บทนำ

ส้มโอเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่มีชื่อเสียงของจังหวัดนครปฐม เนื่องจากมีรสชาติที่หวานอร่อย จึงทำให้เป็นที่รู้จักของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ โดยปลูกกันมากในพื้นที่อำเภอนครชัยศรี สามพราน และพุทธมณฑล ส้มโอจากจังหวัดนครปฐมจึงได้รับการขนานนามว่า ส้มโอนครชัยศรี สายพันธุ์ส้มโอที่ปลูกบริเวณอำเภอนครชัยศรีมีอยู่ 5 สายพันธุ์ คือ ทองดี ขาวน้ำผึ้ง ขาวพวง ขาวแป้น และขาวหอม (สำนักงานการท่องเที่ยวและกีฬาจังหวัดนครปฐม, 2557) โดยสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมและมีพื้นที่ปลูกมากคือ ทองดี และสายน้ำผึ้ง

จากเหตุการณ์อุทกภัยในปี พ.ศ. 2554 ส่งผลให้พื้นที่ปลูกส้มโอในจังหวัดนครปฐมยืนต้นตาย โดยเฉพาะในเขตอำเภอนครชัยศรี อำเภอพุทธมณฑล และอำเภอสามพรานบางส่วน พื้นที่ปลูกเสียหายหลายพันไร่ จากพื้นที่ปลูก 4,000 ไร่ ลดลงเหลือเพียง 1,000 ไร่ เกษตรกรได้รับความเสียหายประมาณ 200 ล้านบาท ทำให้ผลผลิตส้มโอของจังหวัดนครปฐมลดน้อยลงจนไม่พอจำหน่ายในประเทศ (สำนักข่าวกรมประชาสัมพันธ์, 2557) เมื่อผ่านพ้นวิกฤตการณ์น้ำท่วม เกษตรกรชาวสวนส้มโอเร่งฟื้นฟูพื้นที่ ซึ่งได้รับความเสียหายจากน้ำท่วม แต่ปัญหาสำคัญของการซ่อมแซมสวนส้มโอ คือ เรื่องของกิ่งพันธุ์ส้มโอ เนื่องจากเกษตรกรไม่สามารถหาสายพันธุ์ส้มโอที่ดีมีคุณภาพได้ดังเดิม (สำนักข่าวประชาสัมพันธ์นครปฐม, 2554) หน่วยงานราชการได้เข้ามาช่วยเหลือ โดยจัดทำโครงการพา “ทองดี” กลับบ้าน โดยโครงการนี้ ได้ไปนำกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดี มาจากจังหวัดนครศรีธรรมราช เนื่องจากได้มีการนำส้มโอพันธุ์ทองดีไปปลูกไว้ที่ลุ่มน้ำปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อ 30 ปีที่แล้ว (คมชัดลึก, 2555) แต่ยังมีกิ่งพันธุ์ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร เกษตรกรหลายรายจึงแก้ไขปัญหาโดยการสั่งกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้งมาจากแหล่งอื่น เช่น สมุทรสงคราม นครนายก ปราจีนบุรี เพื่อนำมาใช้ปลูกทดแทน จากการจัดกิจกรรมในการแลกเปลี่ยนความคิดเห็น ในโครงการบูรณาการนวัตกรรมการวิจัย ปี 2558 เกษตรกรหลายรายพบว่าเมื่อปลูกส้มโอไปซักระยะหนึ่ง (ประมาณ 3 ปี) ลักษณะการเจริญเติบโต เช่น การแตกทรงพุ่ม ไม่เหมือนกับลักษณะการเจริญเติบโตของส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่เป็นพันธุ์ดังเดิมของจังหวัดนครปฐม จึงทำให้เกษตรกรบางรายตัดสินใจโค่นต้นส้มโอนั้นทิ้ง (สถาบันวิจัยและพัฒนา, 2558)

สาเหตุที่สำคัญที่ทำให้คุณภาพและรสชาติของส้มโอพันธุ์เดียวกัน แต่ปลูกคนละพื้นที่มีคุณภาพของผลที่แตกต่างกัน อาจมีสาเหตุมาจาก 1) ความจำเพาะของพื้นที่ปลูก เช่น ธาตุอาหารในดิน สภาพแวดล้อม และการปฏิบัติดูแลรักษาของเจ้าของสวน ส่งผลให้รสชาติหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละพื้นที่ (Nartvaranant and Nartvaranant , 2011) และ 2) ชื่อพันธุ์เดียวกัน แต่ความจริงแล้วสายพันธุ์อาจแตกต่างกัน เนื่องจากส้มโอเป็น Self incompatibility (Soost, 1964) ต้องมีการผสมข้ามกับพันธุ์อื่นจึงจะติดเมล็ด โดยในการผสมข้ามพันธุ์จะทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างประชากร ในอดีตเกษตรกรทำการขยายพันธุ์ส้มโอพันธุ์ดีโดยวิธีการเพาะเมล็ด โดยมีรายงานว่าในปี ค.ศ. 1919 มีการนำเมล็ดของส้มโอพันธุ์ขาวพวงจากประเทศไทยไปปลูกที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (Morton, 1987) สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ส้มโอ พบว่าหลังจากปลูกส้มโอโดยการเพาะเมล็ดแล้วเกษตรกรจะทำการคัดเลือกส้มโอที่แสดงความดีเด่นเหนือต้นอื่น และตั้งชื่อพันธุ์เป็นของตนเอง ดังตัวอย่างของส้มโอพันธุ์ท่าข่อย

มีหลากหลายสายต้น เช่น ท่าข่อย 7 เขย ท่าข่อยสระทองขำ ท่าข่อยพรหมพิราม ท่าข่อยวัดขนุน (ณรงค์, 2558) ดังนั้นส้มโอแต่ละพันธุ์จึงมีความแปรปรวนพันธุ์มาก เมื่อนำไปปลูกในแต่ละพื้นที่ก็อาจจะใช้ชื่อพันธุ์เดิมหรือตั้งชื่อเรียกใหม่ที่แตกต่างกันออกไป (เสาวณี และอุณารุจ, 2551) ต่อมาการขยายพันธุ์ส้มโอนิยมใช้การขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ เช่น การตอนกิ่ง ติดตา หรือเปลี่ยนยอดพันธุ์ดี ซึ่งการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเหล่านี้จะให้ต้นใหม่ที่มีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ ถึงแม้ว่าการขยายพันธุ์ส้มโอในปัจจุบันจะใช้การขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ แต่ก็ยังคงพบความแปรปรวนของสายพันธุ์ เช่น ในส้มโอพันธุ์ทองดี โดย เสาวณี และอุณารุจ (2551) ทำการตรวจสอบความหลายหลากของส้มโอพันธุ์การค้าและพันธุ์พื้นเมืองในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR เมื่อพิจารณาเฉพาะส้มโอพันธุ์ทองดี พบว่ากิ่งส้มโอพันธุ์ทองดีที่ขายในงานเกษตร กำแพงแสน กับกิ่งพันธุ์ที่ปลูกอยู่ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตรมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ค่าดัชนีความเหมือน = 0.51) ในขณะที่ส้มโอพันธุ์ทองดีที่ปลูกอยู่ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตรกับกิ่งพันธุ์ที่นำมาจากจังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นพันธุ์เดียวกัน (ค่าดัชนีความเหมือน = 1.00) ดังนั้นความแตกต่างทางพันธุกรรมของกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดี น่าจะเป็นผลมาจากต้นแม่พันธุ์ที่มาจากสายต้นที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน สาเหตุอีกหนึ่งประการที่ส่งผลให้ต้นพันธุ์ที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีพันธุกรรมแตกต่างกัน คือ การกลายพันธุ์ของเซลต้นพืช (somatic mutant) เช่น การผิดปกติของตาที่แตกใหม่ (bud sport) และเมื่อมีการขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งจากส่วนดังกล่าวก็จะได้ต้นใหม่ที่แตกต่างจากต้นแม่เดิม (Deng *et al.*, 1995) ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Nartvaranant and Nartvaranant (2011) ที่รายงานว่าส้มโอพันธุ์ทองดีที่ปลูกบริเวณอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม กับจังหวัดพิจิตร มีพันธุกรรมที่เหมือนกัน น่าจะเป็นพันธุ์เดียวกัน แต่การที่คุณภาพผลแตกต่างกันนั้น น่าจะเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อม การที่ข้อมูลของทั้งสองการทดลองแตกต่างกันนั้น นอกจากเรื่องของเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ประเมินแตกต่างกันแล้ว ตัวอย่างใบส้มโอที่เก็บมาวิเคราะห์ ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญว่าตัวอย่างพันธุ์ส้มโอของทั้งสองการทดลองมีความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าข้อมูลความหลากหลายของพันธุ์และข้อมูลเอกลักษณ์ของพันธุ์ส้มโอยังคงมีความไม่แน่ชัด ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจสอบเอกลักษณ์ของส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ซึ่งเป็นพันธุ์ดั้งเดิมของจังหวัดนครปฐม และทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรมกับกิ่งพันธุ์ที่เกษตรกรนำมาจากแหล่งอื่น ๆ โดยทำการเก็บข้อมูลลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาที่เป็นลักษณะประจำพันธุ์ของส้มโอทั้ง 2 พันธุ์ และตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยเมื่อสิ้นสุดงานวิจัย จะส่งผลให้เกษตรกรเกิดความมั่นใจในสายพันธุ์ส้มโอว่าเป็นส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งและทองดีพันธุ์แท้ดั้งเดิมในท้องที่จังหวัดนครปฐม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่เป็นพันธุ์ดั้งเดิมของจังหวัดนครปฐม

2. เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่เป็นพันธุ์ดั้งเดิมกับกิ่งพันธุ์ของส้มโอที่นำมาจากแหล่งอื่น

ขอบเขตการวิจัย

ภายหลังจากเหตุการณ์น้ำท่วม ในปี 2554 เกษตรกรสวนส้มโอในอำเภอนครชัยศรี และอำเภอสามพรานที่ได้รับเสียหายจากน้ำท่วมเร่งฟื้นฟูสวนส้มโอ โดยนำกิ่งพันธุ์มาจากที่ต่าง ๆ เช่น ปราจีนบุรี สมุทรสงคราม ชัยนาท และกิ่งพันธุ์ที่ได้รับแจกมาจากหน่วยงานต่าง ๆ แต่จากการสังเกตของเกษตรกรชาวสวนส้มโอ ในแถบอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม พบว่ากิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่นำมาจากแหล่งอื่น ๆ เพื่อนำมาใช้ปลูกทดแทนในสวนภายหลังจากเหตุการณ์น้ำท่วม ในปี 2554 มีลักษณะสัณฐานวิทยา และนิสัยการเจริญเติบโต ไม่เหมือนกับพันธุ์ทองดีและ ขาวน้ำผึ้งเดิมที่เกษตรกรเคยปลูก จึงทำให้เกษตรกรเกิดความไม่มั่นใจในสายพันธุ์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทดลองในครั้งนี้ คือ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของต้นส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้งด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยส้มโอที่ทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย 1) กลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมที่ปลูกอยู่ในในสวนของเกษตรที่ไม่โดนอุทกภัยในปี 2554 และ 2) สวนเกษตรกรที่ปลูกซ่อมแซมใหม่ โดยนำกิ่งพันธุ์ส้มโอมาจากแหล่งอื่น เพื่อจะได้ทราบว่ากิ่งพันธุ์ที่เกษตรกรนำมาปลูกนั้น มีความเหมือนหรือแตกต่างจากพันธุ์ดั้งเดิมหรือไม่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลเอกลักษณ์พันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ซึ่งเป็นพันธุ์ดั้งเดิมในจังหวัดนครปฐม อีกทั้งยังสามารถตอบคำถามให้เกษตรกรได้ว่า กิ่งพันธุ์ที่นำมาจากแหล่งอื่น ๆ มีความเหมือนหรือแตกต่างจากพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งเกษตรกรสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการตัดสินใจเกี่ยวกับการจัดการกิ่งพันธุ์ส้มโอภายในสวนของเกษตรกรเอง

การทบทวนวรรณกรรม

ส้มโอเป็นไม้ผลเศรษฐกิจของประเทศไทย เป็นไม้ผลที่ปลูกได้ดีในเขตร้อนหรือเขตกึ่งร้อน ส้มโอมีชื่อสามัญว่า Pummelo shaddock ซึ่งเป็นชื่อที่แผลงมาจากชื่อส้มโอในภาษาดัชน์ว่า “pummelose” มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus maxima* (Burm.) Merrill หรือ *C. grandis* (L.) Osbeck เป็นพืชในวงศ์ Rutaceae ส้มโอมีถิ่นกำเนิดในบริเวณคาบสมุทรมลายู รวมทั้งประเทศไทยและหมู่เกาะอินเดียตะวันออก จากนั้นจึงแพร่กระจายไปสู่อินเดียและจีนตอนใต้ (รวี, 2545) Singh (1980) รายงานว่าส้มโอมีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและมาเลเซีย แล้วจึงแพร่ไปยังอินเดีย จีน และเปอร์เซีย ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีพันธุ์ส้มโอที่ดีที่สุด (Jorgensen, 1984) เนื่องจากมีพันธุ์ส้มโอมากที่สุดในโลก และพบความผันแปรในส้มโอพันธุ์ต่าง ๆ มากมาย

ลักษณะพฤกษศาสตร์ของส้มโอ

ส้มโอเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง มีทรงต้นสูงประมาณ 6 – 10 เมตร ทรงต้นโปร่ง กิ่งขณะที่ยังอ่อนจะมีขนสั้นๆ ปกคุลมอยู่

ใบ เป็นรูปไข่หรือรูปโล่ ขอบใบเรียบหรือหยักเล็กน้อย ส่วนของฐานใบแหลมป้านหรือกลม ปลายใบมักมีรอยเว้าเล็กน้อย สีขอบใบด้านบนเขียวเข้มเป็นมัน ด้านล่างเป็นสีเขียวอ่อนมีขนอ่อนปกคลุม

ดอก ดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ มีจำนวน 2-10 ดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศขนาดค่อนข้างใหญ่ 2-7 เซนติเมตร ดอกประกอบด้วยชั้นของกลีบเลี้ยงจำนวน 3-5 กลีบติดกัน ชั้นกลีบดอกมีจำนวน 4-5 กลีบ มีเกสรตัวผู้จำนวน 20-25 อันเชื่อมติดกันเป็นกลุ่ม 4-5 กลุ่ม เกสรตัวเมียมีรังไข่ประมาณ 11-16 ช่อง

