

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยว
ด้วยเครื่องหมาย ISSR

Genetic Relationships Analysis of Lime and Acid *Citrus* by ISSR Markers

ปวีณา ชื่นวาริน^{1/} สุวัฒน์ ทองเหลียว^{1/} อัญมณี อาวุชานนท์^{1/}

Paweena Chuenwarin^{1/} Sukawat Thongleow^{1/} Anyamanee Auvuchanon^{1/}

Received 21 Jan 2022/Revised 20 Apr 2022/Accepted 26 Apr 2022

ABSTRACT

The major commercial lime cultivars in Thailand are Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) and Tahiti lime (*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka). These cultivars are either not resistant to diseases or the fruit quality do not meet the market demand. To breed for new cultivars with improved disease resistance and quality, lime and acid *Citrus* germplasms are the sources of parental lines. Information on genetic relationship between lime and acid *Citrus* germplasms will be very helpful for parental lines selection. This study aims to study the genetic relationship of 55 accessions of lime and acid *Citrus* germplasms by using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Four primers of ISSR generated 33 DNA bands with 87.5% polymorphism. Dendrogram revealed the ability of 4 ISSR primers to cluster lime and acid *Citrus* into four groups, a group of Mexican lime and Tahiti lime, a group of citron and lemon, a group of kaffir lime, and a group of finger lime which coincide with the classification of lime and acid *Citrus* to their species. Focusing on 26 accessions of Mexican lime, ISSR primer 814 could separate Mexican lime into two groups. Group A contained 13 accessions in which the average fruit weight, fruit rind thickness, and seed number were all less than group B which also contained 13 accessions.

Keywords: Mexican lime, Citrus, DNA markers, ISSR

^{1/} ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

^{1/} Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nahkon Pathom, 73140

*Corresponding author: paweena.chue@ku.th

บทคัดย่อ

มะนาวพันธุ์ที่สำคัญในประเทศไทย คือ มะนาวเม็กซิกัน และมะนาวตาฮิติ แต่ยังคงพบว่ามีพันธุ์มะนาวที่นิยมปลูกยังมีความอ่อนแอต่อโรคหรือคุณภาพผลบางประการอาจยังไม่ดีพอ เพื่อพัฒนาพันธุ์มะนาวให้ดียิ่งขึ้น การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวในเชื้อพันธุกรรม จะเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกพันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะนาว งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวที่รวบรวมจากแหล่งเชื้อพันธุกรรมต่าง ๆ จำนวน 55 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด inter simple sequence repeat (ISSR) พบว่าเครื่องหมาย ISSR ทั้ง 4 ไพรเมอร์ แสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 33 แถบ ให้เปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึม 87.5 % สร้างเดนโดแกรมที่สามารถจำแนกมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มของมะนาวเม็กซิกันและมะนาวตาฮิติ กลุ่มของ citron และเลมอน กลุ่มมะกรูด และกลุ่มมะนาวนิ้วมือ ซึ่งการแบ่งกลุ่มนี้สามารถจัดกลุ่มได้ตามสปีชีส์ เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มมะนาวเม็กซิกันจำนวน 26 พันธุ์ เครื่องหมาย ISSR ไพรเมอร์ 814 สามารถจำแนกมะนาวเม็กซิกันออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A จำนวน 13 พันธุ์ มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักผล ความหนาเปลือก และปริมาณเมล็ดน้อยกว่ามะนาวในกลุ่ม B จำนวน 13 พันธุ์

คำสำคัญ: มะนาว, *Citrus*, เครื่องหมายดีเอ็นเอ, ISSR

บทนำ

มะนาวพันธุ์การค้าที่สำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยมีอยู่ 2 ชนิด คือ *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle มีชื่อสามัญ คือ มะนาวเม็กซิกัน (mexican lime) และ *C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka มีชื่อสามัญคือ มะนาวตาฮิติ

(tahiti lime) (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2560) โดยในประเทศไทยนิยมบริโภคมะนาวเม็กซิกันมากกว่า เนื่องจากมีกลิ่นหอม ในขณะที่มะนาวตาฮิติแม้จะมีน้ำมากและไร้เมล็ดแต่กลิ่นไม่หอม ปัญหาของเกษตรกรผู้ปลูกมะนาวในประเทศไทยที่สำคัญและทำให้ผลผลิตเสียหาย ได้แก่ การเกิดโรคแคงเกอร์ แม้จะมีการปรับปรุงพันธุ์มะนาวเพื่อให้ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ แต่ผลผลิตยังไม่เป็นที่นิยมต่อผู้บริโภคเนื่องจาก มีเปลือกหนาและเมล็ดมาก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์มะนาวต่อไป วสรณ (2558) รายงานว่า การคัดเลือกพันธุ์มะนาวจากเชื้อพันธุกรรม เพื่อปรับปรุงให้ได้คุณภาพของผลมะนาวที่ดีขึ้นและสามารถต้านทานโรคได้ อาจปรับปรุงพันธุ์มะนาวโดยการผสมมะนาวเม็กซิกันเข้าด้วยกัน หรืออาจนำพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวชนิดอื่นเข้ามาผสม ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการรวบรวมเชื้อพันธุกรรมมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยว โดยเชื้อพันธุกรรมมะนาวที่รวบรวมอาจพบความหลากหลายทางพันธุกรรม เพราะมะนาวมีการขยายพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอาจพบความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการกลายพันธุ์จากตาได้ (bud mutation) สำหรับการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการเพาะเมล็ด อาจพบการกลายพันธุ์ไปจากต้นแม่ เนื่องจาก มะนาวเป็นลูกผสมของ *C. micrantha* กับ *C. medica* L. (Curk et al., 2016) ปัญหาที่เกิดขึ้นหลังจากการผสมพันธุ์คือ เมล็ดมะนาวส่วนใหญ่จะเป็น polyembryony อาจทำให้การคัดเลือกต้นที่เป็น zygote ออกจากต้นที่เป็น nucellar embryony ทำได้ยาก ดังนั้น การใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ของมะนาวเพื่อนำมาปรับปรุงพันธุ์ ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จะช่วยให้การคัดเลือกพันธุ์ที่จะนำมาผสมเพื่อให้เกิดพันธุ์ใหม่ที่หลากหลายและอาจมีลักษณะที่ดีขึ้นกว่าเดิมได้นอกจากนี้ เครื่องหมายโมเลกุลยังช่วยในการ

