภายนอกบางประการของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่และพันธุ์คลานมีความใกล้เคียงกัน เช่น ลักษณะใบ และผล แต่เมื่อวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมแล้ว พบว่า ส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่กับพันธุ์คลานมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.690 ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับส้มโอหอมหาดใหญ่น้อยกว่าพันธุ์สีดอกคำ สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่กับพันธุ์คลานมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.689 และพบว่า ผลของส้มโอพันธุ์คลาน มีขนาดเล็กกว่าส้มโอหอมหาดใหญ่ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อม และการดูแลรักษา เป็นต้น

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าทั้งสองเทคนิคสามารถนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มได้ดี และให้ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน แต่เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์มีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิคอาร์เอพีดี เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์เพียง 4 ชนิดก็สามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ใกล้เคียงกับเทคนิคอาร์เอพีดี 7 ไพรเมอร์ ให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ กรกช (2550) ที่รายงานว่าการศึกษาความสัมพันธ์ของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม และยางพาราพันธุ์แนะนำโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี 8 ไพรเมอร์ ร่วมกับเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ 3 ไพรเมอร์ พบว่าเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ไพรเมอร์เพียง 3 ชนิด สามารถให้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเทคนิคอาร์เอพีดีที่ใช้ไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากเทคนิคอาร์เอพีดีมีข้อจำกัดในเรื่องความไวต่อปัจจัยต่างๆ ที่เกียวข้องหลายปัจจัย เช่นสภาพในการทำพีซีอาร์ คุณภาพของดีเอ็นเอ รวมไปถึงไพรเมอร์ที่ใช้ และการจับตัวของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นแบบสุ่มด้วยไพรเมอร์ชนิดเดียว ส่วนไมโครแซทเทลไลท์นั้น คุณภาพของดีเอ็นเอที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ไม่จำเป็นต้องมีคุณภาพดีมากเหมือนกับเทคนิคอาร์เอพีดี (สุรินทร์, 2545) เนื่องจากมีตำแหน่งของการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่แน่นอนด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิดที่ตำแหน่ง 5’ ของสายดีเอ็นเอทั้ง 2 เส้น แต่ไมโครแซทเทลไลท์จะต้องปรับสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ เช่นการปรับอุณหภูมิให้มีความจำเพาะสำหรับการเข้าจับของไพรเมอร์ซึ่งขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของเบสในไพรเมอร์ขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด อุณหภูมิสำหรับการเข้าเกาะของไพรเมอร์กับดี

เอ็นเอต้นแบบจะใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่า T_m (melting temperature: อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพธรรมชาติ 50%) ประมาณ 5 องศาเซลเซียส (กรกช, 2550) อย่างไรก็ตามทั้งสองเทคนิคต่างก็มีข้อดีและข้อจำกัด แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้ทั้งสองเทคนิคร่วมกันน่าจะเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

