ORIGINAL ARTICLE

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่และพันธุ์พื้นเมืองในเขตจังหวัดสงขลาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

จรัสศรี นวลศรี [1] สุวิมล กลศึก[2] และ วิจิตต์ วรรณชิต[3]

Abstract

Nualsri, C., Kolasuk, S. and Wannachit, W.

Analysis of genetic variation among Pummelo (*Citrus maxima* (Burm) Merrill) cv. Hom Hat Yai and indigenous in Songkhla province based on RAPD markers

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2003, 25(5) : 577-587

RAPD technique was used to detect genetic variation among 85 samples of pummelo (*Citrus maxima* (Burm) Merrill) cv. Hom Hat Yai from different sites in Songkhla province. The genotypes analysed included 15 accessions of indigenous pummelo. DNA was exracted from leaf samples and 88 decamer primers were screened. Five primers that generated clear polymorphic fragments were chosen for further study. Identical banding patterns among all pummelo cv. Hom Hat Yai obtained in this study indicated no genetic variation. Banding patterns derived from 5 primers revealed significant differences between Hom Hat Yai and indigenous pummelos. The results of the pairwise analysis of the RAPD data indicated Hom Hat Yai showed a high similarity index with Sri-dok-kam and indigenous pummelos collected from Kuanlung district.

Key words : Pummelo cv. Hom Hat Yai, *Citrus maxima*, Genetic variation, RAPDs

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112

[1]Ph.D.(Agronomy-Plant Breeding) ผู้ช่วยศาสตราจารย์, [2]วท.ม. (พืชศาสตร์) ผู้ช่วยวิจัย, [3]Ph.D. (Horticulture) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: ncharass@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 5 กุมภาพันธ์ 2545 รับลงพิมพ์ 25 มิถุนายน 2546

บทคัดย่อ

จรัสศรี นวลศรี สุวิมล กลศึก และ วิจิตต์ วรรณชิต

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ และพันธุ์พื้นเมืองในเขตจังหวัดสงขลาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2546 25(5) : 577-587

ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของส้มโอ (*Citrus maxima* (Burm) Merrill) พันธุ์หอมหาดใหญ่ จำนวน 85 ตัวอย่าง รวมทั้งพันธุ์พื้นเมือง 15 ตัวอย่าง ซึ่งสุ่มจากแหล่งปลูกสำคัญในเขตจังหวัดสงขลา โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบ และคัดเลือกไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ จากจำนวนไพรเมอร์ 88 ชนิดที่ตรวจสอบ พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 5 ชนิดที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันชัดเจน เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทดสอบกับส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ พบว่าทุกต้นให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทุกไพรเมอร์ แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มโอหอมหาดใหญ่ที่สุ่มมาศึกษา ในขณะที่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่และพันธุ์พื้นเมือง จากการวิเคราะห์ค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่และพันธุ์พื้นเมืองต่าง ๆ พบว่าส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่มีความใกล้ชิดกับพันธุ์สีดอกคำและพันธุ์พื้นเมืองจากตำบลควนลังมากที่สุด

ส้มโอ (pummelo) เป็นพืชสกุลส้มที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *C. maxima* (Burm) Merrill หรือ *Citrus grandis* L. หรือ *C. decumana* L. (มงคล และ วิจิตต์, 2528) ประเทศไทยมีการปลูกส้มโอทั่วทุกภาค สำหรับภาคใต้โดยเฉพาะจังหวัดสงขลา ส้มโอที่นิยมปลูกมากที่สุด คือ ส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ รองลงมาคือ ส้มโอพันธุ์คลาน และพันธุ์สีดอกคำ (วิจิตต์ และคณะ, 2529) ลักษณะประจำพันธุ์ของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่คือ ผลใหญ่ เปลือกหนา เนื้อผลสีแดง มีกลิ่นหอม และไม่มีเมล็ด อย่างไรก็ตามในระยะหลังพบว่าลักษณะประจำพันธุ์บางลักษณะมีการเปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ สีเนื้อและรสชาติ รวมทั้งการมีเมล็ดเกิดขึ้น (Figure 1) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากสาเหตุหลายประการด้วยกัน เช่น การให้ปุ๋ย หรืออาจเกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ เนื่องจากเกษตรกรมักปลูกส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ร่วมกับส้มโอพันธุ์คลานหรือสีดอกคำหรือพันธุ์อื่นๆ จากการศึกษาของศยามล (2544) พบว่า ดอกส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่สามารถติดผลได้ทั้งที่ได้รับการถ่ายละอองเกสรและไม่ได้รับการถ่ายละอองเกสร แต่ค่าการติดผลที่ได้มีความแตกต่างกันคือ การถ่ายละอองเกสรแบบผสมข้ามกับส้มโอพันธุ์อื่นๆ มีการติดผลสูงโดยเฉพาะกับส้มโอพันธุ์คลานมีการติดผลสูงถึง 82% นอกจากสาเหตุดังกล่าวนี้แล้วความแปรปรวนที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งจากต้นแม่ที่มีการกลายพันธุ์ก็เป็นได้ และเพื่อให้ทราบผลชัดจนจึงนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล คือ อาร์เอพีดี (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) มาใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่และส้มโอพันธุ์พื้นเมืองอื่นๆ ในแหล่งปลูกส้มโอของจังหวัดสงขลา