คัดเลือกลูกผสมใหม่ ทำได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ สามารถคัดเลือกได้ตั้งแต่ในระยะต้นกล้า ไม่ต้องรอให้ต้นมะนาวโตจนได้ผลผลิต

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมพืชสกุลส้ม เช่น randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) inter simple sequence repeat (ISSR) inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) retrotransposon microsatellite amplified polymorphism (REMAP) ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้แสดงระดับ polymorphism ได้สูง สามารถแสดงความแตกต่างของพันธุกรรมได้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ ISSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่ซับซ้อน ทำได้อย่างง่ายและรวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งที่จะศึกษามาก่อน และตำแหน่ง simple sequence repeat (SSR) เป็นตำแหน่งที่มีกระจายทั่วไปในจีโนม ISSR เป็นเทคนิคที่สามารถจำแนกพันธุกรรมได้ดีรองลงมาจากเทคนิค REMAP ซึ่งเป็นเทคนิคที่ต้องทราบลำดับเบสก่อนจึงจะสามารถออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ศึกษาได้ (Biswas *et al.*, 2010) การศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกใช้เครื่องหมาย ISSR เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวที่รวบรวมไว้ในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกพันธุ์มะนาวในการพัฒนาพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แหล่งที่มาของตัวอย่างมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยว

ใช้ตัวอย่างใบมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวจำนวน 55 พันธุ์ ประกอบด้วยมะนาวเม็กซิกัน 26 พันธุ์ มะนาวตาฮิติ 5 พันธุ์ citron 5 พันธุ์ เลมอน (lemon) 3 พันธุ์ มะกรูด (kaffir lime) 4 พันธุ์ มะนาวนิ้วมือ (finger lime) 4 พันธุ์ และพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวอื่น ๆ อีก 8 พันธุ์ จากแหล่งเชื้อ

พันธุกรรมมะนาว ได้แก่ สวนมะนาวฟาร์มตาฮิติ จ. ลพบุรี, ศูนย์วิจัยและพัฒนาไม้ผลเขตร้อน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, ฟาร์มมะกรูด จ.ลพบุรี และสวนไม้ผล จ.จันทบุรี

2. การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยว แช่เย็น เมื่อถึงห้องปฏิบัติการ แบ่งตัวอย่างออกมาประมาณ 25 มก./ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1987) โดยใน 2% CTAB extraction buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% 2-mercaptoethanol) เติม 1% polyvinylpyrrolidone แล้วบดตัวอย่างพืชให้ละเอียด ตูสลายละลายใส่หลอด microtube ปั่นที่อุณหภูมิ 60 °ซ. เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้น เติม chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 1 เท่า แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูชั้น aqueous phase ใส่หลอดใหม่เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง จากนั้น จึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) ที่มี RNase 20 ไมโครกรัม/มล. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 20 นาที แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ.

3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้ง 55 ตัวอย่าง (จากข้อ 2) มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนที่อยู่ระหว่างส่วนที่ซ้ำกัน (SSR) โดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์

4 ไพรเมอร์ (Table 1) ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x PCR buffer 1.5 mM, $MgCl_2$ 0.2 mM, dNTPs 0.2 M primer ExcelTaqTM, Taq DNA polymerase (SMOBIO, Hsinchu City, Taiwan) 1U และดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม โดยทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ 94 °ซ. เป็นเวลา 3 นาที และทำปฏิกิริยา 35 รอบ ที่ 94°ซ. เป็นเวลา 1 นาที 42-55 °ซ. เป็นเวลา 45 วินาที และ ที่ 72 °ซ. เป็นเวลา 1 นาที และขึ้นตอนสุดท้ายที่ 72 °ซ. เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วถ่ายภาพ

ด้วย Gel Documentation (Syngene InGenius LHR Gel Doc System, Maryland, USA) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ExcelBandTM 100 bp+3K DNA Ladder (SMOBIO, Hsinchu City, Taiwan)) บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ถ้ามีแถบดีเอ็นเอปรากฏให้คะแนน 1 ถ้าไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏให้คะแนน 0 และนำผลการให้คะแนนมาสร้างแผนภาพ dendrogram ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน Dice (Dice similarity coefficient) ด้วยโปรแกรม PAST