ผล ทรงผลมีหลายแบบ เช่น กลมมล กลมแป้น กลมสูงมีจุก ผลมีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-13 เซนติเมตร สีผลเมื่ออ่อนจะมีสีเขียวและจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลืองหรือสีเหลืองทองเมื่อแก่ มีต่อมน้ำมันตามผิว เปลือกหนาประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร สีเปลือกด้านในอ่อนนุ่มสีขาวหรือสีชมพู เนื้อของแต่ละกลีบจะแยกออกจากกันได้ง่าย รสหวานหรือหวานอมเปรี้ยว (ทิวาพร, 2554; ปัญญา, 2541; พงษ์นาถ และเกรียงศักดิ์, 2556)

ส้มโอนครชัยศรี

ส้มโอนครชัยศรี คือ ชื่อเรียกของส้มโอที่ปลูกในอำเภอนครชัยศรี อำเภอสามพราน และอำเภอพุทธมณฑล ของจังหวัดนครปฐม ส้มโอนครชัยศรีมีรสหวานอร่อย เป็นที่ต้องการของตลาดทั่วไป นับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกร อีกทั้งเป็นผลไม้ที่กรมทรัพย์สินทางปัญญาออกสิทธิบัตร "ผลไม้บ่งชี้ทางภูมิศาสตร์" มีอยู่ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ทองดี พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พันธุ์ขาวพวง พันธุ์ขาวแป้น พันธุ์ขาวหอม (สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2557)

ลักษณะประจำพันธุ์ของส้มโอขาวน้ำผึ้งและทองดี

พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

เป็นพันธุ์ที่มีผลขนาดใหญ่ ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15-18 เซนติเมตร ทรงผลไม่กลม ไหล่ผลไม่เท่ากันทั้งสองข้าง ไม่มีจุก ก้นผลเรียบถึงเว้าเล็กน้อย ผิวมีสีเขียวเข้ม ต่อมน้ำมันมีขนาดใหญ่นูนขึ้น เปลือกค่อนข้างหนา เนื้อเปลือกสีขาว ผนังกลีบแยกออกจากกันได้ง่าย เนื้อผลมีสีเหลืองอ่อน กุ้งมีขนาดใหญ่เบียดกันแน่น เนื้อมีลักษณะแห้งกรอบ รสชาติดี มีรสหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตตลอดทั้งปี (เยาวรัตน์, 2545; สมพร, 2534)

พันธุ์ทองดี

เป็นพันธุ์ที่มีขนาดผลโตปานกลาง ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 14-16 เซนติเมตร ทรงผลกลมแป้นไม่มีจุก ไหล่ผลลาดลง มีจีบเล็กน้อย ก้นผลเรียบหรือเว้าเล็กน้อย ผิวมีสีเขียวเข้ม ต่อมน้ำมันมีขนาดเล็ก เปลือกผลค่อนข้างบาง สีของเปลือกในและผนังกลีบ และเนื้อผลมีสีชมพูอ่อนเรื่อ ๆ มีความหวานสูง เนื้อผลนิ่มและฉ่ำน้ำ (ปัญญา, 2541; เปรมปรี, 2532)

ความแปรปรวนของคุณภาพผลส้มโอ

ส้มโอที่มีชื่อพันธุ์เดียวกันแต่ปลูกคนละพื้นที่จะมีคุณภาพและรสชาติที่แตกต่างกัน อาจมีสาเหตุมาจาก 1) ความจำเพาะของพื้นที่ปลูก เช่น ธาตุอาหารในดิน และสภาพแวดล้อม และการปฏิบัติดูแลรักษาของเจ้าของสวน ส่งผลให้รสชาติหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละพื้นที่ (Nartvaranant and Nartvaranant , 2011) และ 2) ชื่อพันธุ์เดียวกันแต่สายพันธุ์แตกต่างกัน เนื่องจากส้มโอเป็น Self-incompatibility (Soost, 1964) ต้องมีการผสมข้ามพันธุ์อื่นจึงจะติดเมล็ด ในอดีตเกษตรกรทำการขยายพันธุ์ต้นส้มโอพันธุ์ดีด้วยวิธีการเพาะเมล็ด ดังนั้นส้มโอแต่ละพันธุ์จึงมีความแปรปรวนพันธุ์มาก เมื่อนำไปปลูกในแต่ละพื้นที่ก็อาจจะใช้ชื่อพันธุ์เดิมหรือตั้งชื่อเรียกใหม่ที่แตกต่างกันออกไป (เสาวณี และอุณารุจ, 2551) สาเหตุอีกหนึ่งประการที่ส่งผลให้ต้นพันธุ์ที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีพันธุกรรมแตกต่างกัน คือ การกลายพันธุ์ของเซลต้นพืช (somatic mutant) เช่น การผิดปกติของตาที่แตกใหม่ (bud sport) และเมื่อมีการขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งจากส่วนดังกล่าวก็จะได้ต้นใหม่ที่แตกต่างจากต้นแม่เดิม (Deng *et al.*, 1995)

การประเมินเอกลักษณ์พันธุ์ของส้มโอแต่ละพันธุ์ โดยใช้เฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นเพียงอย่างเดียวเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก เนื่องจากต้นส้มโอแต่ละพันธุ์มีความคล้ายคลึงกัน การจำแนกด้วยการใช้สีเนื้อผลเป็นเกณฑ์ เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพเฉพาะในกรณีที่กลุ่มพันธุ์นั้นมีสีเนื้อแตกต่างกัน เช่น ทองดี กับสายน้ำผึ้ง แต่ถ้าเป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีสีเนื้อเหมือนกันแล้ว การจำแนกพันธุ์จะทำได้อยากมาก เช่น ขาวน้ำผึ้ง ขาวใหญ่ ขางแตงกวา เป็นต้น อีกทั้งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องการจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ของส้มโอยังคงมีอยู่จำกัด ส่วนใหญ่เป็นการจำแนกโดยใช้ลักษณะของผลเป็นหลัก (จาตุรนต์, 2516; ภาณุศักดิ์, 2516) ดังนั้นการใช้เทคนิคด้านโมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยจะทำให้สามารถจำแนกพันธุ์ส้มโอได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับการตรวจสอบพันธุ์พืช

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือ DNA fingerprint เป็นการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยการใช้ดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็นแบบแผนแสดงความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งมีการนำมาใช้ครั้งแรกโดย Jeffreyes *et al*. (1985) โดยใช้โพรบ (probe) ที่มาจากส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นมินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (minisatellite DNA) เป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีชุดเบส 4 ชุดซ้ำกัน แต่ละชุดมีความยาว 33 คู่เบส แยกมาจากส่วนของอินทรอน (intron) ของยีนไมโอโกลบิน (myoglobin gene) จากมนุษย์ โดยโพรบ (probe) ที่ใช้นี้สามารถไฮบริไดซ์ (hybridize) กับส่วนของดีเอ็นเอหลายตำแหน่ง (multilocus probe) บนโครโมโซมทำให้เกิดแถบของดีเอ็นเอจำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละบุคคล โดยโอกาสที่แต่ละบุคคลจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันมีเพียง 1 ใน 9,340 ล้าน ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าจำนวนประชากรที่มีในโลก จึงอาจกล่าวได้ว่าไม่มีโอกาสที่บุคคลคู่ใดจะมีแบบของแถบดีเอ็นเอหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกันยกเว้นฝาแผดเหมือนเท่านั้น (สุรินทร์, 2540)

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถทำได้หลายวิธี เช่น เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism) เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD; Random Amplified Polymorphism) เทคนิคเอแอฟแอลพี (AFLP; Amplified fragment length polymorphism) และ เทคนิค sequence-tagged microsatellite site (STMS) หรือ simple sequence repeat (SSR)

เทคนิค AFLP (Vos *et al.,* 1995) ถือว่าเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง สามารถทำซ้ำได้ให้ผลที่เหมือนเดิม อีกทั้งยังให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูง (high polymorphism) นอกจากนี้ยังไม่ต้องการข้อมูลทางพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจง เช่น ลำเบสของดีเอ็นเอ เพื่อสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง ทำให้ง่ายต่อการนำมาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม เทคนิคเอแอฟแอลพี (AFLP; Amplified fragment length polymorphism) เป็นเทคนิคที่นำดีเอ็นเอไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด จากนั้นนำส่วนดีเอ็นเอมาต่อด้วย adapter แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และลำดับจดจำของเอ็นไซม์ที่เป็นคู่สมกัน แยกดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ด้วยวิธีอิเลคโทรโฟรีซีสบนเจลอะคริลาไมด์เจล

Compos *et al.* (2005) ทำการศึกษาความหลากหลายของส้มแมนดารินจำนวน 63 สายพันธุ์ ในประเทศเม็กซิโก โดยศึกษาข้อมูลทั้งทางด้านสัณฐานวิยาและข้อมูลพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย AFLP พบว่าข้อมูลทาง 2 ด้าน คือ ด้านสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรม สามารถบอกถึงความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ของส้มแมนดารินได้ดี ซึ่งข้อมูลทั้งหมดนั้น เป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์

Liang *et al.* (2007) ทำการศึกษาอนุกรมวิธานของพืชสกุล *Citrus* จำนวน 87 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมาย AFLP จากการทดลองพบว่า *C. medica C. grandis* และ *C. reticulate* ถูกจัดให้

อยู่ใน Subgenus *Citrus* ในขณะที่ *Citrus ichangensis* ถูกจัดอยู่ใน Subgenus *Papeda* อีกทั้งยังพบว่า *C. aurantifolia C. hystrix C. sinensis* และ *C. junos* น่าจะเป็นลูกผสมที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน

สำหรับการประเมินความหลากหลายของส้มโอในประเทศไทยยังมีข้อมูลอยู่ค่อนข้างจำกัด ธีระชัย และนฤมล (2544) ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างส้มโอพันธุ์สายน้ำผึ้งและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งด้วยเครื่องหมาย RAPD เนื่องจากส้มโอทั้ง 2 สายพันธุ์ มีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่คล้ายคลึงกัน แต่พันธุ์สายน้ำผึ้งมีขนาดของผลที่เล็กกว่า ผลการทดลองพบว่าทั้ง 2 พันธุ์มีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Similarity index = 0.79) ในการทดลองของ เสาวณี และอุณารุจ (2549) ทำการประเมินความซ้ำซ้อนของชื่อพันธุ์ส้มโอด้วยเครื่องหมาย SSR เนื่องจากส้มโอหลายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน แต่มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันในแต่ละท้องที่ เช่น พันธุ์ ‘ขาวน้ำผึ้ง’ กับ ‘ขาวแตงกวา’ พันธุ์ ‘ขาวหอม‘ กับ ‘ขาวแตงกวา’ พันธุ์ ‘ขาวแป้น’ กับ ‘บางขุนนนท์’ พันธุ์ ‘ขาวน้ำผึ้ง’ กับ ‘ท่าข่อย’ จากผลการทดลองพบว่าพันธุ์ส้มโอดังกล่าวมีความแตกต่างทางพันธุกรรม และเป็นส้มโอคนละสายพันธุ์กัน Nartvaranant and Nartvaranant (2011) ทำการศึกษาความแปรปรวนของส้มโอในเขตภาคกลางของประเทศไทย ด้วยเครื่องหมาย AFLP พบว่าส้มโอมีฐานพันธุกรรมแคบ เนื่องจากตัวอย่างใบส้มโอพันธุ์ต่าง ๆ ที่เก็บมาวิเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์เดียวกันแต่มีชื่อต่างกัน เมื่อปลูกคนละท้องที่ เช่น พันธุ์ขาวใหญ่ พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พันธุ์ไผ่สีทอง พันธุ์ขาวแตงกวา เป็นพันธุ์เดียวกัน แต่ใช้ชื่อต่างกันออกไป การที่ข้อมูลของทั้งสองการทดลองแตกต่างกันนั้น อาจเป็นผลมาจากเทคนิคโมเลกุลที่ใช้ประเมินแตกต่างกัน และตัวอย่างส้มโอที่เก็บมาแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะใช้ชื่อพันธุ์เดียวกันก็ตาม

เทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอแอฟแอลพี

1. เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสซ้ำกันหลาย ๆ รอบ เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ โดยในการเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำเป็นต้องมีจุดเริ่มต้นที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้นๆ (primer) เข้าไปจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นเอนไซม์โพลีเมอเรสจึงจะเข้าไปเกาะและเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอสายสั้นๆ (primer) ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์ คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ (primer) มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

1. Denaturation การแยกดีเอ็นเอ 2 สายออกจากกัน ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing เป็นขั้นที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอที่ได้แยกเป็นสายเดียวทั้ง 2 เส้น โดยที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับคู่กันระหว่างดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว

กับไพรเมอร์ อุณหภูมิที่ใช้เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยวได้ 50 % เรียกว่า melting temperature หรือ Tm โดย Tm คำนวณได้จากสูตร

$$Tm = [4 \times (G+C)] + [2 \times (A+T)]$$

โดย G, C, A และ T คือ จำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์นั้น โดยค่าที่คำนวณได้มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส อุณหภูมิสำหรับ annealing จะใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่า Tm ประมาณ 5 องศาเซลเซียส (ภาควิชาพันธุศาสตร์, 2542)

3. Extension (DNA synthesis) เป็นการช่วยต่อเติมนิวคลีโอไทด์ไปในทิศ 5' ไป 3' ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 70-72 องศาเซลเซียส (วิชัย และคณะ, 2545; ศิริลักษณ์, 2545)

2. การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis of DNA)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุและมีขนาดต่างกันออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลายสารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ (ภาควิชาพันธุศาสตร์, 2542; สุรินทร์, 2545) สารตัวกลางที่ใช้ในการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่นิยมใช้กัน คือ อะกาโรสเจล (agarose gel) และโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับว่าขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ โดยอะกาโรสจะใช้ในการแยกขนาดดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 100 - 50,000 คู่เบส ส่วนโพลีอะคริลาไมด์เจลใช้ในการแยกขนาดดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 6 - 1,000 คู่เบส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ โดยถ้าใช้เจลที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นก็จะสามารถแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอขนาดเล็กได้มากขึ้น

การประเมินค่าดัชนีความเหมือน (Similarity index, SI) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจากการประเมินค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละชนิดและระดับชุดโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา (Kosman and Leonard, 2005) การประเมินค่าดัชนีความเหมือนจากการแปลงข้อมูลแบบไบนารี่ โดยตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 1 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่า 0 หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอในรูปของค่าดัชนีความเหมือน โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แต่ละชนิดที่มีวิธีการคำนวณที่แตกต่างกันดังนี้