เทคนิคอาร์เอพีดี เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้วิเคราะห์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาดสั้นเพียงชนิดเดียว (William *et al.*, 1990) ในส่วนของพืชสกุลส้มนั้นมีรายงานการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้และประสบผลสำเร็จมากมาย เช่น การหาความสัมพันธ์ของส้มแมนดาริน (*C. deliciosa* Tenore) 39 จีโนไทพ์ จากไพรเมอร์ 21 ชนิด ที่ทำการทดสอบพบว่า ให้แถบดีเอ็นเอ 111 แถบ โดย 48% ของแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งพบความแตกต่างมากที่สุดในกลุ่มของลูกผสมข้ามระหว่างแมนดารินกับส้มชนิดอื่น ในขณะที่ลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างส้มกลุ่มแมนดารินเองให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอน้อยมาก อย่างไรก็ตามจากการใช้ไพรเมอร์ OPN14 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,410 คู่เบส ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อบางจีโนไทพ์ได้ (Machado *et al.*, 1996)

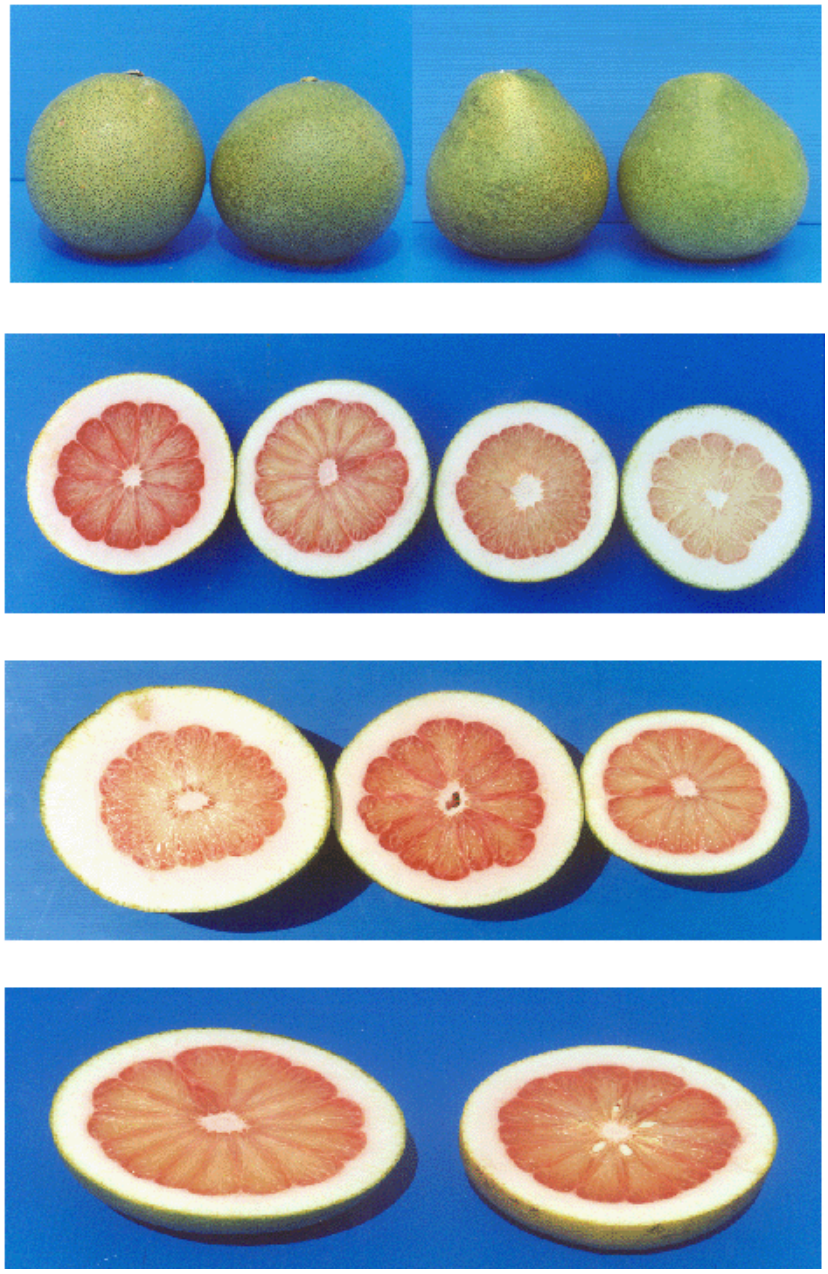

Figure 1. Morphological differences found in Pummelo cv. Hom Hat Yai: (A) fruit shape (B) color of pulp (C) peel thickness (D) with seed and seedless.