Table 1 List of primers used in this study

ISSR primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Annealing Temperature (°C)
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	45
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	42
814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	42
861	ACCACCACCACCACCACC	55

Data from Biswas *et al.* (2010)

4. การเก็บข้อมูลน้ำหนักผล ความหนาเปลือก และจำนวนเมล็ด

เนื่องจาก คุณภาพน้ำหนักผล ความหนาเปลือก และจำนวนเมล็ด เป็นองค์ประกอบที่ผู้บริโภคมะนาวให้ความสำคัญ ส่งผลให้เกษตรกรต้องเพาะปลูกมะนาวให้ตรงตามพันธุ์ที่ผู้บริโภคต้องการ และผู้บริโภคในประเทศไทยนิยมบริโภคมะนาวเม็กซิกัน จึงได้ศึกษาข้อมูลคุณภาพผลดังกล่าว โดยเก็บตัวอย่างผลมะนาวเม็กซิกันที่ให้ผลผลิตได้ในเดือนมกราคม 2561 จำนวน 16 พันธุ์ โดยแบ่งกลุ่มตาม Band Pattern ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR (ข้อ 3) คือ กลุ่ม Band Pattern A จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ แป้นรำไพ, แป้นบ้านแพ้ว, แป้นสิรินนท์, มะนาวไร้หนาม และดกดูไบ กลุ่ม Band Pattern B จำนวน 11 พันธุ์ ได้แก่ แป้นพิจิตร 1, แป้นพิจิตร 2,

แป้นพิจิตร 4, แป้นจ้ำรัส 29, แป้นจ้ำรัส 28, แป้นจ้ำรัส 9, แป้นใหญ่, แป้นเจ้าพระยา, แพรว, ดกพิเศษ และ เอี่ยมแข็ง ณ แปลงเกษตรกรรมสวนมะนาวฟาร์มตาฮ่วน จ. ลพบุรี ที่ปลูกในวงบ่อซีเมนต์ จำนวนพันธุ์ละ 1-10 ผล ชั่งน้ำหนักผล วัดความหนาเปลือกโดยใช้ Digital Vernier Caliper วัด 3 ด้าน และนับจำนวนเมล็ด หาค่าเฉลี่ยจากข้อมูลทั้งหมดของกลุ่ม A และกลุ่ม B แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย student t-test ในโปรแกรม Microsoft Excel 2016

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะนาวและพืชสกุลส้มที่ใกล้เคียง

ISSRทั้ง 4 ไพรเมอร์สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และสามารถแสดงความแตกต่าง

ของแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวจำนวน 55 ตัวอย่างได้อย่างชัดเจน ไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มตัวอย่างดีเอ็นเอได้ทั้งสิ้น 33 แถบ ที่มีขนาดต่างกันตั้งแต่ประมาณ 400-1700 bp จำนวนแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์อยู่ในช่วง 5-11 แถบ เฉลี่ย 8.25 แถบต่อไพรเมอร์ และให้แถบ polymorphic ทั้งหมด 29 แถบ เฉลี่ย 7.25 แถบต่อไพรเมอร์ (Table 2) จากการศึกษา ISSR ในเชื้อพันธุกรรมพืชสกุลส้มของ Biswas *et al.* (2010) พบว่า ใช้ ISSR 6 ไพรเมอร์ แต่ให้แถบดีเอ็นเอ

ทั้งสิ้น 33 แถบ เช่นกัน แต่ให้แถบ polymorphic เพียง 28 แถบ มีค่าเฉลี่ยแถบ polymorphic ต่อไพรเมอร์เพียง 4.67 แถบ เมื่อเทียบเปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึมพบว่า ISSR 4 ไพรเมอร์ ในการศึกษาครั้งนี้สูงถึง 87.5% เมื่อเทียบกับ ISSR 6 ไพรเมอร์ ที่ใช้ในงานวิจัยของ Biswas *et al.* (2010) ซึ่งมีเพียง 84.85% แสดงให้เห็นว่า เชื้อพันธุกรรมมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวในงานวิจัยนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า

Table 2 PCR amplification of ISSR bands

Primer name	Total bands amplified	Polymorphic bands	Polymorphism (%)	Product size (bp)
809	9	9	100	500-1200
810	11	11	100	450-1600
814	5	5	100	750-1700
861	8	4	50	400-1500
Total	33	29	-	-
Average	8.25	7.25	87.5	-

2. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวด้วยเทคนิค ISSR

จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยว จำนวน 55 พันธุ์ ด้วยเทคนิค ISSR พบว่า ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ย 0.82 สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม (Figure 1)

กลุ่มที่ 1 มี 32 พันธุ์ คือมะนาวเม็กซิกัน (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle) ซึ่งเป็นกลุ่มของมะนาวที่นิยมบริโภคในประเทศไทย 26 พันธุ์ และลูกผสมของมะนาวเม็กซิกัน คือ มะนาวตาฮิติ (*C. latifolia* (Yu.Tanaka) Tanaka) 5 พันธุ์ (Table 3) และ มะนาวสีชมพู 1 พันธุ์ ทั้ง 32 พันธุ์ ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกันนี้อาจเนื่องจาก มะนาวตาฮิติเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมของเลมอน (*C. limon* (L.) Osbeck) กับมะนาวเม็กซิกัน