Spiegel-Roy และ Goldschmidt (1996) กล่าวไว้ว่า พืชสกุลส้มมีความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากส้มเป็นพืชผสมข้าม โอกาสที่จะเกิดการผสมข้ามกันระหว่างชนิดและพันธุ์เป็นไปได้ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ความแปรปรวนของพืชสกุลส้มมีผลมาจากปัจจัยหลายประการนอกเหนือจากการเกิดการผสมข้าม เช่นการเกิดการกลายพันธุ์ และวิธีการที่ใช้ในการขยายพันธุ์ (Novelli *et al*., 2006) ตัวอย่างในการผสมข้ามระหว่างส้มต่างชนิดเช่น *C. nobilis* Lour. หรือส้มจุกเกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *C. reticulate* Blanco กับ *C. sinensis* Osbeck (Chomchalow, 1984) เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อพิจารณาจากเดนโดรแกรมทั้ง 3 เดนโดรแกรม พบว่าส้มจุก (*C. nobilis* Lour.) ทุกตัวอย่าง จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ มิดถัง (*C. sinensis* Osbeck) โชกุน คลีโอพัตรา และซัสซูมา (*C. reticulata* Blanco) และเดนโดรแกรมจากเทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับไมโครแซทเทลไลท์พบว่า ส้มจุกมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับส้มเขียวหวาน โชกุน และซัสซูมา โดยมีค่า similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.724-0.871 ในขณะที่ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของส้มมิดถัง และส้มจุกมีค่าอยู่ในช่วง 0.742-0.880 นอกจากนี้พบว่าส้มจังกระทั้ง 4 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นส้มที่ไม่ทราบชนิดถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย ซึ่งส้มจังกระ 2 ตัวอย่าง ที่เก็บจากพืชสวนตรัง และอีก 1 ตัวอย่างจากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับส้มคลีโอพัตรามากที่สุด (0.822-0.840) และจังกระอีก 1 ตัวอย่าง จากสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับส้มแป้นขี้ม้าจากอำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราชมากกว่าชนิดอื่น (0.791) อย่างไรก็ตามทั้งส้มคลีโอพัตราและส้มแป้นขี้ม้าจัดเป็นส้มที่อยู่ในกลุ่มแมนดาริน (*C. reticulate* Blanco) ดังนั้นจึงคาดว่าจังกระน่าจะเป็นส้มที่อยู่ในกลุ่มนี้ ส่วนส้มที่ไม่ทราบชนิดอีก 1 ตัวอย่าง มีลักษณะผิวคล้ายกับมะกรูดแต่ที่ขั้วผลมีลักษณะเป็นจุกคล้ายกับส้มจุก และมีขนาดของผลใกล้เคียงกับส้มจุกใหญ่ แต่พบว่ามีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับส้มโอมากที่สุด (0.804) เมื่อวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพียงอย่างเดียวพบว่า ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของส้มที่ไม่ทราบชนิดตัวอย่างนี้มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ ส้มจุก จากศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง และส้มแป้นขี้ม้าที่เก็บจากอำเภอสทิงพระ จังหวัดสงขลามากที่สุด (0.807) อย่างไรก็ตามมีรายงานในพืชหลายชนิดที่พบว่า เมื่อแบ่งกลุ่มพืชโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและเปรียบเทียบการใช้เครื่องหมายโมเลกุลพบว่าให้ผลที่แตกต่างกันและสรุปว่าลักษณะสัณฐานวิทยาไม่มีความสัมพันธ์กับแถบดีเอ็นเอที่

ศึกษา เช่น การศึกษาเชื้อพันธุกรรมส้มกลุ่มแมนดารินในทางตอนใต้ของประเทศบราซิล พบว่าเมื่อจำแนกส้มกลุ่มนี้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน เช่น ความกว้าง ความยาว ความยาวของก้านใบ สีของกลีบผล จำนวนกลีบผล และจำนวนเมล็ดต่อผลให้ผลไม่ตรงกันกับการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Santos *et al*, 2003) เป็นต้น

จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของพืชสกุลส้มในภาคใต้ ซึ่งส่วนใหญ่น่าจะเกิดจากการผสมข้ามระหว่างชนิด หรือระหว่างพันธุ์ และมีการขยายพันธุ์ต่อมาโดยการใช้เมล็ด ความหลากหลายที่เกิดขึ้น แม้จะไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่ก็สมควรที่จะมีการอนุรักษ์พันธุ์ในแง่ของการใช้ประโยชน์ในด้านอื่น เช่น เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ หรือใช้เป็นต้นตอสำหรับพันธุ์เศรษฐกิจ ที่อ่อนแอต่อโรคทางราก และสภาพแวดล้อม ดังรายงานของ มงคล (2535) รายงานว่า ในพืชสกุลส้มมีการติดตาต่อกิ่งกันระหว่างชนิดได้กว้างขวางมาก โดยไม่เกิดปัญหามากนัก และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการค้าได้ ในขณะที่พืชตระกูลอื่น มีโอกาสทำได้สำเร็จน้อยกว่า สำหรับการจำแนกพันธุ์การอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ไม่เพียงพอ ต้องอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ เข้ามาเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและแม่นยำ เช่นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี หรือไมโครแซทเทลไลท์ จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งพบว่าทั้งสองเครื่องหมายให้ผลของจำแนกชนิดและพันธุ์ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ขึ้นกับจำนวนและชนิดของไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบต้องมากพอ และมีความเหมาะสมด้วยเช่นกัน

บทที่ 5

สรุป

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชสกุลส้มในภาคใต้โดยการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์