Coletta Filho และคณะ (1998) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบพันธุ์ส้มแมนดาริน (*Citrus* spp.) 35 ชนิด พบว่าส้มแมนดารินกลุ่มนี้มีฐานทางพันธุกรรมค่อนข้างแคบ โดยพบว่าในกลุ่มของแมนดารินเอง คือ *C. reticulata* Blanco มีพันธุกรรมที่แตกต่างกันมากกว่าชนิดอื่น และเมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของส้มแมนดารินกับส้มกลุ่มอื่นๆ คือ ซิตรอน (*C. medica* L.) และส้มโอ (*C. grandis* Osbeck) พบความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก Deng และคณะ (1995) ทำการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของเลมอน จำนวน 14 ชนิด รวมทั้งเลมอนที่ได้จากการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองอีก 1 ชนิด โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอของต้นกล้าเลมอนที่ได้พัฒนามาจากการผสมระหว่างไข่และสเปอร์ม (ต้นกล้าไซโกติก: zygotic seedling) โดยใช้ไพรเมอร์ 36 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 14 ชนิด ที่ให้แถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน และไพรเมอร์ 22 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 43 แถบ จากแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 294 แถบ ซึ่งในจำนวนแถบดีเอ็นเอ 43 แถบนี้ มีแถบดีเอ็นเอ 20 แถบ ที่มีความจำเพาะต่อเลมอนบางพันธุ์ Luro และคณะ (1995) ประสบความสำเร็จในการแยกความแตกต่างของต้นกล้าส้มที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัส หรือที่เรียกว่า ต้นกล้านิวเซลลา (nucellar seedling) และต้นกล้าไซโกติก โดยการใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ mini-satellite และการทำ hybridization ด้วยโพรบขนาดสั้น คือ $(GTG)_5$, $(TCC)_5$ และ $(GACA)_4$ แต่ไม่สามารถใช้โพรบ 3 ชนิดนี้ในการแยกความแตกต่างของส้ม 10 สายพันธุ์ในกลุ่มของ *C. sinensis* ในขณะที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของ *C. reticulata* ได้ อย่างไรก็ตามการแยกความแตกต่างของลูกผสมทำได้ยาก เนื่องจากพันธุกรรมของพ่อและแม่มีความใกล้ชิดกันมาก นอกจากนี้แล้วยังมีการตรวจสอบหาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างส้ม 95 ชนิดโดยใช้เทคนิคอื่นๆ เช่น inter-simple sequence repeats (ISSR), simple sequence repeats (SSR) และไอโซไซม์ (isozyme) พบว่ากลุ่มของเลมอนมีระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย ในขณะที่พบความแปรปรวนค่อนข้างสูงในกลุ่ม *Citrus taxa* เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย ISSR พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันถึง 103 แถบ นอกจากนี้พบว่ากลุ่มของเลมอนมีวิวัฒนาการมาจากลูกผสมเดี่ยวระหว่างส้มกลุ่มซิตรอนกับจีโนไทพ์อื่นรวมทั้งกลุ่มของแมนดารินและส้มโอด้วย เนื่องจากพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับ *C. reticulata* และ *C. maxima* ภายในกลุ่มของเลมอน (Gulsen and Roose, 2001)

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ รวมไปถึงการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่และส้มโอพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกในเขตจังหวัดสงขลาโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุพืช

สุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ ตามแหล่งปลูกและขยายพันธุ์ที่สำคัญ 5 แหล่ง คือ ต.ควนลัง (อ.หาดใหญ่) อ.บางกล่ำ บ้านท่าโพธิ์ (อ.สะเดา) อ.คลองหอยโข่ง และแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 85 ตัวอย่าง (Table 1) และเก็บตัวอย่างใบส้มโอพันธุ์พื้นเมืองอีกจำนวน 15 ตัวอย่างจาก 6 แหล่งปลูก (Table 2) เพื่อนำมาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

2. การตรวจสอบพันธุ์ส้มโอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบส้มโอที่เก็บได้ทั้งหมดจากสถานที่ต่างๆ ตามวิธีการดังนี้คือ ใช้ใบปริมาณ 200 มก. นำมาบดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ถ่ายใส่ในหลอดเอพเพนดอร์ฟแล้วจึงเติม CTAB บัฟเฟอร์ (Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, NaCl เข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, PVP-40 เข้มข้น 1%, CTAB เข้มข้น 2% และ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2%) ปริมาตร 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 60ºC เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นจึงเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบาๆ ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไปและล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยแอลกอฮอล์ 70% จำนวน 2 ครั้ง วางตะกอนไว้ให้แห้งที่

Table 1. Source and number of samples (Pummelo cv. Hom Hat Yai) collected

Source	Number
Kuanlung, Hat Yai	33
Bang Klam	20
Thapo, Sadao	11
Khlong Hoi Khong	17
Plant Science Department	4

Table 2. Source of indigenous pummelo collected

Plant accessions	Variety	Colour of pulp	Source
W1	unknown	white	Thapo, Sadao
W2	unknown	white	Thapo, Sadao
W3	Kao-Yai	white	Rattaphum
W4	unknown	white	Thapo, Sadao
W5	Pong	white	Thapo, Sadao
W6	Pong	white	Thapo, sadao
R1	Sri-dok-kam	red	Bang Klam
R2	Sri-dok-kam	red	Plant Science Department
R3	Klan	red	Plant Science Department
R4	unknown	red	Kuanlung, Hat Yai
R5	unknown	red	Kuanlung, Hat Yai
R6	unknown	red	Thapo, Sadao
R7	Som-o-dang	red	Thapo, Sadao
R8	Som-o-dang	red	Thapo, Sadao
R9	Thongdee	red	Rattaphum

อุณหภูมิห้องและละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE บัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl และ 1 mM Na_2EDTA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บใว้ที่อุณหภูมิ -30ºC

หาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยใช้วุ้น SeaKem เข้มข้น 0.7% ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี แล้วเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว

2.2 การคัดเลือกไพรเมอร์

คัดเลือกดีเอ็นเอของส้มโอ 3 พันธุ์คือ หอมหาดใหญ่ ขาวใหญ่ และทองดี เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของส้มโอ โดยในการศึกษาใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 88 ชนิดคือ ไพรเมอร์ OPA-01--06, OPA-08-20, OPB-02, OPB-04-05, OPB-09-10, OPB-12, OPB-16, OPB-19, OPD-01-03, OPD-05-09, OPD-11-12, OPD-14-15, OPD-18-20, OPC-01-07, OPC-09-20, OPR-01-20, OPT-01-06 และ OPT-18 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการพีซีอาร์ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

น้ำกลั่น	16.2 ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์	2 ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 mM	2.5 ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด เข้มข้น 150 mM	1.5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.3 mM	1.5 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (1.5 ยูนิต)	0.3 ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่พิมพ์เข้มข้น 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร	1.0 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	25 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันดี นำไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิ และเวลาดังนี้

อุณหภูมิ 95ºC เวลา 1 นาที
อุณหภูมิ 37ºC เวลา 1 นาที
อุณหภมิ 72ºC เวลา 2 นาที
} ทำซ้ำจำนวน 39 รอบ

ตามด้วยอุณหภูมิ 95ºC เวลา 1 นาที 37ºC 1 นาที 72ºC 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสด้วยวุ้น LE agarose ความเข้มข้น 1.75% ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ ในสารละลาย TBE คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของส้มโอได้ชัดเจนมาทำการศึกษาต่อไป

2.3 การวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ผลทำโดยการให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง โดยคิดเฉพาะแถบที่ค่อนข้าง

Table 3. List of the primers that produced RAPD polymorphisms among 15 accessions of pummelo.