(*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle) (Curk *et al.*, 2016) จึงทำให้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสำหรับมะนาวสีชมพู ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้อาจเนื่องมาจากการผสมพันธุ์ของมะนาวเม็กซิกัน กับส้มที่ให้เนื้อสีสีแดงจึงทำให้เนื้อมะนาวมีสีชมพู หรืออาจเป็นมะนาวเม็กซิกันที่ถูกตัดแต่งพันธุกรรมให้มีความสามารถในการสร้างสารแอนโทไซยานินได้ (Dutt *et al.*, 2016) สำหรับมะนาวตาฮิติเป็นมะนาวที่มีโครโมโซม 3 ชุด โดยได้โครโมโซม 1 ชุดจากเลมอน และได้โครโมโซม 2 ชุดจากมะนาวเม็กซิกัน (Curk *et al.*, 2016) ลักษณะสัณฐานวิทยาของผลมะนาวตาฮิติมีความยาวแบบผลเลมอน แต่เปลือกจะบางแบบมะนาวเม็กซิกัน เทคนิค ISSR ไม่สามารถบ่งบอกจำนวนชุดโครโมโซมได้ จึงทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างมะนาวเม็กซิกันออกจากมะนาวตาฮิติ

กลุ่มที่ 2 คือ citron (*Citrus. medica* L.) 5 พันธุ์ และลูกผสมของ citron คือ เลมอน 3 พันธุ์ (Table 3, Figure 1) และพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวอื่น ๆ คือ มะนาวหวาน, unknown, มะนาวหวานสีทองออสเตรเลีย มะนาวยักษ์ 1 และมะนาวยักษ์ 2 การที่เลมอนถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ citron เนื่องจาก เลมอนเป็นลูกผสมของ *C. aurantium* L. กับ *C. medica* L. จึงทำให้มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม จะเห็นได้จากการจัดกลุ่มของเลมอนเป็นกลุ่มย่อยแยกออกจากกลุ่มย่อยของ citron ขณะที่ citron ก็จะมี ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันเป็นกลุ่มย่อย นอกจากนี้ พืชสกุลส้มอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่มนี้ อาจเป็นลูกผสมของเลมอน citron หรือ *C. aurantium* L. จึงทำให้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (Figure 3)

กลุ่มที่ 3 คือ มะกรูด (kaffir lime; *C. hystrix* DC.) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะกรูดทั้ง 4 พันธุ์ ต่างกันโดย 1) kaffir lime เป็นมะกรูดที่มีลักษณะพบทั่วไปในประเทศ คือ กิ่งมีหนาม ใบมีขนาดกว้างประมาณ 2.5-5 ซม. ยาว 5-12 ซม. มีเมล็ด 2) seedless kaffir lime เป็นมะกรูดที่ไม่มีเมล็ด 3) thornless kaffir lime เป็นมะกรูดที่ไม่มีหนาม และ 4) small Leaf kaffir lime ใบมีขนาดเล็กกว่า Kaffir lime แต่ไพรเมอร์ทั้ง 4 ของเทคนิค ISSR นี้ ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะกรูดทั้ง 4 พันธุ์ได้ แต่อาจสามารถจำแนกได้ด้วยเทคนิคอื่น

นอกจากนี้ ยังมีส้มหลอดดูด (Somloddood ; *Citrus* sp.) และ ส้มจืด (Calamansi; *Citrus × microcarpa* Bunge) ที่ไม่ได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มใด แต่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มมะกรูด (กลุ่ม 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nicolosi *et al.* (2000) ที่ศึกษาในพืชสกุลส้มโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD sequence-characterized amplified regions (SCAR) และ chloroplast DNA (cpDNA) พบว่า *C. hystrix* DC. มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Fortunella* ซึ่ง *Citrus ×*

microcarpa เป็นลูกผสมของ *Citrus reticulata* กับ *Fortunella* (*C. japonica*) (Cheong *et al.*, 2012) และ ส้มหลอดดูด ก็อาจเป็น *C. reticulata* หรือลูกผสมของ *C. reticulata* แม้ว่า ส้มหลอดดูดและส้มจืดจะเป็นพืชสกุลส้มที่ให้รสชาติเปรี้ยว แต่สีเนื้อผิวเปลือกของส้มหลอดดูดและส้มจืดเมื่อแก่จัดจะให้สีส้ม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงพันธุกรรมที่ต่างออกไปจากมะนาวพันธุ์อื่น ๆ เมื่อผลแก่จัดเปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ดังเช่น ในมะกรูด มะนาว และเลมอน ทั้งนี้ Lu *et al.* (2011) ได้ศึกษาโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ พบว่า มะกรูดถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ citron แต่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับส้ม (*C. reticulata*) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ที่มะกรูดอยู่ใน node เดียวกับส้มหลอดดูด และส้มจืด เครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในการศึกษารังนี้ สามารถแสดงความสัมพันธ์ของส้มกับมะกรูดที่มีลักษณะปรากฏแตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดได้