1. Simple matching coefficient ประเมินโดยการนับแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในตำแหน่งที่เป็นโฮโมโลกัส ซึ่งสามารถใช้กับดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด dominant (RAPD และ AFLP) เพราะลักษณะการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเครื่องหมายนั้นๆ เป็นลักษณะจีโนไทป์แบบ homologous recessive

$$\text{Simple matching coefficient (SM)} = \frac{(a+d)}{a+b+c+d}$$

2. Jaccard coefficient ประเมินโดยการนับเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ส่วนที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่นับ ให้เป็นข้อมูลสูญหาย เพราะถ้าข้อมูลของแถบดีเอ็นเอเกิด false-positive หรือ false-negative จะทำให้การประเมินค่าดัชนีความเหมือนคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant (allozyme, RFLP และ microsatellite)

$$\text{Jaccard coefficient (J)} = \frac{a}{a+b+c}$$

3. Nei-Li หรือ Dice coefficient ประเมินโดยการนับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยให้น้ำหนักของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมากกว่าแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏ สามารถใช้กับข้อมูลดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant (RFLP และ microsatellite) (Anonymous, 2003)

$$\text{Nei-Li หรือ Dice coefficient} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

เมื่อ a คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งพันธุ์ i และพันธุ์ j
b คือ จำนวนเครื่องหมาย SSR ที่ปรากฏเฉพาะพันธุ์ i
c คือ จำนวนเครื่องหมาย SSR ที่ปรากฏเฉพาะพันธุ์ j
d คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏทั้งพันธุ์ i และพันธุ์ j

การวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือนโดยใช้ค่าสัมประสิทธ์ Dice สามารถใช้ได้ทั้งมูลที่ทำการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด dominant (RAPD, AFLP และ ISSR) และเครื่องหมายชนิด codominant (allozyme, RFLP และ microsatellite) ในสิ่งชีวิตชนิดแฮพลอยด์ ดิพลอยด์ หรือโพลีพลอยด์ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ Jaccard สามารถใช้ได้กับข้อมูลของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSR ในสิ่งมีชีวิตชนิดโพลีพลอยด์ และค่าสัมประสิทธิ์ simple matching ใช้กับข้อมูลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดแฮพลอยด์ เมื่อข้อมูลที่นำมาใช้ในการประเมินผลมีความสมบูรณ์ แม้ว่าจะใช้ค่าสัมประสิทธ์ต่างชนิดกัน ก็จะได้รูปแบบแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตออกมาเหมือนกัน (Kosman and Leonard, 2005)

การวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Clustering Method)

การวิเคราะห์การจัดกลุ่มข้อมูลและตัวอย่าง (cluster analysis) เป็นวิธีทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการจำแนกหรือแบ่งข้อมูลที่ศึกษาออกเป็นกลุ่มย่อยตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป โดยวิธีการวิเคราะห์การจัดกลุ่มนิยมใช้วิธี UPGMA (unweighed pair-group method with arithematic average)

เนื่องจากนักวิจัยมั่นใจว่าวิธี UPGMA ตั้งอยู่บนพื้นฐานของ middle-of –the-road philosophy ระหว่างชุดของข้อมูลทั้ง 2 ชุด อีกเหตุผลหนึ่งก็คือวิธี UPGMA มักจะให้ค่า cophenetic correlation coefficient ที่สูง (Farris, 1969) แสดงให้เห็นว่าถ้าใช้วิธี UPGMA แล้วเมื่อทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้จะมีโอกาสผิดพลาดที่น้อย จึงมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งนอกจากวิธี UPGMA แล้ว ยังมีวิธีอื่นๆ อีก เช่น SLINK method (single linkage clustering method), CLINK method (complete linkage clustering method)และ Ward's minimum variance clustering method (Romesburg, 1938) โดยกลุ่มที่แบ่งออกจะแสดงให้เห็นว่าข้อมูลหรือตัวอย่างที่อยู่กลุ่มเดียวกันจะมีลักษณะที่คล้ายกันหรือมีความสัมพันธ์กันมาก ส่วนข้อมูลหรือตัวอย่างที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีลักษณะที่ต่างกันหรือมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย ดังนั้นการที่เราจะพิจารณาเลือกลักษณะหรือตัวแปรที่จะมาใช้ในการแบ่งกลุ่มจึงมีความสำคัญมากงานวิจัยที่จำเป็นต้องมีการจัดกลุ่มข้อมูลหรือตัวอย่างที่ศึกษาจะนิยมใช้ตัวแปรที่เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเป็นส่วนใหญ่ เช่น การใช้เทคนิค RAPD, SSR, AFLP เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็น binary data จากการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอ (DNA banding) หรือข้อมูลที่เป็นลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequence) นอกจากนี้ตัวแปรชนิดอื่นก็สามารถนำมาใช้ในการจำแนกหรือแบ่งกลุ่มข้อมูลหรือตัวอย่างได้เช่นกัน เช่น ข้อมูลความถี่ของยีน ข้อมูลของลักษณะที่แสดงออก(phenotype) เป็นต้น

วิธีการจัดกลุ่มข้อมูลหรือตัวอย่าง (phylogenetic analysis)

1. Distance matrix method เป็นวิธีการคำนวณหาค่าความเหมือน (similarity) หรือค่าความต่าง (distance) ของตัวอย่างแต่ละคู่ที่ทำการศึกษา จากนั้นนำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม โดยเริ่มจากคู่ที่มีค่า similarity สูงที่สุด หรือมีค่า distance ต่ำที่สุด ผลลัพธ์จะได้แผนภูมิต้นไม้ (dendrogram หรือ tree) ออกมา

2. Maximum parsimony เป็นการเปรียบเทียบและค้นหา tree ที่สั้นที่สุดนั่นคือ จำนวน mutation เกิดขึ้นน้อยที่สุดในบรรดากลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา ซึ่งแตกต่างจากวิธีที่ 1 คือ จะทำการพิจารณาจากข้อมูลทุกค่าร่วมกันเพื่อค้นหา evolution tree ที่สั้นที่สุด

3. Maximum likelihood วิธีนี้จะคล้ายกับ Maximum parsimony คือใช้ข้อมูลทั้งหมดแตกต่างกันที่จะมีการวิเคราะห์ทางสถิติเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย (จินตนา, 2549)

Phylogenetic tree หรือ Phylogram มีแนวทางการศึกษา 2 แนวทาง คือ

1. Cladistic เป็นการศึกษาที่เน้นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มีการอ้างถึงบรรพบุรุษร่วม (ancestor) ซึ่งการแสดงความสัมพันธ์ เรียกว่า cladogram ที่เป็น tree ที่สั้นที่สุด คือภาพแสดงความสัมพันธ์ที่มีวิวัฒนาการหรือการกลายพันธุ์ของลักษณะนั้นน้อยที่สุด วิธีการจัดกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบนี้ คือ maximum parsimony และ maximum likelihood

2. Similarity/Distance เป็นการประเมินความ สัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยค่าความสัมพันธ์ correlation และความน่าจะเป็นในการจัดกลุ่ม (probability) โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ distance function ที่จะคำนวณความเหมือน (similarity) หรือ ความต่าง (distance) แล้วนำ

ค่าที่ได้นั้นมาจัดกลุ่ม โดยตัวอย่างที่คล้ายกันมากที่สุดจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนตัวอย่างที่คล้ายน้อยหรือมีความต่างกันมากจะถูกจัดแยกกลุ่มออกไป โดยไม่สามารถอ้างอิงถึงบรรพบุรุษได้เลย โดยในลักษณะที่ใช้ในการจัดกลุ่มสามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลผลิตต่อพื้นที่ ข้อมูลของลักษณะการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยค่า cophenetic correlation coefficient (r) เป็นค่าที่บ่งถึงว่าการจัดกลุ่มที่ได้ดีเพียงใดซึ่งดูได้จากค่า goodness of fit โดยคำนวณหาค่า cophenetic correlation coefficient (r) โดย r มีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดีมาก เมื่อ r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8 – 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดี เมื่อ r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.7 – 0.8 ถือว่าจัดกลุ่มได้ปานกลาง และเมื่อ r มีค่าน้อยกว่า 0.7 ถือว่าจัดกลุ่มได้ไม่ดี (ปัณฑารีย์, 2549)

เนื้อหาการวิจัย

พันธุ์ส้มโอที่ทำการศึกษา

1. กลุ่มสวนที่ใช้กิ่งพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐม คือ สวนของเกษตรกรที่ไม่โดนอุทกภัยในปี 2554 จำนวน 4 สวน ทำการทดลองจำนวนสวนละ 3 ต้นต่อสายพันธุ์ ประกอบด้วย

1) สวนคุณรุ่ง ยูรสวัสดิ์ เกษตรกรในเขตอำเภอสามพราน (กลุ่มต้นเล็ก แทนด้วยสัญลักษณ์ OS1, กลุ่มต้นใหญ่ แทนด้วยสัญลักษณ์ OB1)

2) สวนคุณวันดี ใบนาค เกษตรกรในเขตอำเภอสามพราน (กลุ่มต้นเล็ก แทนด้วยสัญลักษณ์ OS2, กลุ่มต้นใหญ่ แทนด้วยสัญลักษณ์ OB2)

3) สวนคุณสมชาย คูปิ่นแก้ว เกษตรกรในเขตอำเภอสามพราน (กลุ่มต้นเล็ก แทนด้วยสัญลักษณ์ OS3, กลุ่มต้นใหญ่ แทนด้วยสัญลักษณ์ OB3)

4) สวนคุณสมพงษ์ โถค้า เกษตรกรในเขตอำเภอสามพราน (กลุ่มต้นเล็ก แทนด้วยสัญลักษณ์ OS4, และกลุ่มต้นใหญ่ แทนด้วยสัญลักษณ์ OB4)

การเก็บข้อมูลในสวนส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พันธุ์ดังเดิมที่ปลูกในพื้นที่จะแบ่งกลุ่มของต้นส้มโอออกเป็น 2 ช่วงอายุ คือ กลุ่มต้นเล็ก คือ เลือกต้นส้มโอที่มีความสมบูรณ์และขนาดต้นใกล้เคียงกันภายในพันธุ์ อายุต้นประมาณ 3-5 ปี และกลุ่มต้นใหญ่ คือ เลือกต้นส้มโอที่มีความสมบูรณ์และขนาดต้นใกล้เคียงกันภายในพันธุ์ อายุต้นประมาณ 8-10 ปี

2. สวนส้มโอที่เกษตรกรปลูกซ่อมแซมใหม่ โดยนำกิ่งพันธุ์ส้มโอมาจากแหล่งอื่น อายุต้นประมาณ 3-5 ปี จำนวน 5 สวน ทำการทดลองจำนวนสวนละ 3 ต้นต่อสายพันธุ์ ประกอบด้วย

1) สวนคุณชัยฮะ เกษตรกรในเขตอำเภอสามพราน กิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดีซื้อมาจากร้านขายพันธุ์ไม้แถวคลองจินดา ซึ่งรับกิ่งจากจังหวัดปราจีนบุรีมาขาย ส่วนกิ่งพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ซื้อมาจากจังหวัดสมุทรสงคราม (แทนด้วยสัญลักษณ์ NS1)

2) สวนคุณชมพูนุช มีประมูล เกษตรกรในเขตอำเภอสามพราน กิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดีรับแจกมาจากหน่วยงานราชการ จึงทำให้ไม่สามารถระบุที่มาของแหล่งพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ส่วนกิ่งพันธุ์ขาวน้ำผึ้งซื้อมาจากสวนคุณมนตรี จังหวัดสมุทรสงคราม (แทนด้วยสัญลักษณ์ NS2)

3) สวนคุณหยด ถัดมาลี เกษตรกรในเขตอำเภอนครชัยศรี กิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดีซื้อมาจากจังหวัดปราจีนบุรี ส่วนกิ่งส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งซื้อมาจากงานเกษตร กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม (แทนด้วยสัญลักษณ์ NS3)

4) สวนคุณบุญเชิด คงประจักษ์ เกษตรกรในเขตอำเภอนครชัยศรี กิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดีซื้อมาจากจังหวัดปราจีนบุรี ส่วนกิ่งส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งซื้อมาจากสวนในจังหวัดสมุทรสงคราม (แทนด้วยสัญลักษณ์ NS4)

5) สวนคุณทัศนัยห์ แก่นจันทร์ เกษตรกรในเขตอำเภอนครชัยศรี กิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งซื้อมาจากจังหวัดชัยนาท (แทนด้วยสัญลักษณ์ NS5) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของส้มโอที่ใช้ในการทดลอง

รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	ลำดับในการทดสอบด้วย AFLP	รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	ลำดับในการทดสอบด้วย AFLP
OB1T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 8 ปี สวนคุณรุ่ง ยูรสวัสดิ์ สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	-	OB4T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 10 ปี สวนคุณสมพงษ์ โถค้า สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	-
OB1T2		-	OB4T2		-
OB1T3		-	OB4T3		-
OS1T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 3 ปี สวนคุณรุ่ง ยูรสวัสดิ์ สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	1	OS4T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 4 ปี สวนคุณสมพงษ์ โถค้า สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	19
OS1T2		2	OS4T2		20
OS1T3		3	OS4T3		21
OB1K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 8 ปี สวนคุณรุ่ง ยูรสวัสดิ์ สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	-	OB4K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 10 ปี สวนคุณสมพงษ์ โถค้า สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	-
OB1K2		-	OB4K2		-
OB1K3		-	OB4K3		-
OS1K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 3 ปี สวนคุณรุ่ง ยูรสวัสดิ์ สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	4	OS4K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 4 ปี สวนคุณสมพงษ์ โถค้า สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	22
OS1K2		5	OS4K2		23
OS1K3		6	OS4K3		24
OB2T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 10 ปี สวนคุณวันดี ใบนาค สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	-	NS1T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 3 ปี สวนคุณชัยฮะ สวนใหม่ในเขตอำเภอสามพราน	25
OB2T2		-	NS1T2		26
OB2T3		-	NS1T3		27
OS2T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 4 ปี สวนคุณวันดี ใบนาค สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	7	NS1K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 3 ปี สวนคุณชัยฮะ สวนใหม่ในเขตอำเภอสามพราน	28
OS2T2		8	NS1K2		29
OS2T3		9	NS1K3		30
OB2K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 10 ปี สวนคุณวันดี ใบนาค สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	-	NS2T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 4 ปี สวนคุณชมพูนุช มีประมูล สวนใหม่ในเขตอำเภอสามพราน	31
OB2K2		-	NS2T2		32
OB2K3		-	NS2T3		33
OS2K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 4 ปี สวนคุณวันดี ใบนาค สวนเก่าในเขตอำเภอสามพราน	10	NS2K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 4 ปี สวนคุณชมพูนุช มีประมูล สวนใหม่ในเขตอำเภอสามพราน	34
OS2K2		11	NS2K2		35
OS2K3		12	NS2K3		36
OB3T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 10 ปี สวนคุณสมชาย คูปิ่นแก้ว สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	-	NS3T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 3 ปี สวนคุณหยด ถัดมาลี สวนใหม่ในเขตอำเภอนครชัยศรี	37
OB3T2		-	NS3T2		38
OB3T3		-	NS3T3		39
OS3T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 5 ปี สวนคุณสมชาย คูปิ่นแก้ว สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	13	NS3K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 3 ปี สวนคุณหยด ถัดมาลี สวนใหม่ในเขตอำเภอนครชัยศรี	40
OS3T2		14	NS3K2		41
OS3T3		15	NS3K3		42
OB3K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 10 ปี สวนคุณสมชาย คูปิ่นแก้ว สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	-	NS4T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 3 ปี สวนคุณบุญเชิด คงประจักษ์ สวนใหม่ในเขตอำเภอนครชัยศรี	43
OB3K2		-	NS4T2		44
OB3K3		-	NS4T3		45
OS3K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 5 ปี สวนคุณสมชาย คูปิ่นแก้ว สวนเดิมในเขตอำเภอสามพราน	16	NS4K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 3 ปี สวนคุณบุญเชิด คงประจักษ์ สวนใหม่ในเขตอำเภอนครชัยศรี	46
OS3K2		17	NS4K2		47
OS3K3		18	NS4K3		48

ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	ลำดับในการทดสอบด้วย AFLP	รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	ลำดับในการทดสอบด้วย AFLP
NS5T1	พันธุ์ทองดี อายุต้น 4 ปี สวนคุณทัศนัยห์ แก่นจันทร์ สวนใหม่ในเขตอำเภอนครชัยศรี	49	NS5K1	พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อายุต้น 4 ปี สวนคุณทัศนัยห์ แก่นจันทร์ สวนใหม่ในเขตอำเภอนครชัยศรี	52
NS5T2		50	NS5K2		53
NS5T3		51	NS5K3		54

เมื่ออักษร T แทนสัญลักษณ์ของส้มโอพันธุ์ทองดี และอักษร K แทนสัญลักษณ์ของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของต้นส้มโอ โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>การทดลองย่อยที่ 1.1</u> ศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของต้นส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณภาพผลของส้มโอ เมื่อส้มโอมีแหล่งที่มาของกิ่งพันธุ์ที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย กลุ่มที่ใช้กิ่งพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐม และกลุ่มของสวนส้มโอที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น โดยทำการทดลองในส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่มีอายุประมาณ 3-5 ปี

ข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบด้วย

1. ลักษณะเปลือกลำต้น (trunk surface)
    1.1 ขรุขระ (rough)
    1.2 เรียบ (smooth)
2. ลักษณะกิ่ง (branch) พิจารณาจากกิ่งใหม่ ที่มีอายุประมาณ 1 ปี
    2.1 กลม (rounded)
    2.2 ค่อนข้างแบนและบิด (almost flattened and twisted)
3. ขนาดของใบ (size of leaflet) วัดใบที่แก่เต็มที่ (fully mature) ตำแหน่งใบที่ 3-4 นับจากปลายยอดลงมา
    3.1 ความยาว (length)
    3.2 ความกว้าง (width)
4. รูปร่างใบ (Leaf shape)
    4.1 รูปไข่ (ovate oblong)
    4.2 รูปโล่
    4.3 รูปรี (elliptic)
5. ลักษณะของปลายใบ (apex of leaflet)
    5.1 เว้าตื้น (emarginate)
    5.2 มน (obtuse)
6. สีของใบ (colour of mature leaflet) วัดค่าสีของใบด้วยเครื่อง Color Reader รุ่น CR-10 (Minolta CO., LTD., Japan)

7. ค่าความเขียวใบ โดยวัดค่าความเขียวใบ จากใบในตำแหน่งที่ 3-4 เมื่อนับจากปลายยอด ด้วยเครื่อง Chlorophyll meter รุ่น SPAD 502 (บริษัท Minolta Camera ประเทศญี่ปุ่น)

10. ขนที่ใบ

10.1 มีขนมาก

10.2 มีขนเล็กน้อย

10.3 ไม่มีขน

11. ข้อมูลคุณภาพผล เก็บข้อมูลเฉพาะต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว

11.1 น้ำหนักผล (กรัม)

11.2 ความสูงของผล (ซม.) วัดจากก้นผลจนไปถึงไหล่ผลทั้งสองข้างของผลส้ม

11.3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.) ใช้มีดผ่าตรงกลางผลส้มในส่วนที่กว้างที่สุด จากนั้นวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางแต่ละครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

11.4 ความหนาเปลือก (ซม.) วัดความหนาเปลือก 4 จุด โดยวัดความหนาเปลือก 2 จุด ซึ่งอยู่ตรงข้ามกัน นำมาหาค่าเฉลี่ย

11.5 สีเปลือก วัดสีของเปลือกบริเวณกลางผลจำนวน 2 จุดต่อผล ด้วยเครื่อง Color Reader รุ่น CR-10 (Minolta CO., LTD., Japan)

11.6 สีเนื้อ วัดสีของเนื้อบริเวณกลางผลจำนวน 4 จุดต่อผล ด้วยเครื่อง Color Reader รุ่น CR-10 (Minolta CO., LTD., Japan)

11.7 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids,TSS) ของน้ำคั้นมีค่าเป็น degree Brix ($^{\circ}$B) โดยนำน้ำคั้นมาวัดหาค่าด้วยเครื่อง hand refractometer

11.8 ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ในน้ำคั่น (titratable acidity, TA) ดัดแปลงวิธีการมาจาก AOAC method (JBT FoodTech Citrus Systems, 2011) โดยนำน้ำคั้น 2 มิลลิลิตร เติม 1% phenolphthalein จำนวน 1-2 หยด ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 N จนกระทั่งถึงจุด end point นำค่าปริมาตรสารละลายด่างที่ใช้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดซิตริก จากสูตร

$$\text{กรดซิตริก (\%)} = \frac{N\ base \times \text{มิลลิลิตร}\ base \times meq.wt.\text{ของกรดซิตริก}}{\text{ปริมาตรของน้ำคั้นที่ใช้}} \times 100$$

โดย N base คือ normality ของสารละลายด่าง NaOH

มิลลิลิตร base คือ ปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการไตเตรตเป็นมิลลิลิตร

meq. wt. (milliequivalent weight) ของกรดซิตริก เท่ากับ 0.006404

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี T-Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS Institute, 1989)

การทดลองย่อยที่ 1.2 การเปรียบเทียบคุณภาพผลของส้มโอที่มีอายุต้นแตกต่างกัน

ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบคุณภาพผลของต้นส้มโอ ในกลุ่มพันธุ์ที่ใช้กิ่งพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐมที่มีอายุต้นแตกต่างกัน คือ กลุ่มที่มีอายุต้น 8-10 ปี และกลุ่มที่มีอายุ 3-5 ปี ทำการทดลองในส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

ข้อมูลคุณภาพผลบันทึกเหมือนกับการทดลองที่ 1.1

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Paired T-Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS Institute, 1989)

การทดลองที่ 2 ศึกษาเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งด้วยเครื่องหมาย AFLP

1. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

1.1 เก็บใบอ่อนที่สะอาดปราศจากโรค จำนวนต้นละ 2-3 ใบ สกัดดีเอ็นเอของส้มโอตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al*. (1992) โดยนำตัวอย่างใบอ่อนที่ขยายตัวเต็มที่ประมาณ 2 กรัม นำมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ภายในหลอด microcentifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด โดยในแต่ละหลอดใส่ สารละลาย 2% CTAB buffer [4% hexadecyltrimethyl ammoniumbromide, 2.8 M NaCl, 40 mM EDTA (pH 8.0), 200 mM Tris-HCl (pH 8.0)] ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.2 นำไปแช่ในอ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เขย่าหลอดกลับไปมาทุก 10 นาที

1.3 เมื่อครบเวลาแล้วนำออกจากอ่างน้ำ ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

1.4 เติม chloroform : isoamylalcohol ที่อัตราส่วน 24:1 (v:v) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียว โดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ

1.5 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

1.6 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่ใสส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 5 M NaCl ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ ethanol ในปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของเหลวที่มีอยู่

1.7 บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

1.8 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

1.9 เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 70 % ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายเกลือเท สารละลายทิ้งอย่างระมัดระวัง แล้วปล่อยให้ตะกอนแห้ง (นำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที)

1.10 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1.0 mM EDTA (pH 8.0)] ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

2. การเลือกใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย AFLP

โดยเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Mse*I ในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส 1 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (preselective amplification) และไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส 3 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ดังตารางที่ 1 (selective amplification) จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส 3 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ มีที่มาดังนี้ หมายเลข 1-6 นำข้อมูลไพรเมอร์มาจากการทดลองของ Nartvaranant and Nartvaranant (2011) ที่ทำการศึกษาส้มโอในเขตภาคกลางของประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่มีค่า polymorphism มากกว่า 48 % ขึ้นไป ส่วนหมายเลข 7-8 นำมาจากการทดลองของ Liang *et al.* (2006) ที่ทำการศึกษาอนุกรมวิธานของพืชตระกูล Citrus และหมายเลข 9-10 นำมาจากการทดลองของ Compos *et al.* (2005) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของส้ม mandarin

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย AFLP ที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับไพรเมอร์	ลำดับ Primer 3+
1	ACT/CAC
2	CAG/TGA
3	TAC/TCG
4	AAG/ACC
5	AAG/CTG
6	AAG/CAA
7	ACT/CAT
8	AAC/CAC
9	CAG/ACA
10	CAA/AGG

3. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย AFLP

3.1 เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ

ตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Mse*I เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ดี ซึ่งประกอบด้วย

50 ng/µl ดีเอ็นเอ	5.0 ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2.5 ไมโครลิตร
10X NE Buffer	2.5 ไมโครลิตร
20 u *Eco*RI	0.26 ไมโครลิตร
10 u *Mse*I	0.34 ไมโครลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ	30 ไมโครลิตร

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดการตัดชิ้นดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดย adapter จะต่อเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอและทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับเกาะของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่ง adapter ที่ใช้ คือ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter มีขั้นตอนดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเสร็จ	25	ไมโครลิตร
5 p moles *Eco*RI adapter	1.0	ไมโครลิตร
25 p moles *Mse*I adapter	2.0	ไมโครลิตร
10 X T4 ligase buffer	5.0	ไมโครลิตร
5 unit T4 DNA ligase	0.2	ไมโครลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ	50	ไมโครลิตร

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่งโมง จากนั้นแบ่งปริมาณสารละลายดีเอ็นเอมา 10 ไมโครลิตร เติมน้ำ 90 ไมโครลิตร (Dilution 1) เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณในขั้นต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส 1 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้และให้มีความจำเพาะในขั้นหนึ่งก่อน มีขั้นตอนดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอที่ทำการเจือจางแล้ว (Dilution 1)	2.0	ไมโครลิตร
10 X PCR beffer	2.5	ไมโครลิตร
25mM $MgCl_2$	1.5	ไมโครลิตร
2mM dNTP	2.5	ไมโครลิตร
5 p moles Primer E-A	1.0	ไมโครลิตร
5 p moles Primer M-C	1.0	ไมโครลิตร
5 u *Taq* polymerase	0.1	ไมโครลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ	25	ไมโครลิตร

นำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (GeneAmp^{R} PCR System 9700 (Applied Biosystem)) โดยใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

Pre- denaturation ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที } 24 รอบ
Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นแบ่งบางส่วนมาเจือจางด้วยน้ำ 20 เท่า (Dilution 2) เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณ

ในขั้นต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส 3 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) มีขั้นตอนดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอที่ทำการเจือจางแล้ว (Dilution 2)	5.0	ไมโครลิตร
10 X PCR beffer	2.0	ไมโครลิตร
25mM $MgCl_2$	1.2	ไมโครลิตร
2mM dNTP	2.0	ไมโครลิตร
5 p moles Primer E+3	1.0	ไมโครลิตร
5 p moles Primer M+3	1.0	ไมโครลิตร
5 u *Taq* polymerase	0.1	ไมโครลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ	20	ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (GeneAmp^{R} PCR System 9700 (Applied Biosystem)) โดยใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้ ในขั้นแรกใช้โปรแกรม touch down PCR โดยลดอุณหภูมิในขั้นของ Annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ลงรอบละ 1 อาศาเซลเซียส

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
Annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
} 9 รอบ, -1 ^{0}C / รอบ

และต่อด้วยการตั้งอุณหภูมิ

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
} 30 รอบ

Storage ใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาและรอตรวจสอบต่อไป

หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา หยุดปฏิกิริยาด้วย 5 ul Loading buffer (10 mM EDTA (pH 8.0), 98% formamide, Bromophenol Blue & Xylenecyanol)

4. การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิสในเจลโพลีอะครีลาไมด์

4.1 การเตรียมเจลโพลีอะครีลาไมด์

ตรวจสอบผลของการทำ PCR ด้วย 4.5 % polyacrylamine จากนั้นแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า 293 โวล์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.2 การย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต

นำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาณ 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในเจลอะคลิลาไมด์ 4.5% ผ่านสารละลายตัวกลาง 1X TBE buffer จากนั้นจึงนำมาย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นเจลมาแช่และเขย่าเบาๆ ใน 10% acetic acid ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำสะอาด ประมาณ 2 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงนำมาย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (0.2% silver nitrate, 0.1% formaldehyde)

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาผ่านน้ำสะอาดอย่างรวดเร็ว แล้วทำให้ปรากฏแถบดีเอนเอด้วย developer solution (3% sodium carbonate, 0.05% formaldehyde, 0.01% thiosulfate) จำนวน 250 มิลลิลิตรที่แช่เย็น เขย่าจนปรากฏแถบดีเอนเอ จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด ประมาณ 5 นาที แล้วจึงผึ่งให้แห้ง

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. แปลงข้อมูลให้เป็นแบบไบนารี โดยในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอกำหนดให้มีค่าเป็น “1” และที่ตำแหน่งเดียวกันของตัวอย่างอื่นที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอกำหนดให้มีค่าเป็น “0”

2. ประเมินค่าดัชนีความเหมือน (Similarity Index, SI) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard (Jaccard’s coefficient) (Nei and Li, 1979) จากสูตรด้านล่าง

$$SI_{ij} = \frac{a}{(a + b + c)}$$

เมื่อ a คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งพันธุ์ i และพันธุ์ j
b คือ จำนวนเครื่องหมาย SSR ที่ปรากฏเฉพาะพันธุ์ i
c คือ จำนวนเครื่องหมาย SSR ที่ปรากฏเฉพาะพันธุ์ j