Primer	Sequence (5'——— 3')	Number of bands		
		Total	Monomorphic	Polymorphic
OPB-04	GGACTGGAGT	15	1	14
OPC-09	TGTCTGGGTG	13	3	10
OPR-03	ACACAGAGGG	13	3	10
OPR-04	CCCGTAGCAC	16	3	13
OPR-15	GGACAACGAG	17	2	15
	Total	74	12	62

ชัดเจน ให้คะแนน “1” เมื่อมีแถบดีเอ็นเอ และ “0” เมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกัน หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Similarity Index) ตามวิธีการของ Nei และ Li (1979) สร้างเดนโดรแกรมโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป RAPDistance (Armstrong *et al*., 1994)

ผลการทดลอง

จากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมด 88 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 80 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ 8 ไพรเมอร์ คือ OPA-12, OPB-10, OPB-16, OPB-19, OPD-06, OPD-09, OPD-14 และ OPR-18 โดยไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน (polymorphism) จำนวน 31 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกัน (monomorphism) จำนวน 43 ไพรเมอร์ และให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน 6 ไพรเมอร์ จึงคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความชัดเจนที่สุดจำนวน 5 ไพรเมอร์ เพื่อใช้ตรวจสอบพันธุ์ส้มโอคือ OPB-04, OPC-09, OPR-03, OPR-04 และ OPR-15 (Table 3)

จากจำนวนไพรเมอร์ 5 ชนิดที่ทำการทดสอบ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 74 แถบ เฉลี่ย 15 แถบต่อไพรเมอร์ ขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง < 500 ถึง 3000 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวน 14 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 62 แถบ (Table 3) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของส้มโอหอมหาดใหญ่ทุกต้นที่สุ่มมาศึกษา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันไม่ว่าจะใช้ไพรเมอร์ใดก็ตาม (Figure 2) ส่วนในพันธุ์อื่นๆ พบว่าส้มโอโป่งจากบ้านท่าโพธิ์ อ.สะเดา (W5, W6) ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกไพรเมอร์ ยกเว้นไพรเมอร์ OPC-09 ที่มีความแตกต่างกันเล็กน้อย ส้มโอเนื้อสีขาวที่ไม่ทราบชื่อ 2 ตัวอย่าง (W2, W4) มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันใน 2 ไพรเมอร์ คือ OPR-03 และ OPR-04 ส้มโอแดง 2 ต้นที่เก็บจากแหล่งเดียวกัน (R7, R8) ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอต่างกันทุกไพรเมอร์ สำหรับส้มโอพันธุ์สีดอกคำจาก อ.บางกล่ำ (R1) และตัวอย่างที่เก็บจากแปลงภาควิชาพืชศาสตร์ (R2) ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกัน 2 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ OPC-09 และ OPR-03 ในขณะที่ไพรเมอร์อื่นๆ ให้แถบดีเอ็นเอต่างกัน ส่วนพันธุ์อื่นๆ ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน และมีความแตกต่างจากส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ (H) ชัดเจน (Figure 3, 4) เมื่อศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างส้มโอหอมหาดใหญ่และพันธุ์อื่นๆ โดยพิจารณาจากค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมตามวิธีการของ Nei และ Li (1979) (Table 4) พบว่าพันธุ์หอมหาดใหญ่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์สีดอกคำ (R2) มากที่สุดโดยมีค่าดัชนีความไกล้ชิดทางพันธุกรรม 0.814 ในขณะที่พันธุ์หอมหาดใหญ่และพันธุ์คลาน (R3) มีค่าดัชนีความไกล้ชิดทางพันธุกรรมเพียง 0.690 เมื่อพิจารณาจากเดนโดรแกรมที่ได้พบว่าสามารถแยกส้มโออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะสีเนื้อผล คือกลุ่มเนื้อสีแดงและกลุ่มเนื้อสีขาว ยกเว้นส้มโอแดง (R8) และส้มโอพันธุ์ทองดี (R9) ที่มีความไกล้ชิดทางพันธุกรรมกับกลุ่มส้มโอเนื้อสีขาวมากกว่ากลุ่มเนื้อสีแดง (Figure 5)

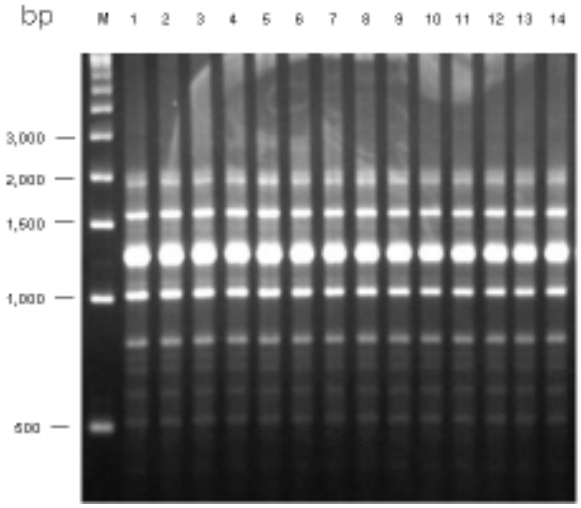

Figure 2. RAPD patterns of Pummelo cv. Hom Hat Yai with primer OPR-03. Lanes 1-3 are Hom Hat Yai from Kuanlung, 4-6 from Thapo, 7-9 from Bang Klam, 10-12 from Khlong-hoi-khong and 13-14 from Plant Science Department. M is 500 bp Ladder DNA.