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของมะนาวนิ้วมือ (finger lime; *C. australasica* F.Muell.) ที่มีถิ่นกำเนิดที่ทวีปออสเตรเลีย (Figure 1) ซึ่งมะนาวนิ้วมือ ถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกัน ถึงแม้แต่ละพันธุ์จะมีความแตกต่างของสีเนื้อของมะนาว คือ สีขาว เหลือง เขียว และชมพู การศึกษารังนี้ พบว่า มะนาวนิ้วมือมีพันธุกรรมความห่างไกลจากมะนาวกลุ่มอื่น ๆ มากที่สุด เนื่องจากมะนาวนิ้วมือเป็นมะนาวที่มีการวิวัฒนาการแยกจากพืชสกุลส้มอื่น ๆ ในยุค Pliocene (Wu *et al.*, 2018) เครื่องหมาย ISSR นี้สามารถแสดงความแตกต่างของ มะนาวนิ้วมือ 3 ออกจากมะนาวนิ้วมืออื่น ๆ ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุล Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) แยกมะนาวนิ้วมือ 3 ออกจากมะนาวนิ้วมือพันธุ์อื่น (Chuenwarin *et al.*, 2021) ทั้งนี้ ความแตกต่างของมะนาวนิ้วมือแต่ละพันธุ์ คือ สีของเนื้อมะนาวที่ต่างกัน และจากงานวิจัยที่ได้นำผลของมะนาวนิ้วมือสี

Table 3 The genetic relationships cluster of 55 accessions of lime and acid *Citrus* germplasms when ISSR markers was used for analysis

Cluster	Type	No. of accessions	Common name of lime and citrus
1	Mexican lime	26	Pan Banphaeo ¹ , Pan Rampai ² , Pan Sirinon ² , Khai Prachin ² , Lime Sunspine ² , Thornless Lime ² , Dokdubai ² , Pan Phokhun ² , Less Thorn Lime ³ , Maekaikhaidok ² , Pan Phichit ¹ , Pan Phichit 2 ² , Pan Phichit 4 ² , Pan Phichit 29 ² , Pan Jamrus 28 ² , Pan Jamrus 9 ² , Pan Sookprasert ² , Pan Yai ² , Pan Chaopraya ² , Praewa ² , Dokpiset ² , Pan Dankwian ² , Mae-lookdok ² , Pan Iamseng ² , Pan Malay ²
	Tahiti lime	5	Tahiti ² , Nampetch ² , Toonklao ² , ToonKklao Namhom ² , Petch Phongam ²
	Pink Lime	1	Pink Lime ²
2	Citron	5	Buddha's Hand Citron 1 ² , Buddha's Hand Citron 2 ² , Manow Phee ² , Pumpkin Lime 1 ² , Pumpkin Lime 2 ²
	Lemon	3	Lemon Eureka 1 ² , Lemon Eureka 2 ² , Lemon Hawaii ²
	Others	5	Sweet Lime ² , Manow Yak 1 ² , Manow Yak 2 ² , Australian Golden Sweet Lemon ² ,
3	Kafr lime	6	Kafr Lime ² , Seedless Kafr Lime ² , Thornless Kafr Lime ⁴ , Small Leaf Kafr Lime ⁴ , Somloddood ² , Calamansi ²
4	Finger lime	4	Fingerlime 1 ¹ , Fingerlime 2 ¹ , Fingerlime 3 ¹ , Fingerlime 4 ¹

Germplasm collection at : 1) Tropical Fruit Research and Development Center, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, 2) Ta Auan Farm, Lopburi, Thailand, 3) Chantaburi, 4) Kaffir Lime Farm

ต่าง ๆ มาวิเคราะห์สารประกอบทางเคมี พบว่า มะนาวนิ้วมือพันธุ์ที่ให้สีต่างกันนั้นมีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกัน ซึ่งความแตกต่างนี้เนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะนาวนิ้วมือ (Johnson *et al.*, 2022)

จากผลการศึกษา principal coordinate analysis (PCoA) ด้วยข้อมูลจีโนมของ Wu *et al.* (2018) พบว่า มะนาวเม็กซิกันและเลมอนอยู่กลุ่มเดียวกัน ซึ่งแยกออกจาก citron และส้มเช่นเดียวกับผลการศึกษาค้างนี้ที่พบว่า

มะนาวเม็กซิกันและเลมอนอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่สามารถแยกออกเป็นกลุ่มย่อยของมะนาวเม็กซิกันและเลมอนได้ แสดงให้เห็นว่า มะนาวเม็กซิกันและเลมอนมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาค้างนี้พบว่า citron เช่น ส้มมือ และมะนาวฟักทอง มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเลมอนมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับ Amar *et al.* (2011) ที่ใช้เทคนิค SSR, SRAP และ cleaved amplified polymorphic sequences single nucleotide polymorphism (CAPS-SNP)

พบว่า เลมอนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ citron ใน ขณะที่ Wu *et al.* (2018) จัดกลุ่มให้ citron แยก ออกไป การศึกษาของ Carvalho *et al.* (2005) และ Curk *et al.* (2016) สนับสนุนผลการศึกษา ครั้งนี้ที่พบว่า มะนาว มะนาวตาฮิติ เลมอน และ

citron มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน หรืออยู่ใน node เดียวกัน นอกจากนี้เครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในการ ศึกษาในครั้งนี้ สามารถแสดงความแตกต่าง ทางพันธุกรรมของเลมอน ส้มมือ, มะนาวฟักทอง และ มะนาวยักษ์ได้