จากนั้นนำข้อมูลค่าดัชนีความเหมือน (Similarity Index, SI) มาทำการวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (unweighed pair-group method with arithematic average) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01 (Rohlf, 1997) โดยใช้ค่า cophenetic correlation เป็นค่าที่บอกว่าการจัดกลุ่มอยู่ในเกณฑ์ที่ดีหรือไม่ (Rohlf, 1997)

ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

ศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของต้นส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

ส้มโอพันธุ์ทองดี

จากการดำเนินงานวิจัยเพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ และเปรียบเทียบความเหมือนของพันธุ์ส้มโอ พบว่าส้มโอพันธุ์ทองดีที่ปลูกอยู่ดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐม กับกลุ่มของสวนส้มโอที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น เช่น ปราจีนบุรี ชัยนาท และนครศรีธรรมราช มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบที่เหมือนกัน โดยลักษณะประจำพันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทองดี คือ ลักษณะเปลือกลำต้นเรียบ กิ่งอ่อนมีลักษณะค่อนข้างแบนและบิด (almost flattened and twisted) ส่วนกิ่งแก่มีลักษณะกลม (rounded) รูปร่างใบเป็นรูปไข่ (ovate oblong) หรือรูปรี (Elliptic) ลักษณะปลายใบเป็นแบบเว้าตื้น (emarginate) หรือมน (obtuse) ใบมีขนน้อย ความกว้างและความยาวของแผ่นใบและหูใบของส้มโอทั้งสองกลุ่มมีขนาดใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบส้มโอพันธุ์ทองดี

แหล่งพันธุ์	เปลือก	ลักษณะกิ่ง	รูปร่างแผ่นใบ	รูปร่างปลายใบ	ขน	ขนาดใบ (ซม.)		ขนาดหูใบ (ซม.)		อัตราส่วนแผ่น/หูใบ
						ก	ย	ก	ย	
ดั้งเดิม	เรียบ	แบนและบิด	รูปไข่หรือรูปรี	เว้าตื้นหรือมน	น้อย	6.6±0.2	9.0±0.6	2.3±0.7	2.7±0.4	3.5±0.4
นอกพื้นที่	เรียบ	แบนและบิด	รูปไข่หรือรูปรี	เว้าตื้นหรือมน	น้อย	6.3±0.4	8.7±0.4	2.5±0.5	2.6±0.4	3.5±0.5
T-Test						ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ: ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี T-Test

เมื่อทำการประเมินสีใบด้วยเครื่อง Color Reader (รุ่น CR-10, Minolta CO., LTD., Japan) และการวัดค่าความเขียวใบด้วยเครื่อง chlorophyll meter (รุ่น SPAD 502, บริษัท Minolta Camera ประเทศญี่ปุ่น) พบว่ากลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมมีสีใบที่เขียวเข้มมากกว่ากลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์ส้มโอมาจากแหล่งอื่น (ตารางที่ 4 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 4 แสดงค่าสีใบของส้มโอพันธุ์ทองดี

แหล่งพันธุ์	สีใบ			ค่าความเขียวใบ
	L	a	b	SPAD unit
ดั้งเดิม	33.0±0.6	-15.1±0.4	20.1±0.5	62.3±1.0
นอกพื้นที่	35.2±1.8	-16.8±0.8	23.5±1.6	59.0±4.4
T-Test	*	ns	*	ns

หมายเหตุ: * คือ แตกต่างทางสถิติ และ ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี T-Test

ภาพที่ 1 กิ่ง ใบ และผล ของส้มโอพันธุ์ทองดีที่ปลูกดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐม (1) และกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น (2)

สำหรับทรงผลของส้มโอพันธุ์ทองดี กลุ่มพันธุ์ทองดีดั้งเดิมในพื้นที่พบเฉพาะทรงผลแบบกลมแป้น (oblate) ส่วนกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น พบทรงผลแบบกลมแป้น (oblate) และทรงกลม (spheroid) ไหล่ผลลาดลง มีจีบเล็กน้อย ก้นผลเรียบหรือเว้าเล็กน้อย สอดคล้องกับรายงานของปัญญา (2541) และเสาวภา และคณะ (2553) ผลมีขนาดปานกลาง น้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ซึ่งถือว่าเข้าเกณฑ์มาตรฐานทั่วไปของส้มโอพันธุ์นี้ น้ำหนักเนื้อประมาณ 62-67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าน้ำหนักเนื้อมากกว่าการทดลองของ ลพ และคณะ (2555) ที่รายงานไว้ว่าสัดส่วนของเนื้อที่รับประทานได้เท่ากับ 51 – 55 เปอร์เซ็นต์ ต่อมน้ำมันมีขนาดเล็ก เปลือกผลค่อนข้างบางประมาณ 1.2-1.4 เซนติเมตร (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ลักษณะของผลส้มโอพันธุ์ทองดีที่มีแหล่งที่มาของกิ่งพันธุ์ที่แตกต่างกัน

แหล่งพันธุ์	ทรงผล	น้ำหนักผล (กรัม)	น้ำหนักเนื้อ (กรัม)	น้ำหนักเปลือก (กรัม)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	ความสูงผล (ซม.)	หนาเปลือก (ซม.)
ดั้งเดิมนอกพื้นที่	กลมแป้น	1,096.3±119.4	742.4±108.8	352.0±86.3	13.6±0.7	12.7±0.8	1.2±0.2
	ผลกลมหรือกลมแป้น	1,101.9±121.1	689.4±28.1	334.0±58.5	13.7±0.3	13.4±0.5	1.4±0.2
T-Test		ns	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ: ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี T-Test

ผิวผลมีสีเขียวอ่อนจึงถึงเข้ม โดยสีของเปลือกผลทั้งสองกลุ่มมีค่า a เป็นค่าลบ (สีเขียว) ที่ใกล้เคียงกัน แต่ในกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมสีของเปลือกจะเป็นสีเขียวอมเหลืองมากกว่า สีของเปลือกใน (albedo) และผนังกลีบ มีสีชมพูอ่อนเรื่อ ๆ สำหรับสีของเนื้อผลพบว่าส้มโอจากทั้ง 2 กลุ่ม มีสีเนื้อเป็นสีชมพูอมแดงเหมือนกัน เนื้อผลนิ่ม และมีความฉ่ำน้ำ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 1) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) และปริมาณกรด (TA) ของส้มโอทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน คือ กลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมมีค่า TSS เท่ากับ 8.7 องศาบริกซ์ และ TA เท่ากับ 0.45 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น มีค่า TSS เท่ากับ 8.3 องศาบริกซ์ และ TA เท่ากับ 0.45 เปอร์เซ็นต์ โดยเกณฑ์ข้อกำหนดมาตรฐานส้มโอของประเทศไทย ระบุไว้ว่าส้มโอต้องมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ไม่น้อยกว่า 8 องศาบริกซ์ (National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards, 2007) จึงจะถือว่าเป็นส้มโอที่มีคุณภาพ แสดงให้เห็นว่าส้มโอพันธุ์ทองดีที่ผลิตจากสวนแถวอำเภอนครชัยศรีและอำเภอสามพราน มีมาตราฐานตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ สำหรับค่าอัตราส่วนของ TSS/TA พบว่าส้มโอกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมกับกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่นมีค่าไม่แตกต่างกัน โดยวิชัย (2501) รายงานว่าส้มโอควรมีค่า TSS/TA ตั้งแต่ 15:1 ขึ้นไป รสชาติจึงจะหวานอร่อยถูกใจผู้บริโภค หากค่าอัตราส่วนน้อยกว่านี้จะมีรสเปรี้ยวเกินไป สำหรับค่า TSS และ TA ในการทดลองครั้งนี้ มีค่าน้อยกว่าค่าในงานทดลองของเยาวรัตน์ (2545) ที่รายงานว่าส้มโอพันธุ์ทองดี อายุต้น 7 ปี มีค่า TSS เท่ากับ 10.01 องศาบริกซ์ และ TA เท่ากับ 0.83 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นผลมาจากอายุต้นที่แตกต่างกัน เนื่องจากในการทดลองนี้ส้มโอพันธุ์ทองดีมีอายุประมาณ 3-5 ปี ซึ่งถือว่ายังเป็นต้นส้มโอสาว รสชาติยังไม่อร่อย จึงส่งผลให้ค่าที่ประเมินได้มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 6 สีเปลือก สีเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ปริมาณกรด (TA) และอัตราส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ต่อปริมาณกรด (TSS/TA) ของส้มโอพันธ์ทองดีที่มีแหล่งที่มาของกิ่งพันธุ์ที่แตกต่างกัน

แหล่งพันธุ์	เปลือก			เนื้อผล			TSS (°B)	TA (%)	TSS/TA
	L	a	b	L	a	b			
ดั้งเดิม	48.3±0.9	-11.3±0.8	28.8±0.6	42.9±2.4	3.5±1.1	9.5±0.9	8.7±0.4	0.45±0.0	19.7±1.5
นอกพื้นที่	45.4±0.9	-10.9±0.9	25.1±1.0	41.8±1.0	3.4±2.8	9.8±1.9	8.3±0.4	0.45±0.0	18.6±1.1
T-Test	*	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ: * คือ แตกต่างทางสถิติ และ ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี T-Test

ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

สำหรับพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนั้น พบว่าผลการทดลองเหมือนกับในพันธุ์ทองดี คือ กลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมกับกลุ่มพันธุ์ที่นำกิ่งมาจากแหล่งอื่น เช่น สมุทรสงคราม และชัยนาท พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบไม่มีความแตกต่างกัน โดยลักษณะประจำพันธุ์ของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง คือ ลักษณะเปลือกลำต้นเรียบ กิ่งอ่อนมีลักษณะค่อนข้างแบนและบิด (almost flattened and twisted) ส่วนกิ่งแก่มีลักษณะกลม (rounded) รูปร่างใบเป็นรูปไข่ (ovate oblong) หรือรูปรี (Elliptic) ลักษณะปลายใบเป็นแบบเว้าตื้น (emarginate) หรือมน (obtuse) ความกว้างและของยาวของแผ่นใบและหูใบของส้มโอทั้งสองกลุ่มมีขนาดใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 7 และภาพที่ 2) แต่เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของความยาวของแผ่นใบต่อความยาวหูใบ พบว่ากลุ่มพันธุ์ที่นำกิ่งมาจากแหล่งอื่นมีอัตราส่วนที่มากกว่า หรือมีหูใบที่สั้นกว่ากลุ่มพันธุ์ดั้งเดิม

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

แหล่งพันธุ์	เปลือก	ลักษณะกิ่ง	รูปร่างแผ่นใบ	รูปร่างปลายใบ	ขน	ขนาดใบ (ซม.)		ขนาดหูใบ (ซม.)		อัตราส่วนแผ่น/หูใบ
						ก	ย	ก	ย	
ดั้งเดิม	เรียบ	แบนและบิด	รูปไข่หรือรูปรี	เว้าตื้นหรือมน	น้อย	6.2±0.4	9.2±0.5	2.1±0.2	3.8±1.7	2.9±0.4
นอกพื้นที่	เรียบ	แบนและบิด	รูปไข่หรือรูปรี	เว้าตื้นหรือมน	น้อย	6.5±0.3	9.4±0.7	2.0±0.2	2.8±0.2	3.4±0.3
T-Test						ns	ns	ns	ns	*

หมายเหตุ: * คือ แตกต่างทางสถิติ และ ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี T-Test

เมื่อทำการประเมินสีใบด้วยเครื่อง Color Reader (รุ่น CR-10 (Minolta CO., LTD., Japan) และการวัดค่าความเขียวใบด้วยเครื่อง chlorophyll meter พบว่ากลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมมีค่า L เท่ากับ 32.7 ค่า a เท่ากับ -14.5 ค่า b เท่ากับ 19.7 และค่าความเขียวใบเท่ากับ 64.0 SPAD unit สำหรับกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์ส้มโอมาจากแหล่งอื่น มีค่า L เท่ากับ 37.0 ค่า a เท่ากับ -17.7 ค่า b เท่ากับ

26.0 และค่าความเขียวใบเท่ากับ 54.9 SPAD unit แสดงให้เห็นว่าส้มโอกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมมีสีใบที่เขียวเข้มมากกว่า (ตารางที่ 8 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 8 แสดงค่าสีใบของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

แหล่งพันธุ์	สีใบ			ค่าความเขียวใบ
	L	a	b	SPAD unit
ดั้งเดิม	32.7±2.4	-14.5±2.	19.7±4.0	64.0±8.3
นอกพื้นที่	37.0±2.1	-17.7±0.9	26.0±2.8	54.9±5.5
T-Test	*	*	*	ns

หมายเหตุ: * คือ แตกต่างทางสถิติ และ ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี T-Test

ภาพที่ 2 กิ่ง ใบ และผล ของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ปลูกดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐม (3) และกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น (4)

สำหรับทรงผลของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พบทรงผลเป็นแบบทรงกลม (spheroid) หรือกลมสูง (obovoid) ไหล่ผลไม่เท่ากันทั้งสองข้าง ไม่มีจุก ก้นผลเรียบหรือเว้าเล็กน้อย ผลมีขนาดปานกลาง น้ำหนักประมาณ 1.6 กิโลกรัม ซึ่งถือว่าเข้าเกณฑ์มาตรฐานทั่วไปของส้มโอพันธุ์นี้ น้ำหนักเนื้อประมาณ 55-59 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานในส้มโอพันธุ์นี้ คือ 50.6-61.5 เปอร์เซ็นต์ (ลพ และคณะ, 2555) ต่อมน้ำมันมีขนาดใหญ่นูนขึ้น เปลือกค่อนข้างหนาประมาณ 1.7-1.9 เซนติเมตร (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ลักษณะของผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่มีแหล่งที่มาของกิ่งพันธุ์ที่แตกต่างกัน

แหล่งพันธุ์	ทรงผล	น้ำหนักผล (กรัม)	น้ำหนักเนื้อ (กรัม)	น้ำหนักเปลือก (กรัม)	เส้นผ่านศูนย์กลางผล (ซม.)	ความสูงผล (ซม.)	หนาเปลือก (ซม.)
ดั้งเดิม	ผลกลมหรือกลมสูง	1,647.2±35.3	922.5±76.0	611.5±18.4	15.9±0.0	16.0±0.3	1.9±0.2
นอกพื้นที่	ผลกลมหรือกลมสูง	1,603.1±99.8	960.3±104.3	575.1±41.5	15.5±0.2	16.2±0.3	1.7±0.0
T-Test		ns	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ: ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี T-Test