1. ลักษณะทางสัณฐานที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มพืชสกุลส้มได้มากกว่าลักษณะอื่นคือ ใบ และผล สำหรับลักษณะใบที่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุด คือ ลักษณะรูปร่างก้านใบ
2. จากการคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับอาร์เอพีดี จำนวน 23 ชนิด เพื่อค้นหาไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างและคมชัด สามารถคัดเลือกได้ 7 ชนิด คือ OPA-04 OPB-05 OPB-12 OPC-02 OPC-08 OPR-04 และ OPAN-12
3. การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดี 7 ชนิด และไพรเมอร์สำหรับเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ 4 ชนิด ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อส้มชนิดใด
4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้มทั้ง 77 ต้น (ส้ม 10 ชนิดและไม่ทราบชนิดอีก 5 ตัวอย่าง) โดยใช้แถบดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดี สามารถจัดกลุ่มพืชสกุลส้มได้เป็น 5 กลุ่ม และมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.523-0.982 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.709 การวิเคราะห์โดยใช้แถบดีเอ็นเอจากไมโครแซทเทลไลท์ สามารถจัดกลุ่มพืชสกุลส้มได้เป็น 5 กลุ่ม และมีค่าดัชนีความใกล้ชิดอยู่ระหว่าง 0.534- 1.000 โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.728 และเมื่อนำทั้งสองเทคนิคร่วมกันทั้งหมด 222 แถบ สามารถจัดกลุ่มพืชสกุลส้มได้เป็น 6 กลุ่ม และมีค่าดัชนีความใกล้ชิดอยู่ระหว่าง 0.569 – 0.991 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.719 จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของพืชสกุลส้มในภาคใต้
5. เมื่อนำทั้งสองเทคนิคร่วมกัน ส้มจังกระ ทั้ง 4 ต้น มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมใกล้กับ ส้มคลีโอพัตรา และส้มแป้นขี้ม้า (*C. reticulata* Blanco) มากที่สุด ส่วนส้มที่ไม่ทราบชื่อ มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมใกล้กับส้มโอ [*C. maxima* (Burm.) Merr.] มากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

กรกช นาคคนอง. 2550. การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิม และพันธุ์แนะนำ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จรัสศรี นวลศรี สุวิมล กลศึก และวิจิตต์ วรรณชิต. 2546. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่และพันธุ์พื้นเมืองในเขตจังหวัดสงขลาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี.วารสารสงขลานครินทร์ วทท 25: 577-587.

เฉลิมพล ภูมิไชย์. 2539. การจำแนกสายพันธุ์พลับโดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชุมพล คุณวาสี. 2551. สัณฐานวิทยาเบื้องต้นในการระบุชื่อวงศ์พืชดอกสามัญ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ: หจก.ฟันนี่พับลิชชิ่ง.

ธีรชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2542. เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์ส้มโอ.รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 11 ณ มหาวิทยาลัยสุรนารี 6-8 ตุลาคม 2542 หน้า 215-219.

ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2543. เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก.วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1: 6 – 10.

ธีระชัย ธนานันต์. 2550. การจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 15: 9-13.

มงคล แซ่หลิม. 2535. การผลิตส้ม. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รัฐพล ฉัตรบรรยงค์ สุรศักดิ์ นิลนนท์ และอุณารุจ บุญประกอบ. 2551. การตรวจสอบพันธุ์องุ่นรับประทานสดพันธุ์ป๊อกดำและริเบียร์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39 (พิเศษ): 82-85.

วิจิตต์ วรรณชิต มงคล แซ่หลิม และอิบรอเฮม ยีดำ. 2529. การสำรวจและรวบรวมพันธุ์ส้มโอในเขตจังหวัดสงขลา. รายงานการวิจัย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิจิตต์ วรรณชิต. 2544. ส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ศุภกิจ แก้วถนอม. 2540. การปลูกมะนาว. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรสยาม.

สห ดุลพงศ์ วิลาวรรณ ศิริพูนวิวัฒน์ และปรัชญา นกพึ่ง. 2546. การศึกษาความสัมพันธ์ของส้มโชกุนโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี.วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 20: 45-53.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล.2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5: 37-59.

เสาวณี คงศรี และอุณารุจ บุญประกอบ. 2551. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของส้มโอในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย Simple Sequence Repeat (SSR). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39 (พิเศษ):82-85.