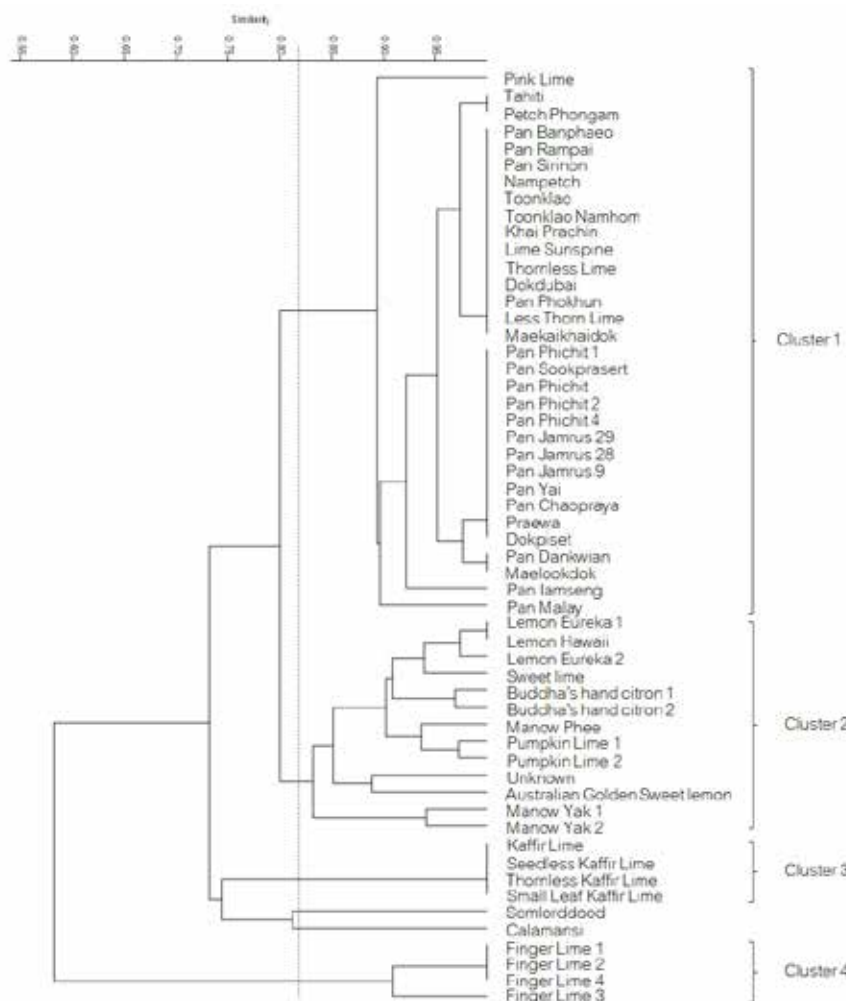


Figure 1 The unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram obtained from ISSR markers of acid *Citrus* spp. using PAST program

เครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในการ ศึกษาพบว่า กลุ่มย่อยของ เป้นบ้านแพ้ว, เป้นรำไพ, เป้นสิรินนท์, น้ำเพชรทูลเกล้า, ทูลเกล้าฯน้ำหอม, ไซปราชิน, lime sunspine, มะนาวไร้นาม, ดกดูไบ, เป้นฟอซุน, มะนาวหนามน้อย และ แม่ไก่

ไซดก มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกันอยู่สูง ซึ่ง กลุ่มนี้เป็นพันธุ์ที่มักจะมีความนิยมบริโภคมากกว่า เนื่องจากมีเปลือกบาง เมล็ดน้อย และมีกลิ่นหอม แตกต่างออกมาจากกลุ่มย่อยที่ประกอบด้วย เป้น พิจิตร, เป้นพิจิตร 1, เป้นพิจิตร 2, เป้นพิจิตร 4,

แป้นสุขประเสริฐ, แป้นจ้ำรัส9, แป้นจ้ำรัส28, แป้นจ้ำรัส 29, แป้นใหญ่, แป้นเจ้าพระยา, แพรวา และ ดกพิเศษ โดยมะนาวในกลุ่มนี้มักจะมีเปลือกที่หนากว่า และมีจำนวนเมล็ดมาก จากข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์มะนาวของประเทศไทยในอนาคต ให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเพิ่มขึ้น โดยอาจคัดเลือกพันธุ์ที่มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมาผสมเพื่อเพิ่มความหลากหลายของลักษณะคุณภาพผลมะนาว

3. การจำแนกมะนาวเม็กซิกันด้วย ISSR

จากการวิเคราะห์ผล ISSR primer 4 ตัวพบว่า ไพรเมอร์ 809, 810 และ 861 ไม่สามารถแสดงความแตกต่างในกลุ่มของมะนาวเม็กซิกัน 26 พันธุ์ได้ มีเพียงไพรเมอร์ 814 ที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมะนาวเม็กซิกันออกเป็น 2 กลุ่ม ตัวอย่างของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ 814 (Figure 2) โดยเครื่องมือ ISSR 814 ให้แถบดีเอ็นเอ 5 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 750-1700 bp สามารถใช้แบ่งกลุ่มมะนาวเม็กซิกัน 26 พันธุ์ออกเป็นสองกลุ่ม (Table 4) ซึ่งสามารถอธิบายได้จากลักษณะความแตกต่างของความหนาเปลือกและจำนวนเมล็ด ลักษณะของผล ทั้ง 2 อย่างนี้เป็นคุณภาพผลที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญอย่างมาก โดยมะนาวเม็กซิกันที่ให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบ A เป็นกลุ่มพันธุ์ที่ให้กลิ่นหอม มีเปลือกบาง ผลค่อนข้างเล็ก ขณะที่มะนาวที่ให้แถบดีเอ็นเอรูปแบบ B จะมีความหนาเปลือกของมะนาว ปริมาณเมล็ดที่มากกว่า และน้ำหนักผลมากกว่ากลุ่ม A และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 3, Table 4) นอกจากนี้ ในกลุ่ม B จะมีผิวเปลือกที่เห็นเป็นหลุมของต่อมน้ำมันมากกว่ากลุ่ม A