วิจารณ์

จากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิด ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มกับดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากตัวอย่างใบส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ ซึ่งสุ่มเก็บในเขตจังหวัดสงขลาจำนวนทั้งสิ้น 85 ต้น พบว่าทุกต้นให้แถบดีเอ็นเอเป็นแบบเดียวกันทั้งหมด ไม่ว่าจะใช้ไพรเมอร์ใดก็ตาม แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ในพื้นที่ที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง อย่างไรก็ตามผลการทดลองครั้งนี้ได้จากการทดสอบกับไพรเมอร์เพียง 5

Table 4. Similarity index of Pummelo cv. Hom Hat Yai and 15 indigenous pummelos based on Nei and Li (1979); Letter-number assessions from table 2

	W1	W2	W3	W4	W5	W6	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
W2	0.762														
W3	0.711	0.632													
W4	0.819	0.819	0.720												
W5	0.800	0.706	0.727	0.738											
W6	0.828	0.736	0.734	0.767	0.954										
R1	0.762	0.714	0.632	0.723	0.706	0.736									
R2	0.741	0.667	0.712	0.700	0.707	0.691	0.765								
R3	0.634	0.634	0.541	0.617	0.675	0.659	0.683	0.785							
R4	0.716	0.642	0.685	0.675	0.707	0.714	0.741	0.897	0.785						
R5	0.674	0.605	0.692	0.659	0.713	0.697	0.767	0.868	0.738	0.868					
R6	0.767	0.698	0.718	0.729	0.736	0.742	0.744	0.819	0.786	0.843	0.727				
R7	0.674	0.744	0.590	0.706	0.621	0.652	0.791	0.699	0.643	0.723	0.704	0.727			
R8	0.747	0.651	0.800	0.732	0.809	0.814	0.771	0.750	0.642	0.725	0.777	0.729	0.682		
R9	0.785	0.658	0.817	0.744	0.725	0.707	0.683	0.737	0.675	0.711	0.667	0.790	0.593	0.667	
H	0.764	0.652	0.741	0.727	0.756	0.739	0.742	0.814	0.690	0.813	0.813	0.791	0.681	0.773	0.738

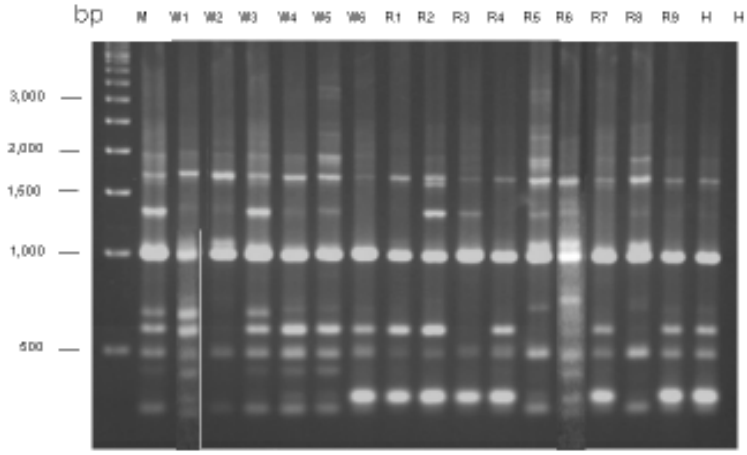

Figure 3. RAPD patterns of indigenous pummelo (lanes 2-15) compared to Hom Hat Yai (lanes 16-17) with primer OPC-09. Lane 1 (M) is 500 bp Ladder DNA.

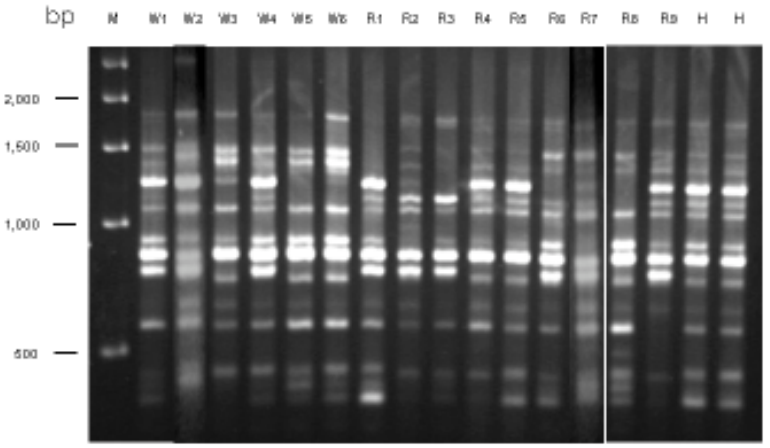

Figure 4. RAPD patterns of indigenous pummelo (lanes 2-15) compared to Hom Hat Yai (lanes 16-17) with primer OPR-15. Lane 1 (M) is 500 Ladder DNA.