ผิวผลมีสีเขียวอ่อนจึงถึงเข้ม โดยสีของเปลือกผลทั้งสองกลุ่มมีค่า L a และ b ใกล้เคียงกัน สำหรับสีของเนื้อผลพบว่าเนื้อผลมีสีเหลืองเหมือนสีของน้ำผึ้ง โดยกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น (L = 46.1, a = 0.2 และ b = 8.9) เนื้อมีสีเหลืองน้ำผึ้งมากกว่ากลุ่มพันธุ์ดั้งเดิม (L = 42.5, a = 0.1 และ b = 6.8) (ภาพที่ 2) ส้มโอกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS เท่ากับ 9.2 องศาบริกซ์) มากกว่ากลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น (TSS เท่ากับ 8.7 องศาบริกซ์) สำหรับค่าปริมาณกรดของส้มโอทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับค่าอัตราส่วนของ TSS/TA พบว่าส้มโอกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมมีค่ามากกว่ากลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น แสดงว่าส้มโอกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมมีรสชาติที่อร่อยกว่า (ตารางที่ 10) สำหรับในงานทดลองของเยาวรัตน์ (2545) รายงานว่าส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งอายุต้น 7 ปี มีค่า TSS เท่ากับ 11.32 องศาบริกซ์ และ TA เท่ากับ 0.72 เปอร์เซ็นต์ ค่า TSS/TA เท่ากับ 15.72 อาจเป็นผลมาจากอายุต้นที่แตกต่างกันเช่นเดียวกับพันธุ์ทองดี

ตารางที่ 10 สีเปลือก สีเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ปริมาณกรด (TA) และอัตราส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ต่อปริมาณกรด (TSS/TA) ของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่มีแหล่งที่มาของกิ่งพันธุ์ที่แตกต่างกัน

แหล่งพันธุ์	เปลือก			เนื้อผล			TSS (°B)	TA (%)	TSS/TA
	L	a	b	L	a	b			
ดั้งเดิม	51.3±1.7	-12.5±0.7	31.1±1.8	42.5±1.1	0.1±0.0	6.8±1.0	9.2±0.0	0.53±0.0	17.6±0.1
นอกพื้นที่	46.1±1.4	-10.7±1.2	23.9±0.1	46.1±2.2	0.2±0.1	8.9±0.6	8.7±0.1	0.55±0.0	16.0±0.2
T-Test	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	*

หมายเหตุ: * คือ แตกต่างทางสถิติ และ ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี T-Test

การเปรียบเทียบคุณภาพผลของส้มโอที่มีอายุต้นแตกต่างกัน

ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบคุณภาพผลของต้นส้มโอ ในกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐมที่มีอายุต้นแตกต่างกัน คือ กลุ่มที่มีอายุต้น 8-10 ปี และกลุ่มที่มีอายุ 3-5 ปี ทำการทดลองทั้งในส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

ในส้มโอพันธุ์ทองดีพบว่าลักษณะคุณภาพผลในด้านต่าง ๆ เช่น ทรงผล น้ำหนักผล น้ำหนักเนื้อผล ขนาดของผล และความหนาแปลือก ของต้นที่มีอายุ 8-10 ปี และกลุ่มที่มีอายุ 3-5 ปี ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 11) แต่เมื่อพิจารณาสีของเปลือกพบว่าต้นที่มีอายุ 8-10 ปี จะมีสีเป็นสีเขียวอมเหลืองมากกว่าต้นที่มีอายุ 3-5 ปี ส่วนสีของเนื้อผลไม่แตกต่างกัน สำหรับค่า TSS และ TA นั้น พบว่าผลส้มโอของต้นที่มีอายุ 8-10 ปี มีค่าของ TSS และ TA มากกว่าผลส้มโอที่เก็บเกี่ยวมาจากต้นที่มีอายุ 3-5 ปี สำหรับอัตราส่วนของ TSS/TA นั้น ไม่มีความแตกต่างกันของส้มโอทั้ง 2 ช่วงอายุ (ตารางที่ 12) แสดงให้เห็นว่าอายุของต้นส้มโอมีผลต่อรสชาติ ยิ่งต้นมีอายุเพิ่มขึ้นจะยิ่งให้ผลส้มโอที่มีรสชาติที่อร่อยมากยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Na-Nakorn and Chalumpak (2016) ที่รายงานอายุต้นของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีผลต่อลักษณะคุณภาพผล จากงานวิจัยรายงานว่าคุณภาพผลที่เก็บเกี่ยวมาจากต้นที่มีอายุ 6-8 ปี จะมีค่า TSS TA และ TSS/TA สูงกว่าในต้นส้มโอที่มีอายุ 4 ปี โดยสาเหตุที่ต้นส้มโอที่มีอายุมากกว่าสามารถให้คุณภาพผลที่ดีกว่า อาจมีผลมาจากต้นที่มีอายุมากย่อมมีขนาดทรงพุ่มที่ใหญ่มากกว่า จึงทำให้สามารถสร้างอาหารมาเลี้ยงผลภายในต้นได้มากกว่านั้นเอง

ตารางที่ 11 ลักษณะของผลส้มโอพันธุ์ทองดีที่มีอายุต้นแตกต่างกัน

แหล่งพันธุ์	ทรงผล	น้ำหนักผล (กรัม)	น้ำหนักเนื้อ (กรัม)	น้ำหนักเปลือก (กรัม)	เส้นผ่านศูนย์กลางผล (ซม.)	ความสูงผล (ซม.)	หนาเปลือก (ซม.)
ทองดี 8-10 ปี	ผลกลมแป้น	1,048.6±187.6	701.7±124.7	314.3±62.8	16.3±5.7	12.4±0.9	1.1±0.2
ทองดี 3-5 ปี	ผลกลมแป้น	1,096.3±119.4	742.4±108.8	352.0±86.2	13.6±0.7	12.7±0.8	1.2±0.2
T-Test		ns	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ: ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Paired T-Test

ตารางที่ 12 สีเปลือก สีเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ปริมาณกรด (TA) และอัตราส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ต่อปริมาณกรด (TSS/TA) ของส้มโอพันธุ์ทองดีที่มีอายุต้นแตกต่างกัน

แหล่งพันธุ์	เปลือก			เนื้อผล			TSS (°B)	TA (%)	TSS/TA
	L	a	b	L	a	b			
ทองดี 8-10 ปี	50.4±1.0	-9.9±1.2	30.0±0.6	43.5±1.8	1.9±0.9	9.5±0.3	10.0±0.8	0.57±0.07	17.8±1.4
ทองดี 3-5 ปี	48.3±0.9	-11.3±0.8	28.8±0.6	42.9±2.4	1.6±2.0	9.5±0.9	8.7±0.4	0.45±0.02	19.7±1.5
T-Test	*	ns	*	ns	ns	ns	*	*	ns

หมายเหตุ: * คือ แตกต่างทางสถิติ และ ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Paired T-Test

ในส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งพบว่าลักษณะคุณภาพผลในด้านต่าง ๆ เช่น ทรงผล น้ำหนักผล น้ำหนักเนื้อผล ขนาดของผล และความหนาแปลือก ของต้นที่มีอายุ 8-10 ปี และกลุ่มที่มีอายุ 3-5 ปี ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 13) แต่พบว่าเปลือกของส้มโอกลุ่มที่มีอายุ 3-5 ปี มีแนวโน้มของค่าน้ำหนักเปลือกและความหนาเปลือกมากกว่ากลุ่มที่มีอายุ 8-10 ปี ส่วนสีของเปลือกพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ในกลุ่มที่ต้นส้มโอมีอายุ 8-10 ปี สีเนื้อของส้มโอจะมีสีเหลืองน้ำผึ้งเข้มมากกว่าต้นส้มโอที่มีอายุน้อย อีกทั้งยังมีค่า TSS มากกว่าเช่นกัน (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 ลักษณะของผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่มีอายุต้นแตกต่างกัน

แหล่งพันธุ์	ทรงผล	น้ำหนักผล (กรัม)	น้ำหนักเนื้อ (กรัม)	น้ำหนักเปลือก (กรัม)	เส้นผ่านศูนย์กลางผล (ซม.)	ความสูงผล (ซม.)	หนาเปลือก (ซม.)
ขาวน้ำผึ้ง 8-10 ปี	ผลกลมหรือกลมสูง	1,527.8±134.8	939.4±84.0	507.2±62.5	15.3±0.5	15.9±1.1	1.6±0.2
ขาวน้ำผึ้ง 3-5 ปี	ผลกลมหรือกลมสูง	1,647.2±35.3	922.5±76.0	611.5±18.4	15.9±0.0	16.0±0.3	1.9±0.2
T-Test		ns	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ: ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Paired T-Test

ตารางที่ 14 สีเปลือก สีเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ปริมาณกรด (TA) และอัตราส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ต่อปริมาณกรด (TSS/TA) ของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่มีอายุต้นแตกต่างกัน

แหล่งพันธุ์	เปลือก			เนื้อผล			TSS (°B)	TA (%)	TSS/TA
	L	a	b	L	a	b			
ขาวน้ำผึ้ง 8-10 ปี	51.9±0.6	-12.2±0.2	30.6±1.6	44.5±1.4	1.1±0.4	8.8±1.2	10.1±0.3	0.57±0.03	17.8±1.7
ขาวน้ำผึ้ง 3-5 ปี	51.3±1.7	-12.5±0.7	31.1±1.8	42.5±1.1	0.1±0.0	6.8±0.9	9.2±0.1	0.53±0.00	17.6±0.1
T-Test	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	ns

หมายเหตุ: * คือ แตกต่างทางสถิติ และ ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Paired T-Test

ศึกษาเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ด้วยเครื่องหมาย AFLP

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์พืชอาจตรวจสอบได้หลายวิธี ได้แก่ การศึกษาทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) การศึกษาทางชีวเคมี (biochemical marker) และการศึกษาทางเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) (สุรินทร์, 2540) แต่สำหรับส้มโอนั้นการประเมินโดยอาศัยเพียงแค่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก เนื่องจากต้นส้มโอแต่ละพันธุ์มีความคล้ายคลึงกัน การจำแนกด้วยการใช้สีเนื้อผลเป็นเกณฑ์ เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพเฉพาะในกรณีที่กลุ่มพันธุ์นั้นมีสีเนื้อแตกต่างกัน เช่น ทองดี กับขาวน้ำผึ้ง แต่ถ้าเป็นกลุ่มพันธุ์ที่มีสีเนื้อเหมือนกันแล้ว การจำแนกพันธุ์จะทำได้อยากมาก เช่น ขาวน้ำผึ้ง ขาวใหญ่ ขางแตงกวา เป็นต้น อีกทั้งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องการจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ของส้มโอยังคงมีอยู่จำกัด ส่วนใหญ่เป็นการจำแนกโดยใช้ลักษณะของผลเป็นหลัก (จาตุรนต์, 2516; ธรรมนูญ, 2500; วิชัย, 2501;)

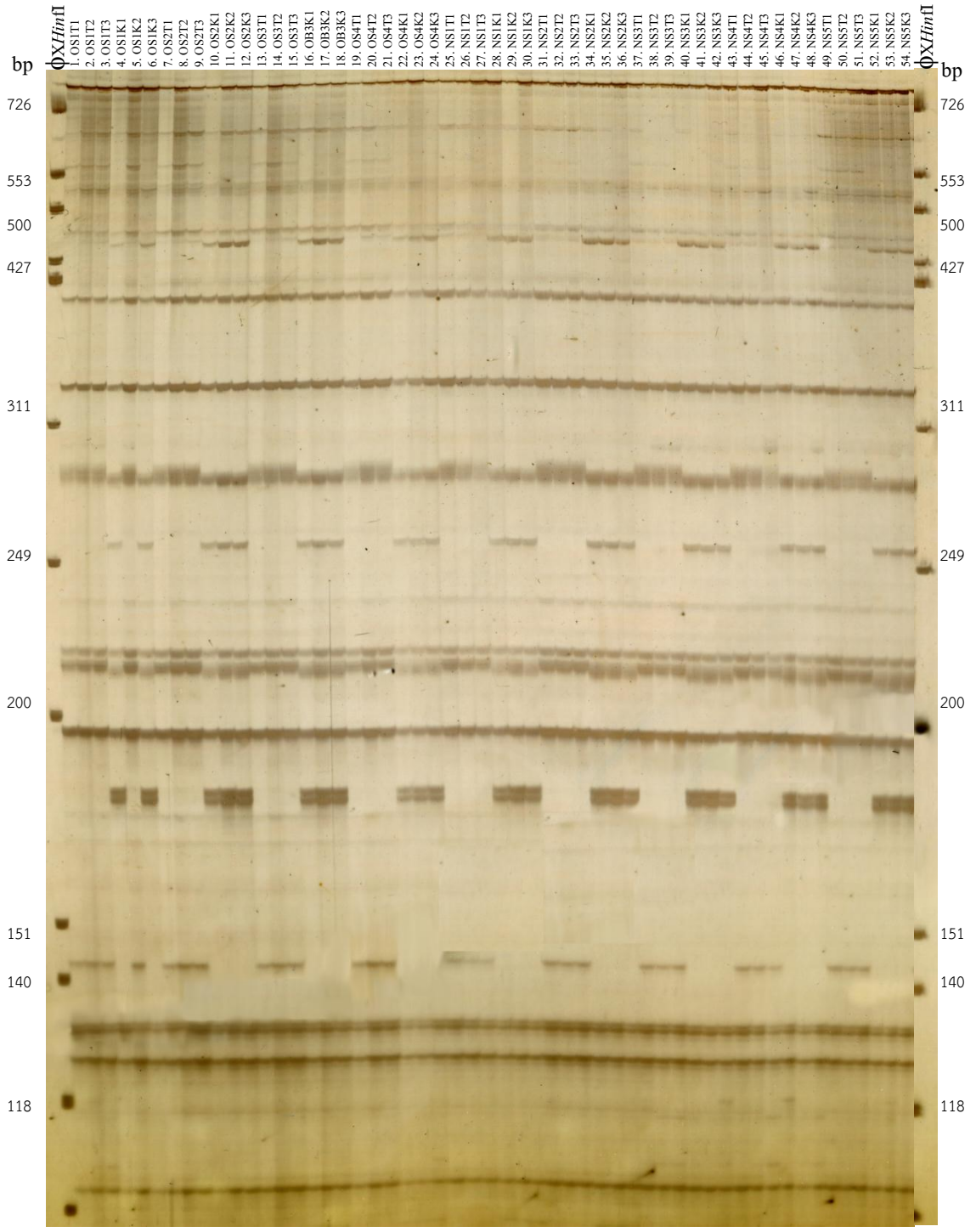
ประสิทธิภาพของเครื่องหมาย AFLP ในการประเมินพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