การพบเครื่องมือโมเลกุล ISSR primer 814 จะเป็นประโยชน์ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ เพราะเครื่องมือนี้สามารถจำแนกกลุ่มมะนาว

เม็กซิกันได้สองกลุ่ม ในกรณีที่ผสมพันธุ์มะนาวระหว่างกลุ่ม A และกลุ่ม B เครื่องหมายจะช่วยคัดเลือกลูกผสมได้นอกจากนี้ ยังอาจใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบถึงพันธุ์มะนาวที่มีอยู่ในปัจจุบัน เพื่อเกษตรกรจะได้มั่นใจว่าได้ถึงพันธุ์มะนาวตรงตามพันธุ์ที่ต้องการปลูก เนื่องจากต้นมะนาวที่ปลูกด้วยกิ่งตอนหรือกิ่งปักชำกว่าจะให้ผลผลิต ใช้เวลาประมาณ 1-2 ปี

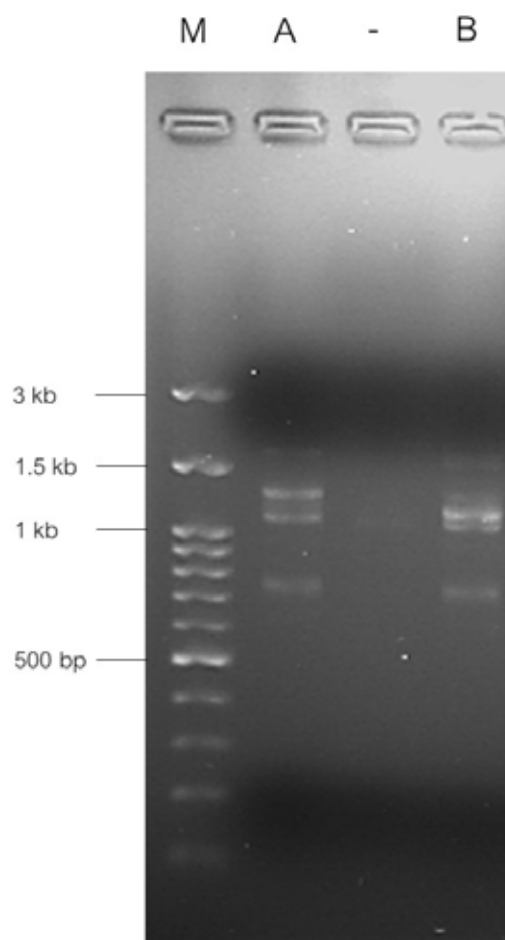


Figure 2 Band pattern of Mexican lime generated by ISSR 814 primer (M: DNA ladder), A: ISSR primer 814 pattern A, -: non using data, B: ISSR primer 814 pattern B)

Table 4 Group of Mexican lime distinguished by ISSR 814 primer with fruit weight, fruit rind thickness and seed numbers of fruits harvested from reproductive stage trees from Ta Auan Farm, Lopburi Province

Varieties name	Band pattern	Fruit weight (g)	Fruit rind thickness (mm)	Seed number
Pan Rampai	A	39.26	1.55	3.75
Pan Malay	A	-	-	-
Pan Banphaeo	A	57.60	1.58	11.9
Pan Dankwian	A	-	-	-
Pan Sirinon	A	39.78	1.74	-
Khai Prachin	A	-	-	-
Lime Sunspine	A	-	-	-
Maelookdok	A	-	-	-
Thornless Lime	A	34.11	1.40	-
Dokdubai	A	50.94	2.36	32
Pan Phokhun	A	-	-	-
Less Thorn Lime	A	-	-	-
Maekaikhaidok	A	-	-	-
Pan Sookprasert	B	-	-	-
Pan Phichit	B	-	-	-
Pan Phichit 1	B	65.99	2.85	-
Pan Phichit 2	B	51.94	2.20	-
Pan Phichit 4	B	47.38	2.39	24.75
Pan Jamrus 29	B	52.77	2.39	23
Pan Jamrus 28	B	55.37	2.49	33.6
Pan Jamrus 9	B	43.97	2.47	40
Pan Yai	B	57.02	2.13	27.25
Pan Chaopraya	B	75.87	2.59	51
Praewa	B	54.77	2.2	29.2
Dokpiset	B	47.45	2.21	17.29
Pan Iamseng	B	46.72	2.32	37.5