Asadi.A.A. and Isshiki.S. 2003. Molecular characterization and genetic diversity among Japanese acid citrus (*Citrus* spp.) based on RAPD markers. Horticultural Science and Biotechnology 78: 108-112.

Barkley, A.N., Roose, L.M., Krueger, R.R. and Federici, T.C. 2006. Assessing genetic diversity and population structure I a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theoretical and Applied Genetics 112: 1519-1531.

Barrett, H.C. and Rhodes, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationship in cultivated citrus and its close relatives. Australian Systematic Botany 1: 105–136.

Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L. And Trujillo, I. 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theoretical and Applied Genetics 107: 736-744.

Carlos, R. M., Breto, P. and Asins, M.J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedling in citrus breeding programs using SSR markers. Euphytica 112: 89-94.

Cevik, M.S. and Moore, G.A. 2007. Construction of genetic linkage map of Citrus with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers using a progeny population from a complex intergeneric cross. Turkish Journal of Botany 31: 79-86.

Chomchalow, N. 1984. Vernacular names of citrus in Southeast Asia. IBPGR Regional Committee for Southeast Asia Newsletter 8:3-5.

Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Nunes, W.M.C., Cristofani, M. and Targon, M.L.P.N. 2001. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradise* Macf.) and pummelos (C. *maxima* (Burm. Merr.) using RAPD and SSR markers. Euphytica 126: 169-176.

Davies, F.S. and Albrigo, L.G.1994. Citrus. Wiltshire: Redwood Book.

Dehesdtani, A., Kazemitabar, S.K. and Rahimian, H. 2007. Assessment of genetic diversity of navel sweet orange cultivars grown in Mazandaran province using RAPD markers. Asian Journal of Plant Science 6: 1119-1124.

Dey, S.S., Singh, A.K., Chandel, D. and Behera, T.K. 2006. Genetic diversity of bitter gourd (*Monordica charantia* L.) genotypes revealed by RAPD markers and agronomic traits. Scientia Horticulturae 109: 21-28.

Doijode, S.D. 2001. Seed Storage of Horticultural Crops. New York: An Imprint of the Haworth Press.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Fang, D.Q. and Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theoretical and Applied Genetics 95: 408-417.

Filho Coletta, H.D., Machado, M. A., Luiza, M. P., Targon, P.N. and Jr, J. P. 2000. The use of random amplified polymorphic DNA to evaluate the genetic variability of Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) accessions. Genetics and Molecular Biology 23: 169-172.

Guo-qin, Y., Bao, Y., Chun-hai, S., Chang-qin, D. and Ge, S. 2005. Genetic diversity and population differentiation of Liaoning weedy rice detected by RAPD and SSR markers. Biochemical Genetics 43: 261-270.

Jaccard, P. 1908. Nouvellers recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles 44: 223-270.

Manimekalai, M., Nagarajan, P. and Kumaran, P.M. 2006. Comparison of effectiveness of RAPD, ISSR and SSR markers for analysis of coconut (*Cocos nucifera* L.) Germplasm accessions. Eighteenth Annual Congress of the PGIA 16:22.

Mariniello, L., Sommella, M.G., Cozzolino, A., Pi Pierro, P., Ercolini, E. and Porta, R. 2004. Identification of Campania *Citrus limon* L. by random amplified polymorphic DNA markers. Food Biotechnology 18: 289-297.

Moore, G. A. 2001. Oranges and lemon: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. TRENDS in Genetics 17:536-540.

Mukhopadhyay, S. 2004. Citrus Production, Postharvest, Disease and Pest Management. Enfield: Science Publishers.

Natividade Targon, M. L. P., Machado, M. A., Filho Coletta, H.D. and Cristofani, M. 2000. Genetic polymorphism of sweet orange (Citrus sinensis [L.] Osbeck) varieties evaluated by random amplified polymorphic DNA. Acta Horticulturae 535: 51-54.

Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A. And Malfa, S.La. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theoretical and Applied Genetics 100: 1155-1166.

Nicolosi, E. 2007. Origin and Taxonomy. *In* Breeding and Biotechnology, (eds. Khan, I.A.) CAB International, pp. 19-43.

Novelli, V.M., Cristofani, M., Souza, A.A. and Machado, M.A. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (Citrus sinensis L. Osbeck). Genetics and Molecular biology 29: 90-96.