ในการตรวจสอบเอกลักษณ์พันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่าเครื่องหมาย AFLP จำนวน 10 เครื่องหมาย ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 229 แถบดีเอ็นเอ มีเครื่องหมายตั้งแต่ 13-32 แถบดีเอ็นเอต่อคู่ไพรเมอร์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.9 แถบดีเอ็นเอต่อคู่ไพรเมอร์ มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 118-726 bp พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างแถบลายดีเอ็นเอ (polymorphic band) จำนวน 48 แถบดีเอ็นเอ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.8 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ คู่ไพรเมอร์ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism สูงสุด คือ ACT/CAC มีค่าเท่ากับ 41.18 % (ภาพที่ 3) ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism ต่ำสุด คือ AAG/CAA และ AAC/CAC มีค่าเท่ากับ 12.50 % เครื่องหมายAFLP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism เฉลี่ยที่ค่อนข้างต่ำ คือ

20.96 % (ตารางที่ 15) ซึ่งการเลือกใช้เครื่องหมาย AFLP ในการทดลองครั้งนี้เลือกมาจากการทดลองของ Nartvaranant and Nartvaranant (2011) ที่ทำการศึกษาส้มโอในเขตภาคกลางของประเทศไทยจำนวน 97 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย AFLP โดยเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่มีค่า polymorphism มากกว่า 48 % ขึ้นไป ส่วนเครื่องหมาย AFLP ที่เหลือนำมาจากงานทดลองของ Liang *et al.* (2006) และ Compos *et al.* (2005) ทำการศึกษาอนุกรมวิธานของพืชตระกูล Citrus โดยไพรเมอร์ที่เลือกมาใช้เป็นไพรเมอร์ที่มีค่า polymorphism ที่สูง โดยงานทดลองของ Compos *et al.* (2005) มีค่า polymorphism เท่ากับ 86% และ Liang *et al.* (2006) มีค่า polymorphism เท่ากับ 50 % ซึ่งแตกต่างกับผลการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากตัวอย่างที่นำมาศึกษาน้อย มีเพียงพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง อีกทั้งส้มโอพันธุ์การค้ายังมีฐานพันธุกรรมแคบ (Nartvaranant and Nartvaranant, 2011) จึงมีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism เฉลี่ยที่ค่อนข่างต่ำ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเครื่องหมาย AFLP ทั้ง 10 คู่ไพรเมอร์ ที่ใช้ในการทดลองสามารถแบ่งกลุ่มของส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งได้อย่างชัดเจน เช่น คู่ไพรเมอร์ ACT/CAC พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 140 และ 255 เบสแพร์ แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง โดยจะปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะในพันธุ์ทองดี (ภาพที่ 3) สำหรับการทดลองครั้งต่อไปควรเพิ่มจำนวนเครื่องหมาย AFLP ให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม

ตารางที่ 15 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด แถบดีเอ็นเอที่เป็น Polymorphic band และค่าเปอร์เซ็นต์ Polymorphism ของเครื่องหมาย AFLP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์

เครื่องหมาย AFLP	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	Polymorphic band	Polymorphism (%)	หมายเหตุ
AAG/ACC	21	4	19.05	Nartvaranant and
AAG/CAA	32	4	12.50	Nartvaranant, 2011
AAG/CTG	20	5	25.00	
ACT/CAC	17	7	41.18	
CAG/TGA	19	3	15.79	
TAC/TCG	13	4	30.77	
AAC/CAC	24	3	12.50	Liang *et al.*, 2006
ACT/CAT	24	6	25.00	
CAA/AGG	32	5	15.63	Compos *et al,* 2005
CAG/ACA	27	7	25.93	
รวม	229	48		
เฉลี่ย	22.9	4.8	20.96	



ภาพที่ 3 เครื่องหมาย AFLP ของคู่ไพรเมอร์ E-ACT/M-CAC ที่ใช้ในการประเมินเอกลักษณ์พันธุ์ส้มโอ

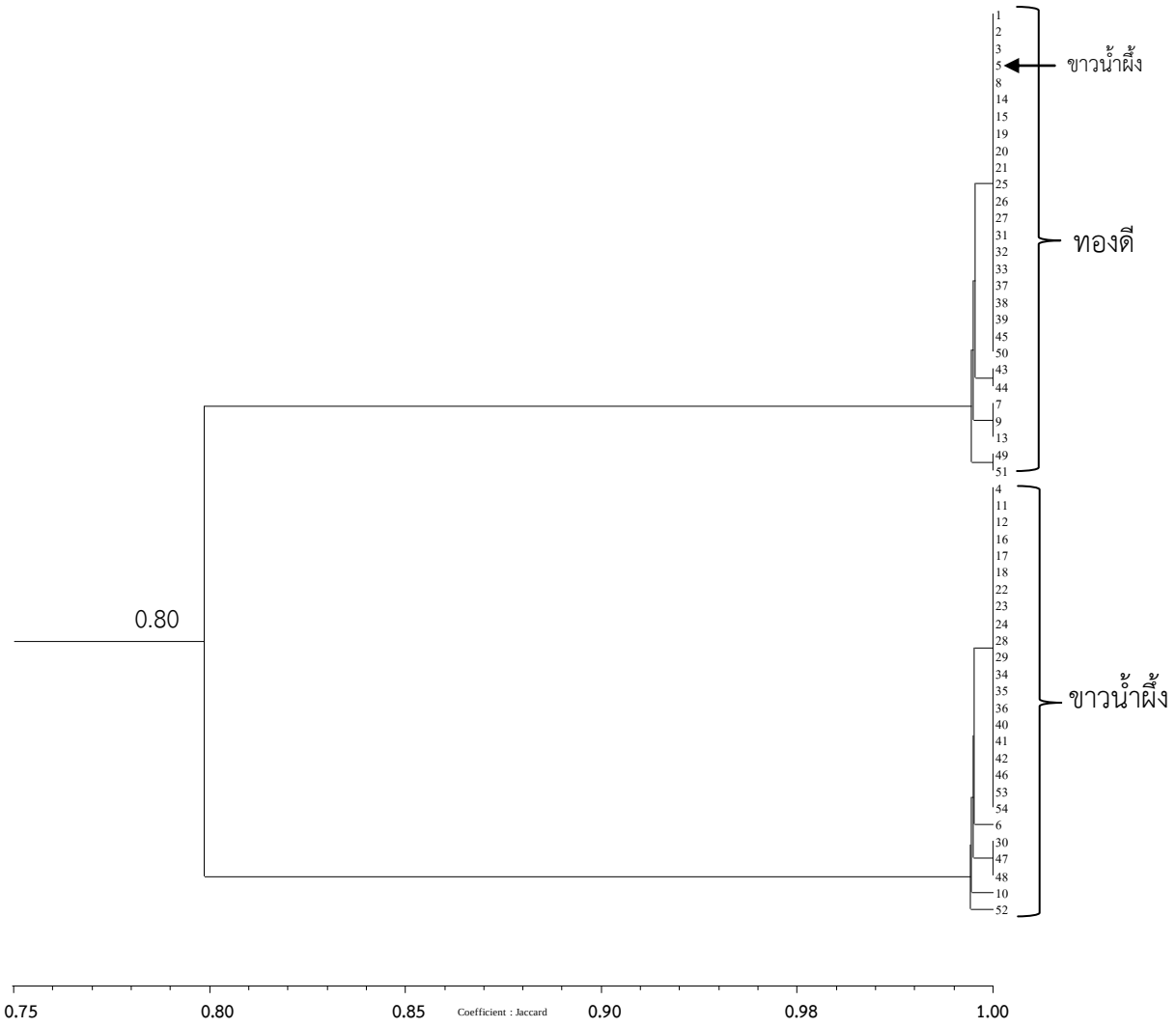
การตรวจสอบเอกลักษณ์ของพันธุ์ส้มโอด้วยเครื่องหมาย AFLP

ดำเนินการตรวจสอบเอกลักษณ์พันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งด้วยเครื่องหมาย AFLP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ จากนั้นประเมินค่าดัชนีความเหมือน (Similarity Index, SI) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard (Jaccard's coefficient) และนำข้อมูลค่าดัชนีความเหมือน มาทำการวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (unweighed pair-group method with arithematic average) พบว่าที่ค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.80 สามารถแบ่งกลุ่มส้มโอออกได้เป็น 2 กลุ่มพันธุ์ คือ ส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง (ภาพที่ 4) สำหรับตัวอย่างที่เกิดความผิดพลาดในการแปลผล คือ ตัวอย่างส้มโอหมายเลข 5 ซึ่งเป็นตัวแทนของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง แต่จากการการนำไปวิเคราะห์เอกลักษณ์พันธุ์ด้วยเครื่องหมาย AFLP พบว่าถูกจัดอยู่ในกลุ่มของส้มโอพันธุ์ทองดี แสดงให้เห็นว่าการจำแนกพันธุ์โดยใช้เพียงลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว เช่น ลักษณะใบ รูปทรงใบ เป็นต้น ยังมีโอกาสผิดพลาด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส้มโอ ซึ่งลักษณะภายนอกของใบในส้มโอในแต่ละสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งสอดคล้องกับ Bo *et al.* (2014) รายงานว่าการจำแนกสายพันธุ์ของส้มโอโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวเป็นเรื่องที่ยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อส้มโอชนิดนั้นยังไม่มีผล

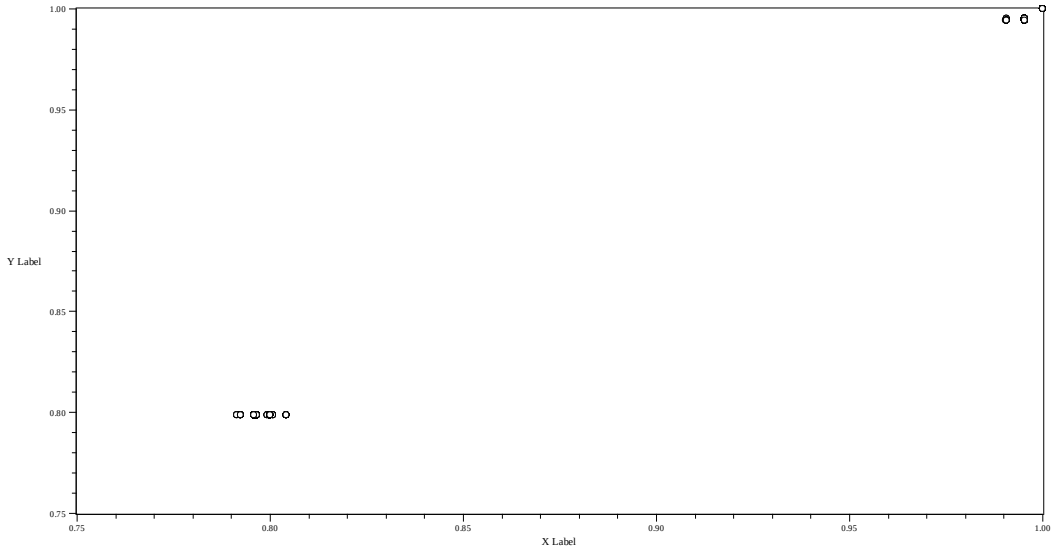
จากนั้นเมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มพันธุ์ทองดี โดยใช้ข้อมูลความแตกต่างของแหล่งที่มาของกิ่งพันธุ์ พบว่าพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์ทองดีในกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมกับกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกันมาก (SI = 0.99-1.00) สำหรับส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งก็ให้ผลการทดลองที่เหมือนกัน คือ กลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมกับกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (SI = 0.99-1.00) (ภาพที่ 4) เมื่อวิเคราะห์การกระจายของตัวอย่าง ส้มโอ จำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่าค่า cophenetic correlation (r) มีค่าเท่ากับ 0.9998 (ภาพที่ 5) ซึ่งเป็นค่าที่บอกว่าการจัดกลุ่มของส้มโออยู่ในเกณฑ์ที่ดี (Nartvaranant and Nartvaranant, 2011, Rohlf, 1997)

จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลคุณภาพผล และการตรวจเอกลักษณ์พันธุ์ด้วยเครื่องหมาย AFLP ทำให้เกษตรกรมีความมั่นใจว่าส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่มีความแตกต่างในเรื่องที่มาของแหล่งพันธุ์ เช่น ส้มโอพันธุ์ทองดี นำมาจากจังหวัดปราจีนบุรี ชัยนาท ร้านขายพันธุ์ไม้แถวคลองจินดา ซึ่งรับกิ่งจากจังหวัดปราจีนบุรีมาขาย อีกทั้งรับแจกกิ่งพันธุ์มาจากหน่วยงานราชการ เช่น โครงการพา ทองดี" กลับบ้าน" โดยโครงการนี้ ได้ไปนำกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดี มาจากจังหวัดนครศรีธรรมราช เนื่องจากได้มีการนำส้มโอพันธุ์ทองดีไปปลูกไว้ที่ลุ่มน้ำปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อ 30 ปีที่แล้ว (คมชัดลึก, 2555) ในพันธุ์ขาวน้ำผึ้งนำกิ่งพันธุ์มาจากจังหวัดสมุทรสงคราม ชัยนาท และซื้อกิ่งพันธุ์จากงานเกษตร กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลคุณภาพผล และข้อมูลเอกลักษณ์พันธุ์ที่เหมือนกัน จากผลการทดลองอาจเป็นไปได้ว่าในปัจจุบันการขยายพันธุ์ส้มโอนิยมใช้การขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ เช่น การตอนกิ่ง ติดตา หรือการเปลี่ยนยอดพันธุ์ดี ซึ่งการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเหล่านี้จะให้ต้นใหม่ที่มีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ อีกทั้งเกษตรกรในพื้นที่พยายามเสาะแสวงหาแหล่งพันธุ์ที่เคยนำส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้งในพื้นที่อำเภอนครชัยศรีและอำเภอสามพรานไปปลูก เช่น จังหวัดนครนายก และจังหวัดนครศรีธรรมราช ตามโครงการ พา 'ทองดี' (คมชัดลึก, 2555) ดังนั้นจึงทำให้พันธุกรรมของส้มโอของ