A and B pattern according to Figure 2

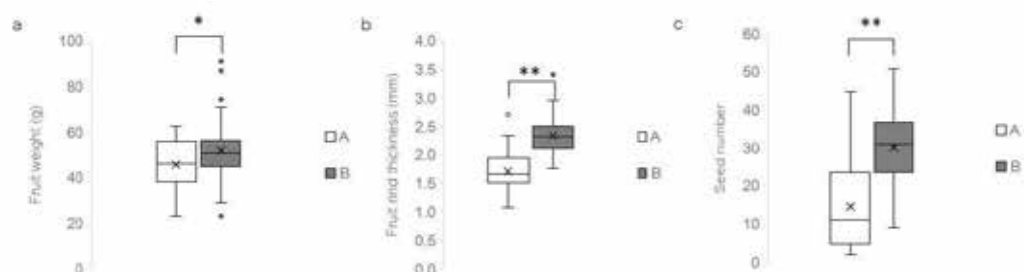


Figure 3 Box plots of fruit weight (g) (a) fruit rind thickness (mm) (b) and seed number (c) by ISSR primer 814 grouping (*= significant, ** = highly significant)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวด้วยเครื่องหมาย ISSR สามารถแบ่งกลุ่มมะนาวและพืชสกุลส้มที่ให้รสเปรี้ยวได้เป็น 4 กลุ่ม คือ 1) กลุ่ม maxican lime, tahiti lime และ pink lime 2) กลุ่ม citron และ lemon 3) กลุ่ม kaffir lime และ 4) กลุ่ม finger lime นอกจากนี้ เครื่องหมาย ISSR 1 ชนิด คือ primer 814 สามารถใช้ในการแบ่งกลุ่มมะนาวเม็กซิกันออกเป็น 2 กลุ่มย่อยได้ด้วย โดยมะนาวเม็กซิกันทั้ง 2 กลุ่มนี้มีลักษณะที่ต่างกันคือ น้ำหนักผล ความหนาเปลือก และจำนวนเมล็ด ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์อาจนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ในระหว่างการปรับปรุงพันธุ์ หรืออาจนำไปใช้เป็นเครื่องหมายเพื่อคัดกรองพันธุ์มะนาวให้ถูกต้องตามพันธุ์เพื่อความมั่นใจของเกษตรกรได้

คำขอบคุณ

ผลการวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยบางส่วนจากภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และทุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และขอขอบคุณ คุณวรชาติ กรีประกอบ เจ้าของสวนมะนาวฟาร์มตาอ้วน ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างมะนาวพันธุ์ต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

- วสรณ พ้องสมบูรณ์. 2558. การปรับปรุงพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตมะนาว. รายงานโครงการวิจัย. กรมวิชาการเกษตร. พิธีตร. 96 หน้า.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2560. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: มะนาว. ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551, กรุงเทพฯ. 9 หน้า.
- Amar, M.H., M.K. Biswas, Z. Zhang and W.W. Guo. 2011. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of Citrus germplasm collection. *Sci. Hortic.* 128(3): 220-227.
- Biswas, M.K., Q. Xu and X.X. Deng. 2010. Utility of RAPD, ISSR, IRAP, and REMAP markers for the genetic analysis of *Citrus* spp. *Sci. Hortic.* 124(2): 254-261.
- Carvalho, R., W.S. Soares Filho, A.C. Brasileiro Vidal and M. Guerra. 2005. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet. Genome Res.* 109 (1-3): 276-282.
- Cheong, M.W., Z.S. Chong, S.Q. Liu, W.B. Zhou, P. Curran and B. Yu. 2012. Characterisation of calamansi (*Citrus microcarpa*). Part I: volatiles, aromatic profiles and phenolic acids in the peel. *Food Chem.* 134(2): 686-695.
- Chuenwarin, P., S. Wiphuwathinee, R. Bowonchaikittikun, R. Chuenjit, W. Srinual, S. Napa, W. Imsabai and A. Auvuchanon. 2021. Genetic and morphological diversity analysis of lime and acidic *Citrus* spp. from two germplasm collections in Thailand. *Agri. Nat. Resour.* 55(4): 589-600.
- Curk, F., F. Ollitrault, A. Garcia-Lor, F. Luro, L. Navarro and P. Ollitrault. 2016. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Ann. Bot.* 117(4): 565-583.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19(1): 11-15.
- Dutt, M., D. Stanton and J.W. Grosser. 2016. Ornacitrus: Development of genetically modified anthocyanin-expressing citrus with both ornamental and fresh fruit potential. *J. Am. Society Hort. Sci.* 141(1): 54-61.

- Johnson, J.B., R. Batley, D. Manson, S. White and M. Naiker. 2022. Volatile compounds, phenolic acid profiles and phytochemical content of five Australian finger lime (*Citrus australasica*) cultivars. *LWT-Food Sci. and Technol.* 154: 112640.
- Lu, Z.H., Z.Q. Zhou and R.J. Xie. 2011. Molecular phylogeny of the True Citrus Fruit Trees group (Aurantioideae, Rutaceae) as inferred from chloroplast DNA sequence. *Agricultural Sciences in China*. 10(1): 49-57.
- Nicolosi, E., Z.N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella and E. Tribulato. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155-1166.
- Wu, G.A., J. Terol, V. Ibanez, A. Lopez-Garcia, E. Prez-Romn, C. Borred, C. Domingo, F.R. Tadeo, J. Carbonell-Caballero, R. Alonso, F. Curk, D. Du, P. Ollitrault, M.L. Roose, J. Dopazo, F.G. Gmitter Jr, D.S. Rokhsar and M. Talon. 2018. Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*. 554(7692): 311-316.