ชนิดเท่านั้น อาจต้องใช้จำนวนไพรเมอร์ที่มากกว่านี้เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง แม้จะไม่มีหลักฐานชัดเจนว่าต้นกำเนิดของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่มาจากที่ใด แต่หลายคนเชื่อว่าตำบลควนลัง อำเภอหาดใหญ่ น่าจะเป็นแหล่งปลูกดั้งเดิมของส้มโอพันธุ์นี้ ในอดีตเมื่อพบว่าส้มโอต้นไหนมีรสชาติดีจะมีการขยายพันธุ์ต่อไปโดยการเพาะเมล็ด ไม่นิยมการขยายพันธุ์โดยวิธีการตอนอย่างเช่นในปัจจุบัน ดังนั้นจึงเกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นเดิม ส้มโอหอมหาดใหญ่อาจจะเกิดจากการกลายพันธุ์โดยวิธีการนี้ อย่างไรก็ตามในพืชตระกูลส้มหลายชนิดมีรายงานการเกิดลักษณะอะโพมิกซิส (apomixis) คือ การพัฒนาของเมล็ดเกิดจากเนื้อเยื่อนิวเซลลัส (nucellus) ซึ่งจะให้ต้นกล้าที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ (Cameron and Soost, 1969; Gulsen and Roose, 2001) ขณะเดียวกันส้มบางพันธุ์เมื่อทำการเพาะเมล็ดจะให้ต้นกล้าจำนวนหนึ่งที่เหมือนต้นแม่ซึ่งเป็นต้นกล้านิวเซลลา ที่เหลือจะเป็นต้นกล้าไซโกติกซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างจากต้นแม่เพราะเกิดจากการผสมข้าม สำหรับส้มโอนั้นยังไม่มีรายงานลักษณะดังกล่าว นอกจากนี้ Deng และคณะ (1995) รายงานว่าการเกิดพันธุ์ใหม่ๆ อาจเกิดจากการกลายของ

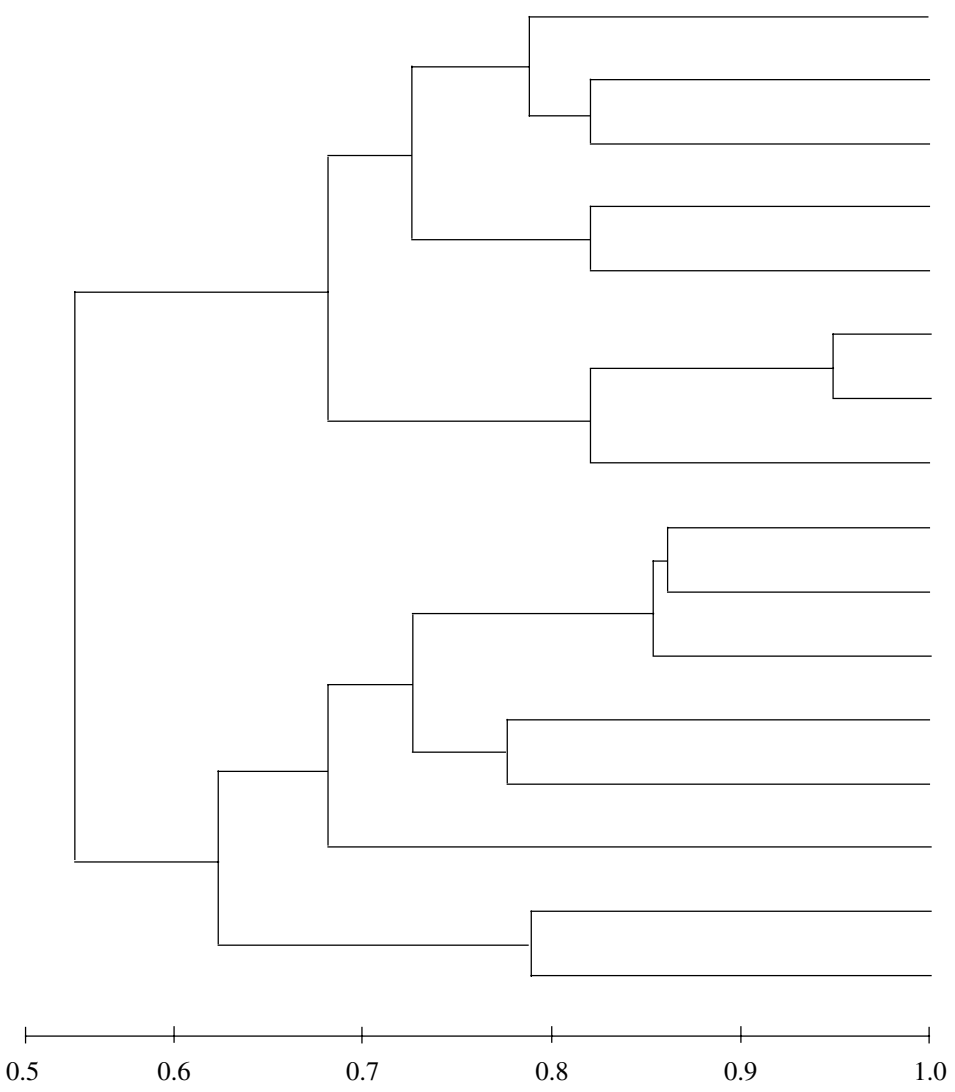

Figure 5. Dendrogram of Pummelo cv. Hom Hat Yai and 15 indigenous pummelos based on Nei and (1979) similarity coefficients using RAPDistance software; Letter-number assessions from table 2.