Prakash, D.P., Narayanaswamy, P. and Sondor, N.S. 2002. Analysis of molecular diversity in guava using RAPD marker. Horticultural Science and Biotechnology 77: 287-293.

Rohlf, F.J. 2002. NTSYS – pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version-2.1. New York: Applied Biostatistics.

Santos, P.K., Dornelles, A.L.C. and Freitas, L.B. 2003. Characterization of mandarin citrus germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 38: 797-806.

Shaaban, E.A., Abb-Ee-Aal, S., K. H., Zaied, N.S. and Aida, A.R. 2006. Assessment of genetic variability on some orange accessions using RAPD-DNA markers. Agriculture and Biological Sciences 2: 564-570.

Spiegel-Roy, P. and Goldschmidt, E.E. 1996. Biology of Citrus. New York: Cambridge University Press.

Sugawara, K and Oowada A. 1995. Identification of *Citrus* Chimeras by RAPD markers. HortScience 30: 1276-1278.

Swingle, W.T. 1943. The botany of Citrus and its wild relatives. 1st edition. *In* The Citrus Industry, (eds. Webber, H.J and Batchelor, D.L). Vol.1 Berkeley: University of California, pp. 128–474.

Tanaka, T. 1977. Fundamental discussion of Citrus classification. Stud. Citrologia 14: 1-6.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืช

1) CTAB บัฟเฟอร์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PVP-40	1.0	กรัม
$NaCl_2$	8.12	กรัม
0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	4 .0	มิลลิลิตร
1.0M Tris-HCl (pH 8.0)	10.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม CTAB ปริมาณ 2 กรัม หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าสารละลายได้หมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เติมสาร β-mercaptoethanol เข้มข้น 2% ก่อนนำมาใช้

2) TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.0 M Tris-HCl (pH 7.5)	500	ไมโครลิตร
0.25M Na_2EDTA (pH 7.0)	200	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

สารเคมีที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis

1) TAE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร
0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	50.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

2) TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	216.0	กรัม
Boric acid	110.0	กรัม
0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	80.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า และนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้

3) DNA sample buffer

Bromophenol blue	125.0	มิลลิกรัม
Xylene cyanol FF	125.0	มิลลิกรัม
Glycerol	15.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

4) Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรต่อ Ethidium bromide 1 กรัม

สารเคมีที่ใช้ในการทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

1) 30% Acrylamide Bis-Acrylamide solution ที่ผสมแล้ว ในอัตราส่วน 29:1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) TBE บัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	216.0	กรัม
Boric acid	110.0	กรัม
0.5M Na_2EDTA (pH 8.0)	80.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

3) 10% (w/v) Ammonium persulfate(APS) เตรียมปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Ammonium persulfate	1.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4) 6X gel loading buffer (สำหรับ denaturing polyacrylamide gel) เตรียมปริมาตร 1 มิลลิลิตร

Formamide	950	ไมโครลิตร
5% Bromophenol blue	10	ไมโครลิตร
5% Xylene cyanol	10	ไมโครลิตร
1 M EDTA	20	ไมโครลิตร

ควรแบ่งสารละลายใส่หลอดเล็ก แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5) Bind silane สำหรับทากระจกแผ่นหลังที่ติดกับเจล

Bind silane	1.0	ไมโครลิตร
Glacial acetic acid	2.5	ไมโครลิตร
95% Ethanol	500	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอด้วย Silver nitrate