กลุ่มที่ปลูกอยู่ดั้งเดิมกับกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์ที่นำมาจากแหล่งอื่นมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่อย่างไรก็ตามการเลือกกิ่งพันธุ์ส้มโอควรนำมาจากแหล่งที่เชื่อถือได้ เนื่องจากในการทดลองของ เสาวณี และอุณารุจ (2551) ที่ทำการตรวจสอบความหลายหลากของส้มโอพันธุ์การค้าและพันธุ์พื้นเมืองในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR เมื่อพิจารณาเฉพาะส้มโอพันธุ์ทองดี พบว่ากิ่งส้มโอพันธุ์ทองดีที่ขายในงานเกษตร กำแพงแสน กับกิ่งพันธุ์ที่ปลูกอยู่ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตรมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ค่าดัชนีความเหมือน = 0.51) ในขณะที่ส้มโอพันธุ์ทองดีที่ปลูกอยู่ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตรกับกิ่งพันธุ์ที่นำมาจากจังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นพันธุ์เดียวกัน (ค่าดัชนีความเหมือน = 1.00) ดังนั้นความแตกต่างทางพันธุกรรมของกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทองดี น่าจะเป็นผลมาจากต้นแม่พันธุ์ที่มาจากสายต้นที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน เนื่องจากส้มโอเป็น Self-incompatibility (Soost, 1964) ต้องมีการผสมข้ามกับพันธุ์อื่นจึงจะติดเมล็ด โดยในการผสมข้ามพันธุ์จะทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างประชากร อีกทั้งในอดีตเกษตรกรทำการขยายพันธุ์ส้มโอพันธุ์ดีโดยวิธีการเพาะเมล็ด ดังนั้นส้มโอแต่ละพันธุ์จึงมีความแปรปรวนพันธุ์มาก เมื่อนำไปปลูกในแต่ละพื้นที่ก็อาจจะใช้ชื่อพันธุ์เดิมหรือตั้งชื่อเรียกใหม่ที่แตกต่างกันออกไป (เสาวณี และอุณารุจ, 2551) ดังนั้นเกษตรกรจึงต้องคัดเลือกสายต้นที่ดีและนำมาปลูก เนื่องจากการปลูกไม้ผลโดยเฉพาะส้มโอใช้เวลานาน ประมาณ 3-5 ปี จึงจะสามารถไว้ผลและให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี หากเกษตรได้พันธุ์ไม่ดีมาปลูก ก็จะทำให้เสียเวลาเป็นอย่างมาก



ภาพที่ 4 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของส้มโอจำนวน 54 ตัวอย่างและด้วยเครื่องหมาย AFLP จำนวน 10 ตำแหน่ง



ภาพที่ 5 ภาพแสดงการกระจายของข้อมูลตัวอย่างส้มโอ จำนวน 54 ตัวอย่าง ซึ่งมีค่า cophenetic correlation (r) = 0.9998

สรุปผลการวิจัย

ลักษณะประจำพันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้ง

จากการดำเนินงานวิจัยเพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ และเปรียบเทียบความเหมือนของส้มโอพันธุ์ทองดีที่ปลูกอยู่ดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐม กับกลุ่มของสวนส้มโอที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น เช่น ปราจีนบุรี ชัยนาท และนครศรีธรรมราช พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส้มโอทั้ง 2 กลุ่ม มีความเหมือนกัน ได้แก่ ลักษณะเปลือกลำต้น ลักษณะกิ่ง รูปร่างของแผ่นใบและปลายใบ ขนาดของใบ ขนที่ใบ ทรงผล น้ำหนักผล น้ำหนักเนื้อผล ความหนาของเปลือกผล สีของเนื้อผล ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) และปริมาณกรด (TA) แต่จากการทดลองจะพบว่ากลุ่มส้มโอพันธุ์ทองดีที่ปลูกอยู่ดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐมจะมีสีของใบที่เข้มกว่า เปลือกผลจะมีสีเขียวปนเหลืองมากกว่ากลุ่มที่นำกิ่งมาจากแหล่งอื่น

สำหรับพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส้มโอกลุ่มที่ปลูกอยู่ดั้งเดิม และกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากจังหวัด ปราจีนบุรี ชัยนาท และสมุทรสงคราม มีลักษณะที่เหมือนกัน อันได้แก่ ลักษณะเปลือกลำต้น ลักษณะกิ่ง รูปร่างของแผ่นใบและปลายใบ ขนาดของใบ ขนที่ใบ ทรงผล สีเปลือก พบว่ากลุ่มส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ปลูกอยู่ดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดนครปฐมจะมีสีของใบที่เข้มกว่า และมีปริมาณปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มากกว่ากลุ่มที่นำกิ่งมาจากแหล่งอื่น ในขณะที่สีของเนื้อผลเป็นสีเหลืองน้ำผึ้งเข้มน้อยกว่ากลุ่มที่นำกิ่งมาจากแหล่งอื่น

การเปรียบเทียบคุณภาพผลของส้มโอที่มีอายุต้นแตกต่างกัน (เฉพาะกลุ่มพันธุ์ที่ปลูกอยู่ดั้งเดิม)

อายุของต้นส้มโอมีผลต่อคุณภาพผลของส้มโอทั้งในพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พบว่าในต้นที่มีอายุ 8-10 ปี ผลส้มโอจะมีคุณภาพในการบริโภคดีกว่าผลส้มโอที่เก็บเกี่ยวมาจากต้นที่อายุ 3-5 ปี เนื่องจากค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และปริมาณกรดมีค่าทีสูงกว่า อีกทั้งในพันธุ์ขาวน้ำผึ้งพบว่าส้มโอกลุ่มที่มีอายุ 3-5 ปี มีแนวโน้มของค่าน้ำหนักเปลือกและความหนาเปลือกมากกว่ากลุ่มที่มีอายุ 8-10 ปี

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของพันธุ์ส้มโอด้วยเครื่องหมาย AFLP

ตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของส้มโอด้วยเครื่องหมาย AFLP จำนวน 10 เครื่องหมาย พบว่าคู่ไพรเมอร์ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism สูงสุด คือ ACT/CAC มีค่าเท่ากับ 41.18 % ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism ต่ำสุด คือ AAG/CAA และ AAC/CAC มีค่าเท่ากับ 12.50 % เครื่องหมายAFLP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism เฉลี่ยที่ค่อนข้างต่ำ คือ 20.96 % เป็นผลมาจากฐานพันธุกรรมที่แคบของส้มโอทั้ง 2 พันธุ์ การวิเคราะห์จัดกลุ่มและสร้างแผนภูมิต้นไม้ เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน (SI) อยู่ในช่วง 0.80-1.00. ที่ค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.80 สามารถแบ่งกลุ่มส้มโอได้เป็น 2 กลุ่มพันธุ์

คือ ส้มโอพันธุ์ทองดีและพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง จากนั้นเมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มพันธุ์ทองดี พบว่าพันธุกรรมของส้มโอพันธุ์ทองดีในกลุ่มพันธุ์ดั้งเดิมกับกลุ่มที่นำกิ่งพันธุ์มาจากแหล่งอื่น มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกันมาก (SI = 0.99-1.00) สำหรับส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งก็ให้ผลการทดลองที่เหมือนกัน

บรรณานุกรม

กองวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2535. ส้มโอ เอกสารเศรษฐกิจการเกษตรเลขที่ 49, กรุงเทพฯ 67 น.

คมชัดลึก. 2555. ฟื้นฟูสวน ‘ส้มโอ’ นำ ‘ทองดี’ กลับนครปฐม. แหล่งที่มา : http://www.komchadluek.net/news/lifestyle/126319.

จาตุรนต์ พิชิตานนท์. 2516. การศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของผลส้มโอพันธุ์ขาวพวง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กทมฯ.

จินตนา อิงคนินันท์. 2549. เอกสารประกอบคำสอนวิชาการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ณรงค์ แดงเปี่ยม. 2558. การปรับปรุงพันธุ์ส้มโอ. รายงานโครงการวิจัยของกรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ทิวาพร ผดุง. 2554. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และการออกดอกของส้มโอพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้ง. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ.

ธรรมนูญ เปรมสุนทร. 2500. การสำรวจส้มโอบางพันธ์ของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, คณะกสิกรรมและสัตวบาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2544. การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบส้มโอพันธุ์สายน้ำผึ้งและขาวน้ำผึ้ง. น. 172-175. *ใน* การสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปัญญา ธยามานนท์. 2541. เอกสารวิชาการที่ 21 เรื่องส้มโอ โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

ปัณฑารีย์ แต้ประยูร. 2549. การใช้เครื่องหมายโมเลกุล Simple Sequence Repeat (SSR) ในการจัดกลุ่มปาล์มน้ำมัน. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2532. สวนส้มอย่างมืออาชีพ. เจริญรัฐการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 88 น.

พงษ์นาถ นาถวรานันต์ และเกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์. 2556. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการติดผลและการร่วงของผลส้มโอพันธุ์ทองดีพื้นที่ลุ่มแม่น้ำนครชัยศรี. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) 83 หน้า.

ภาควิชาพันธุศาสตร์. 2542. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 55 น.

ภาณุศักดิ์ คำยา. 2516. การศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของผลส้มโอพันธุ์ขาวแป้น. ปัญญาพิเศษปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รวี เสรฐภักดี. 2545. The pummelos and Grapefruits, น.24-25. *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร “วิทยาการส้ม : ทางเลือกปัจจุบันสู่อนาคต” 24-28 มิถุนายน 2545. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม ร่วมกับ คณะเกษตร และ ศูนย์วิจัยและพัฒนาไม้ผลเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ลพ ภวภูตานนท์, กฤษณา กฤษณพุกต์ และยงยุทธ โอสถสภา. 2555. ความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติดินในแหล่งปลูกกับปริมาณและคุณภาพผลผลิตส้มโอ. รายงานฉบับฉบับสมบูรณ์ชุดโครงการส้มโอเพื่อการส่งออก สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

วิชัย บุณญะวัฒน์. 2501. การศึกษาลักษณะผลส้มโอที่สำคัญ 11 พันธุ์ วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, คณะกสิกรรมและสัตวบาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เยาวรัตน์ วงศ์ศรีสกุลแก้ว. 2545. การเจริญเติบโตพัฒนาของผลส้มโอขาวน้ำผึ้งและลักษณะสำคัญของผลพันธุ์อื่นๆ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถาบันวิจัยและพัฒนา. 2558. กิจกรรม Work Shop การทำข้อเสนอโครงการวิจัย ปีงบประมาณ ปี 2559. วันที่ 23 พฤษภาคม 2558 ณ โรงเรียนวัดดอนหวาย อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม, นครปฐม.

สมพร เกตุพงศ์ 2534. รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาสภาพการทำสวนส้มโอของเกษตรกรในภาคกลาง. งานพืชสวนฝ่ายส่งเสริมและพัฒนาการผลิต. สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคกลาง, ชัยนาท. 80 น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. การจำแนกพืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล, น. 57-82. *ใน* ธีรชัย ธนานันต์, บรรณาธิการ. การจัดจำแนกพืชโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี.

เสาวณี คงศรี และอุณารุจ บุญประกอบ. 2551. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของส้มโอในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย Simple Sequence Repeat (SSR). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เสาวภา ไชยวงศ์ ธีรพงษ์ เทพกรณ์ สุจริต ส่วนไพโรจน์ โรมรัน ชูศรี และอุไรวรรณ ขุนจันทร์. 2553. การประเมินสารออกฤทธิ์สำคัญในกลุ่ม Flavonoids และ Anthocyanins ของส้มโอพันธุ์ทองดี พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พันธุ์ขาวแตงกวา พันธุ์ขาวใหญ่ และพันธุ์ทับทิมสยาม ที่ปลูกในประเทศไทย. รายงานฉบับฉบับสมบูรณ์ สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำนักข่าวกรมประชาสัมพันธ์, 2557 จังหวัดนครปฐม ให้โอกาสส้มโอจังหวัดอื่นมาจำหน่าย. แหล่งที่มา : http://thainews.prd.go.th/.

สำนักข่าวประชาสัมพันธ์นครปฐม, 2554. สวนส้มโอนครปฐมยืนต้นตายหลังถูกน้ำท่วมเสียหายนับ 200 ล้านบาท. แหล่งที่มา :http://pr.prd.go.th/nakhonpathom/.

สำนักงานการท่องเที่ยวและกีฬาจังหวัดนครปฐม. 2557. ส้มโอ. แหล่งที่มา : http://nakhonpathom.mots.go.th/

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 2557. ส้มโอนครปฐม. แหล่งที่มา : http://www.lib.ru.ac.th/journal/nakornpathom/nakhonpathom_som_o.html

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Cheorospondias asillaris* leaves. Biotech. Biodiv. Lett. 2: 19-24.

39

Bo W, Guang-yan Z., Jian-qiang Y., Run-ting Y., Chong Li L., Yue-jia L., Yun Z., Xuan W., Bo J., Ji Z., Li Z., Shu-tang Y., Xue-jun B. and Dong-guo Z., "Identification of pummelo cultivars by using a panel of 25 selected SNPs and 12 DNA segments", *PLOS ONE*, 2014, *9,* e94506.

Compos, E.T., M.A.G. Espinosa, M.L. Warburton, A.S. Varela and A.V. Monter. 2005. Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. Interciencia 30: 687-693.

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 marker. J. Hort. Sci. 70: 117-125.

Farris, J.S. 1969. On the cophenetic correlation coefficient. Systematic Zoology 18: 279-285.

JBT FoodTech Citrus Systems. 2011. Procedures for analysis of citrus products. Sixth Edition. John Bean technologies corporation, Inc., Florida.

Jeffreys, A.J., V. Willson and S. Thein. 1985. Hypervariable mimisatellite region in human DNA. Nature 314: 67-73.

Jorgensen, K.R. 1984. Tropical Tree Fruits for Australia. Poly-Graphics Pty. Ltd., Brisbane. 226 p.

Kosman, E. and K.J. Leonard. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid and polyploid species. **Mol. Ecol.** 14: 415-424.

Liang, G., G. Xiong, Q. Gua, Q. He and X. Li. 2006. AFLP analysis and the taxonomy of Citrus. Acta Horticulturae 760.

Morton, J. 1987. Pummelo, pp. 147-151. *In* C.F. Dowling, eds. Fruits of Warm Climates. Media, Incorporated, USA.

Na-Nakorn Somporn and Chalumpak Chaiphon. 2016. Effect of tree age and fruit age on fruit development and fruit quality of Pummelo var. Tabtimsiam. Journal of Agricultural Technology. 12(3): 637-645.

Nartvaranant Pongnart and Nartvaranant Kantiporn. 2011. Analysis based on AFLP markers of the genetic variations and their relationships for pummelo cultivars grown in the central region of Thailand. Songklanakarin J. Sci. Technol. 33 (5), 499-508.

National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards. 2007. Agricultural Standard TAS 13 – 207: Pummelo. Ministry of Agriculture and Cooperatives. The Royal Gazette Vol. 124, Section 78D.

Nei, M. and W.H. Li. 1997. Mathematical mode for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad**. Sci**. U.S.A. 76: 5269-5273.

Rohlf, F.I. 1997. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.00. Exeter Software; Setauket, N.Y.

Romesburg, H. C. 1938. **Cluster Analysis for Researchers**. Krieger Publishing Company Malabar, Florida.

SAS Institute. 1997. **SAS User Guide: Statistics**. SAS Institute, Cary.

Singh, A. 1980. Fruit Physiology and Production. Kalyani Publisher, New Delhi. 513 p.

Soost, R.K. 1964. Self-incompatibility in *Citrus grandis* (L.) Osbeck. **Amer. Soc. Hort. Sci. Proc.** 84: 137-140.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V. Lee, M. Hormes, A. Frijters, T. Plot , J. Peleman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4414.