เซลล์ต้นพืช (somatic mutant) เช่น การผิดปกติของตาที่แตกใหม่ (bud sport) และเมื่อมีการขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งจากส่วนดังกล่าวจะได้ต้นที่แตกต่างจากต้นแม่เดิม หรือในบางครั้งอาจเกิดการกลายพันธุ์ของต้นกล้านิวเซลลา (Roose *et al*., 1995)

เนื่องจากแถบดีเอ็นเอของส้มโอหอมหาดใหญ่แต่ละตัวอย่างที่สุ่มศึกษาในครั้งนี้ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นความแปรปรวนของลักษณะบางอย่างที่พบ เช่น ลักษณะผล ความหนาเปลือก หรือสีเนื้อผล อาจจะเกิดจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อม จากการสอบถามเกษตรกรในหลายพื้นที่ต่างรายงานตรงกันว่าผลที่เกิดจากต้นส้มโอที่มีอายุน้อยมักมีเปลือกหนา และเปลือกผลจะค่อยๆ บางลงเมื่อส้มโออายุมากขึ้น และในต้นเดียวกันอาจพบผลที่มีลักษณะแตกต่างกันด้วย สำหรับเรื่องการเกิดเมล็ดนั้นค่อนข้างชัดเจนว่าเกิดจากการผสมข้ามระหว่างส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่กับพันธุ์อื่นๆ ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นกับ

ส้มโอพันธุ์อื่น (Soost, 1964; ไพโรจน์, 2513; วิจิตต์, 2535) แม้กระทั่งมะนาวหนังก็สามารถผสมข้ามกับส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ได้ และสามารถติดเมล็ดเช่นกัน (ศยามล, 2544) นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเมล็ดจะมากน้อยแค่ไหนขึ้นกับความสามารถในการผสมข้าม ดังนั้นการป้องกันไม่ให้ส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่ติดเมล็ดสามารถทำได้โดยปลูกแยกจากพันธุ์อื่นๆ เพื่อไม่ให้เกิดการผสมข้าม ส่วนการรักษาพันธุ์ให้ตรงตามพันธุ์เดิมตลอดไปต้องใช้วิธีการขยายพันธุ์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับเพศเท่านั้น เช่น การติดตาหรือการตอนกิ่ง

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่และพันธุ์อื่นๆ จะเห็นความแตกต่างชัดเจน Moriguchi และ Omura (1995) รายงานความสำเร็จในการใช้เทคนิคดังกล่าวในการแยกความแตกต่างของส้มที่เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะบางส่วนของเนื้อเยื่อที่เรียกว่าไคเมอรา (chimera) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคอาร์เอพีดีมีประสิทธิภาพสูงเพียงพอที่จะใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มโอ เพราะสามารถตรวจสอบความแตกต่างในระดับยีนหรือดีเอ็นเอได้ เช่นเดียวกับผลในการศึกษาครั้งนี้ สามารถแยกความแตกต่างของส้มโอพันธุ์โป่งจำนวนสองตัวอย่าง (W5 และ W6) ได้แม้ว่าจะเพียงเล็กน้อยก็ตาม โดยมีค่าดัชนีของความใกล้ชิดทางพันธุกรรม 0.954 หรือพันธุ์สีดอกคำจากสองแหล่งก็พบความแตกต่างเช่นเดียวกัน (R1 และ R2) มีค่าเฉลี่ยดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม 0.765 ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่พบในส้มโอแต่ละพันธุ์นี้น่าจะมาการกลายพันธุ์เพราะใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์นั่นเอง ซึ่งหากดูจากลักษณะภายนอกแล้วไม่สามารถแยกความแตกต่างดังกล่าวได้ เมื่อพิจารณาจากเดนโดรแกรมที่ได้พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มส้มโอที่ทำการศึกษาครั้งนี้ได้เป็นสองกลุ่มตามความแตกต่างของสีเนื้อผลคือ กลุ่มพันธุ์เนื้อผลสีแดงและพันธุ์เนื้อผลสีขาว ยกเว้นส้มโอแดงและพันธุ์ทองดีซึ่งมีเนื้อสีแดงแต่ให้ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเฉลี่ยค่อนข้างสูงกับกลุ่มพันธุ์เนื้อสีขาวมากกว่า ส้มโอแดงเป็นพันธุ์ที่มีการปลูกมานานในพื้นที่อ.สะเดา ไม่ทราบแหล่งที่มาแน่นอน ชาวบ้านเรียกชื่อตามลักษณะสีเนื้อผลที่มีสีแดงเข้ม ส่วนพันธุ์ทองดีเป็นพันธุ์ดั้งเดิมแถบจังหวัดสมุทรสงคราม (ไพโรจน์, 2513) และเกษตรกรนำมาปลูกที่อ.รัตภูมิ ไม่ได้เป็นพันธุ์พื้นเมืองของแหล่งปลูกในแถบนี้ สำหรับค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุ์หอมหาดใหญ่กับพันธุ์เนื้อสีแดงอื่นๆ เฉลี่ย 0.749 โดยมีความใกล้ชิดกับพันธุ์สีดอกคำจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของภาควิชาพืชศาสตร์ (R2) และพันธุ์พื้นเมืองของควนลัง (R5) มากที่สุด (0.814 และ 0.813 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่กับพันธุ์คลานและสีดอกคำซึ่งเป็นพันธุ์รองในเขตปลูกส้มโอเดิมของอำเภอหาดใหญ่ (วิจิตต์ และคณะ, 2529) นั้น จากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอและการคำนวณค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมปรากฏว่าพันธุ์หอมหาดใหญ่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์สีดอกคำมากกว่าพันธุ์คลาน แม้ว่าลักษณะภายนอกบางลักษณะของพันธุ์คลานจะใกล้เคียงกับพันธุ์หอมหาดใหญ่ เช่น ลักษณะใบ และผล เป็นต้น ลักษณะสำคัญอื่นๆ ที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์หอมหาดใหญ่และสองพันธุ์นี้คือ พันธุ์หอมหาดใหญ่ไม่มีเมล็ด (ยกเว้นจะเกิดการผสมข้ามกับพันธุ์อื่น) และมีกลิ่นหอม ส่วนพันธุ์คลานและพันธุ์สีดอกคำมีเมล็ดและไม่มีกลิ่นหอม สำหรับพันธุ์พื้นเมืองจากต.ควนลังที่มีความใกล้ชิดกับพันธุ์หอมหาดใหญ่มากอีกพันธุ์หนึ่งนั้น ปัจจุบันมีอายุประมาณ 40-50 ปี ลักษณะคล้ายพันธุ์หอมหาดใหญ่ แต่สีเนื้อและสีผลอ่อนกว่า มีรสอมเปรี้ยว ติดผลดก แต่ไม่เป็นที่นิยมของเกษตรกร ในอนาคตอันใกล้ พันธุ์นี้อาจจะสูญหายไป