1) Fixative และ Stop solution (10% Acetic acid) เตรียมปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2) 0.2% Silver nitrate เตรียมปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Silver nitrate	2.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) Develop solution เตรียมปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Sodium carbonate	25.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะใช้ให้เติม 40% Formaldehyde 500 ไมโครลิตร และ Sodium thiosulfate เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 ชื่อเต็ม และคำย่อที่ใช้ในการกำหนดชื่อพืชสกุลส้มที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	คำย่อ	ชื่อ	ชนิด
1	som-o1	ส้มโอ	*C. maxima* (Burm.) Merr.
2	som-o2	ส้มโอ	*C. maxima* (Burm.) Merr.
3	som-o3	ส้มโอ	*C. maxima* (Burm.) Merr.
4	som-o4	ส้มโอ	*C. maxima* (Burm.) Merr.
5	som-o5	ส้มโอพันธุ์คูเต่า	*C. maxima* (Burm.) Merr.
6	som-o6	ส้มโอพันธุ์ปัตตาเวีย	*C. maxima* (Burm.) Merr.
7	som-o7	ส้มโอพันธุ์เจ้าเสวย	*C. maxima* (Burm.) Merr.
8	som-o8	ส้มโอพันธุ์ขาวพวง	*C. maxima* (Burm.) Merr.
9	som-o9	ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา	*C. maxima* (Burm.) Merr.
10	som-o10	ส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่	*C. maxima* (Burm.) Merr.
11	som-o11	ส้มโอพันธุ์ขาวทองดี	*C. maxima* (Burm.) Merr.
12	som-o12	ส้มโอพันธุ์ขาวแป้น	*C. maxima* (Burm.) Merr.
13	som-o13	ส้มโอพันธุ์ขาวเมืองนนท์	*C. maxima* (Burm.) Merr.
14	som-o14	ส้มโอพันธุ์สายน้ำผึ้ง	*C. maxima* (Burm.) Merr.
15	som-o15	ส้มโอพันธุ์ท่าข่อย	*C. maxima* (Burm.) Merr.
16	som-o16	ส้มโอพันธุ์โคกยาง	*C. maxima* (Burm.) Merr.
17	som-o17	ส้มโอพันธุ์พื้นบ้าน	*C. maxima* (Burm.) Merr.
18	som-o18	ส้มโอพันธุ์พื้นบ้าน	*C. maxima* (Burm.) Merr.
19	som-o19	ส้มโอพันธุ์พื้นบ้าน	*C. maxima* (Burm.) Merr.
20	som-o20	ส้มโอพันธุ์พื้นบ้าน	*C. maxima* (Burm.) Merr.
21	som-o21	ส้มโอ	*C. maxima* (Burm.) Merr.
22	som-o22	ส้มโอพันธุ์พื้นบ้าน	*C. maxima* (Burm.) Merr.
23	som-o23	ส้มโอพันธุ์คลาน	*C. maxima* (Burm.) Merr.
24	som-o24	ส้มโอพันธุ์ขาวทองดี	*C. maxima* (Burm.) Merr.
25	som-o25	ส้มโอ	*C. maxima* (Burm.) Merr.
26	sompankeema1	ส้มแป้นขี้ม้า	*C. reticulata* Blanco
27	sompankeema2	ส้มแป้นขี้ม้า	*C. reticulata* Blanco

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	คำย่อ	ชื่อ	ชนิด
28	sompankeema3	ส้มแป้นขี้ม้า	*C. reticulata* Blanco
29	sompankeema4	ส้มแป้นขี้ม้า	*C. reticulata* Blanco
30	sompankema 5	ส้มแป้นขี้ม้า	*C. reticulata* Blanco
31	sompankema 6	ส้มแป้นขี้ม้า	*C. reticulata* Blanco
32	somkeawan	ส้มเขียวหวาน	*C. reticulata* Blanco
33	chokun	ส้มโชกุน	*C. reticulata* Blanco
34	susuma	ซัสซูมา	*C. reticulata* Blanco
35	JC	เจซี	*C. reticulata* Blanco
36	cleopatra	คลีโอพัตรา	*C. reticulata* Blanco
37	mittung1	มิดถัง	*C. sinensis* Osbeck
38	mittung2	มิดถัง	*C. sinensis* Osbeck
39	mittung3	มิดถัง	*C. sinensis* Osbeck
40	manuaw1	มะนาว	*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle
41	manuaw2	มะนาวด่านเกวียน	*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle
42	manuaw3	มะนาวเปลือกหนา	*C. medica* L.
43	manuaw4	มะนาวพวง	*C. medica* L.
44	manuaw5	มะนาวพวง	*C. medica* L.
45	manuaw6	มะนาวไข่แพะ	*C. medica* L.
46	manuaw7	มะนาวควาย	*C. medica* L.
47	manuaw8	มะนาวควาย	*C. medica* L.
48	manuaw9	มะนาวพิมพ์พร	*C. medica* L.
49	mahua1	มะงั่ว	*C. medica* L.
50	mahua2	มะงั่ว	*C. medica* L.
51	som-mea1	ส้มมือ	*C. medica* L.
52	som-mea2	ส้มมือ	*C. medica* L.
53	som-mea2	ส้มมือเสือ	*C. medica* L.