จากการส่งเสริมการปลูกส้มโอหอมหาดใหญ่ เนื่องจากความต้องการของผู้บริโภค และแรงจูงใจเรื่องราคาในอนาคตข้างหน้าอาจส่งผลให้เกษตรกรปลูกเฉพาะพันธุ์หอมหาดใหญ่เพียงพันธุ์เดียวและละทิ้งพันธุ์พื้นเมืองอื่นๆ ซึ่งก่อให้เกิดความเสี่ยงในเรื่องการถูกทำลายโดยโรคและแมลง เนื่องจากฐานพันธุกรรมของพันธุ์หอมหาดใหญ่แคบมาก ดังนั้นจึงควรมีการเก็บรักษาพันธุ์ส้มโอพื้นเมืองชนิดต่างๆ ไว้ด้วย เพื่อเป็นแหล่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมสำหรับโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ส้มโอในอนาคต

สรุป

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่โดยเทคนิคอาร์เอพีดี จากตัวอย่างจำนวน 85 ต้นจากแหล่งปลูกสำคัญในเขตจังหวัดสงขลา ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์นี้ แต่พบความ

แตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่และส้มโอพันธุ์พื้นเมืองอื่นๆ ชัดเจน เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา พบว่าในกลุ่มส้มโอที่มีเนื้อสีแดงด้วยกันยกเว้นพันธุ์ทองดี และส้มโอแดงอีก 1 ตัวอย่างมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเนื้อสีขาว โดยส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับส้มโอพันธุ์สีดอกคำและส้มโอพื้นเมืองที่เก็บจากสวนเกษตรกร ตำบลควนลังมากที่สุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการปลูกส้มโอหอมหาดใหญ่เพื่อการค้า ซึ่งมีผศ.ดร.วิจิตต์ วรรณชิต เป็นหัวหน้าโครงการ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ รวมไปถึงเกษตรกรเจ้าของสวนส้มโอในเขตจังหวัดสงขลาที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างใบสำหรับการศึกษาวิจัย คุณวิรัตน์ ทองคำ เจ้าหน้าที่สำนักงานเกษตรจังหวัดสงขลา สำหรับข้อมูลพื้นที่การปลูกส้มโอ และขอขอบคุณ อ.อดิเรก รักคง คุณณรงค์ฤทธิ์ ไชยสาลี คุณศยามล กาญจนปกรณ์ และคุณธัญญรัตน์ สุวรรณโณ ที่มีส่วนสำคัญทำให้งานวิจัยสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ ผลประสิทธิ์. 2513. การมี-ไม่มีเมล็ดของส้มโอขาวพวง. กสิกร 43: 31-44.

มงคล แซ่หลิม และวิจิตต์ วรรณชิต. 2528. ไม้ผลเมืองร้อน. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลนครินทร์. 47 หน้า.

วิจิตต์ วรรณชิต. 2535. ส้มโอพันธุ์หอมและการมี-ไม่มีเมล็ด. ว.สงขลานครินทร์ 14: 105-110.

วิจิตต์ วรรณชิต มงคล แซ่หลิม และอิบรอเฮม ยีดำ. 2529. การรวบรวมพันธุ์ส้มโอในจังหวัดสงขลา. สงขลา: รายงานการวิจัย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศยามล กาญจนปกรณ์. 2544. ผลของการถ่ายละอองเกสรต่อการติดผล การติดเมล็ด และคุณภาพผลส้มโอพันธุ์หอมหาดใหญ่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Armstrong, J.S., Gibbs, A.J., Peakal, R. and Weiller, G. 1994. The RAPDistance Package. Department of Botany and Zoology. Australian National University.

Cameron, J.W. and Soost, R..K. 1969. Citrus. *In* Outlines of Perennial Crops. (eds. Ferwerda, F.P and Wit, F.). Wageningen: Lanandouwhog school.

Coletta Filho, H.D., Machado, M.A., Targon, M.L.P.N., Moreira, M.C.P.Q.D.G. and Pompeu Jr, J. 1998. Analysis of genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. Euphytica 102: 133-139.

Deng, Z.N., Gentile, A., Nicolosi, E., Domina, F., Vardi, A. and Tribulato, E. 1995. Identification of *in vivo* and *in vitro* lemon mutants by RAPD markers. J. Hort. Sci. 70: 117-125.

Gulsen, O. and Roose, M.L. 2001. Lemons: diversity and relationships selected *Citrus* genotype as measured with genome markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126: 309-317.

Luro, F., Laigret, F., Bove, J.M. and Ollitrault, P. 1995. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus. HortScience 30: 1063-1067.

Machado, M.A., Coletta Filho, H.D., Targon, M.L.P.N. and Pompeu Jr, J. 1996. Genetic relationship of mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. Euphytica 92: 321-326.

Moriguchi, T. and Omura, M. 1995. Identification of Citrus chimeras by RAPD markers. HortScience 30: 1276-1284.

Nei, M. and Li, W.H. 1979. Mathmetical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 5269-5273.

Roose, M.L., Soost, R.K. and Cameron, J.W. 1995. Citrus. *In* Evolution of Crop Plants. (eds. Smart, J. and Simmonds, N.W.). pp 443-448. Harlow: Longman.

Soost, R.K. 1964. Self-incompatibility in *Citrus grandis*. Pro. Amer. Soc. Hort. Sci. 84: 137-140.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livar, K.J., Rafalaki, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.