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	คำย่อ	ชื่อ	ชนิด
54	manuaw10	มะนาวเลมอน	*C. limon* (L.) Burm.f.
55	somhuasea	ส้มมือเสือ	*C. nobilis* Lour.
56	somjuk1	ส้มจุกใหญ่	*C. nobilis* Lour.
57	somjuk2	ส้มจุก	*C. nobilis* Lour.
58	somjuk3	ส้มจุก	*C. nobilis* Lour.
59	somjuk4	ส้มจุก	*C. nobilis* Lour.
60	somjuk5	ส้มจุก	*C. nobilis* Lour.
61	somjuk6	ส้มจุก	*C. nobilis* Lour.
62	somjuk7	ส้มจุก	*C. nobilis* Lour.
63	somjuk8	ส้มจุก	*C. nobilis* Lour.
64	somjuk9	ส้มจุก	*C. nobilis* Lour.
65	somjuk10	ส้มจุก	*C. nobilis* Lour.
66	makrud	มะกรูด	*C. hystrix* D.C.
67	makrudwan1	มะกรูดหวาน	*C. aurantium* L.
68	makrudwan2	มะกรูดหวาน	*C. aurantium* L.
69	makrudwan3	มะกรูดหวาน	*C. aurantium* L.
70	makrudwan4	มะกรูดหวาน	*C. aurantium* L.
71	makrudwan5	มะกรูดหวาน	*C. aurantium* L.
72	som-phe	ส้มผี	*C. macroptera* Montrouz.
73	Junkra1	จังกระ	-
74	Junkra2	จังกระ	-
75	Junkra3	จังกระ	-
76	Junkra4	จังกระ	-
77	unknown	ไม่ทราบชื่อ	-

ตารางภาคผนวกที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ ลำดับเบสของไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทดสอบอาร์เอพีดี- พีซีอาร์กับดีเอ็นเอของพืชสกุลส้ม

Primer	Sequences (5'→3')	Pattern
OPA-01	CAGGCCCTTC	polymorphism
OPA-02	TGCCGAGCTG	polymorphism
OPA-04	AATCGGGCTG	polymorphism
OPA-05	AGGGGTCTTG	polymorphism
OPA-06	GGTCCCTGAC	not clear
OPA-12	TCGGCGATAG	non-amplified
OPA-18	AGGTGACCGT	polymorphism
OPB-01	GTTTCGCTCC	polymorphism
OPB-04	GGACTGGAGT	polymorphism
OPB-05	TGCGCCCTTC	polymorphism
OPB-12	CCTTGACGCA	polymorphism
OPB-18	CCACAGCAGT	not clear
OPC-02	GTGAGGCGTC	polymorphism
OPC-05	GATGACCGCC	polymorphism
OPC-08	TGGACCGGTG	polymorphism
OPC-09	CTCACCGTCC	polymorphism
OPC-11	AAAGCTGCGG	not clear
OPC-13	AAGCCTCGTC	polymorphism
OPE-11	GAGTCTCAGG	not clear
OPE-14	TGCGGCTGAG	not clear
OPAN-12	AACGGCGGTC	polymorphism
OPR-03	ACACAGAGGG	polymorphism
OPR-04	CCCGTAGCAC	polymorphism

ตารางภาคผนวกที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ ลำดับเบสของไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทดสอบไมโครแซทเทลไลท์-พีซีอาร์ กับดีเอ็นเอของพืชสกุลส้ม

Primer	**Sequences (5'►3')**	**Pattern**
AC01	TTTGACATCAACATAAAACAAGAAA (F)	polymorphism
	TTTTAAAATCCCTGACCAGA (R)	
AG14	AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA (F)	polymorphic
	CTTCCTCTTGCGGAGTGTTC (R)	
CAG01	AACACTCGCACCAAATCCTC (F)	polymorphism
	TAAATGGCAACCCCAGCTTTG (R)	
CT19	CGCCAAGCTTACCACTCACTAC (F)	non-amplified
	GCCACGATTTGTAGGGGATAG (R)	
CTT01	TCAGACATTGAGTTGCTCG (F)	not clear
	TAACCACTTAGGCTTCGGCA (R)	
GT03	GCCTTCTTGATTTACCGGAC (F)	polymorphism
	TGCTCCGAACTTCATCATTG (R)	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวบัณฑิตา คงพันธุ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010620047

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549