

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ส้มสีทองน่าน
เพื่อการอนุรักษ์และจัดการพันธุกรรม

Genetic Variation of Geographical Indication Plant, Nan Golden Orange
for Conservation and Genetic Management

เชาวลีย์ ใจสุข^{1*}, สุภาวดี ศรีแย้ม¹, ภาณุพงศ์ สิทธิวุฒิ¹, อภิรยา เทพสุคนธ์¹, ปราโมทย์ ทิมขำ¹ และพัชรา นิธิโรจน์ภักดี²

Chaowalee Jaisuk^{1*}, Supawadee Sriyam¹, Panupong Sitiwut¹, Apiraya Thepsukhon¹

Pramoth Timkhum¹ and Patchara Nithirojpakdee²

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตน่าน น่าน 55000

²คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี จันทบุรี 22210

¹Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna Nan Campus, Nan, Thailand 55000

²Faculty of Argo-Industrial Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-Ok Chanthaburi Campus

Chanthaburi, Thailand 22210

*Corresponding author: chaowalee2009@hotmail.com

Received: May 01, 2021

Revised: March 12, 2022

Accepted: May 31, 2022

Abstract

Nan Golden Orange is a geographic indication plant of Nan province. It is also an important economic crop. Having information on the genetic variation of Nan Golden Orange will be of conservation benefit and genetic management, valuable to plan more proficient breeding programs. The genetic variation was evaluated from 5 groups of Nan Golden Orange leaflets (30 samples in each group), which were collected from 1. original Nan Golden Orange propagate vegetatively (G1) 2. seed grown from original Nan Golden Orange (G2) 3. Nan Golden Orange farm (A) 4. Nan Golden Orange farm (B) 5. Nan Golden Orange farm (C). These samples were investigated by 5 microsatellite loci. The number of alleles per locus (A) ranged from 5.00-5.40, allelic richness (A_r) extended from 4.79-5.07 alleles, observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.92-0.97, effective population size (N_e) was small in the sample B. The bottleneck was found in sample G2. Genetic differences (pairwise F_{ST}) were found in samples G1, G2, B, and C. Consistent with the dendrogram, sample G1 was different from other samples. The genetic distance was the highest between G1 and B (0.166). The genetic variations in the Nan Golden Orange were the result of management which demonstrated the importance of conservation

and genetic management. Understanding good propagation practices for preserving genetic diversity will help maintaining the quality of the Nan Golden Orange in order to be conform with the quality of geographic indication.

Keywords: genetic variation, geographical indication, Nan Golden Orange, *Citrus reticulata*

บทคัดย่อ

ส้มสีทองน่าน เป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดน่าน การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของส้มสีทองน่านเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และการจัดการพันธุกรรม จากการรวบรวมตัวอย่างยอดอ่อนส้มสีทองน่านจากพื้นที่ปลูกส้มในจังหวัดน่าน 5 กลุ่มตัวอย่าง (30 ตัวอย่างต่อกลุ่ม) ได้แก่ 1. ส้มกิ่งตอนน่านดั้งเดิม (G1) 2. ส้มที่เกิดจากเพาะเมล็ดส้มน่านดั้งเดิม (G2) 3. สวนส้มสีทอง (A) 4. สวนส้มสีทอง (B) 5. สวนส้มสีทอง (C) พบความหลากหลายรูปแบบของไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง กลุ่มตัวอย่างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (A) อยู่ระหว่าง 5.00-5.40 แอลลีล ค่า allelic richness (A_r) 4.79-5.07 แอลลีล และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) 0.92-0.97 จำนวน effective population size (N_e) มีน้อยในกลุ่มตัวอย่าง B สภาวะคอขวดพบได้ในกลุ่มตัวอย่าง G2 พบความต่างทางพันธุกรรม (pairwise F_{ST}) ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง G1 กับ G2, B และ C แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกลุ่มตัวอย่าง G1 ถูกจัดเป็นกลุ่มที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกลุ่มอื่น ระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่ามากที่สุดระหว่าง G1 กับ B (0.166) การพบความแปรปรวนทางพันธุกรรม จำนวน N_e ที่น้อยและพบสภาวะคอขวดในบางกลุ่มตัวอย่างเป็นผลมาจากการจัดการพันธุกรรม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการมีแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมและการสร้างความเข้าใจถึงแนวทางการขยายพันธุ์ที่ดีเพื่อการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่จะช่วยคงคุณภาพส้มสีทองน่านให้เป็นไปตามคุณลักษณะที่ดีของการเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์

คำสำคัญ: ความแปรปรวนทางพันธุกรรม สิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ ส้มสีทองน่าน *Citrus reticulata*

คำนำ

ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata* Blanco) เป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ ปลูกในทุกภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะภาคเหนือซึ่งมีอากาศหนาวเย็นช่วยให้ผิวมีสีเหลืองส้มมากขึ้น ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกส้มเขียวหวานทั้งสิ้น 101,633 ไร่ ภาคเหนือมีพื้นที่ปลูกมากที่สุด 96,958 ไร่ ที่จังหวัดเชียงใหม่สูงสุด 27,767 ไร่ รองลงมาคือ กำแพงเพชร สุโขทัย และเชียงราย (Office of Agricultural Economics, 2018) ส้มเขียวหวานส่วนใหญ่มีผลเป็นสีเขียวในขณะที่ส้มเขียวหวานของจังหวัดน่านผิวเป็นสีเหลืองทองจึงเป็นที่รู้จักในชื่อส้มสีทองน่าน (Nan Golden Orange) ในปี พ.ศ. 2556 ได้มีการส่งเสริมให้มีการพัฒนาพืชท้องถิ่นชนิดพันธุ์ที่มีความพิเศษต่อพื้นที่ ส้มสีทองน่านเป็นหนึ่งในพืชที่ได้รับการส่งเสริมและขึ้นทะเบียนให้เป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (Geographical Indications; GI) เลขทะเบียน สข56100054 (Intellectual Property Department, 2013) และผลักดันให้เป็นพืชเศรษฐกิจของจังหวัดขึ้นมามีอีกครั้ง จึงมีเกษตรกรให้ความสนใจปลูกส้มสีทองน่านมากขึ้น การดำเนินงานในส่วนของการพัฒนาเพื่อส่งเสริมการปลูกโดยการเพิ่มพื้นที่ปลูกเป็นไปอย่างต่อเนื่องซึ่งเป็นแนวทางที่สำคัญในการเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ทั้งนี้ในการส่งเสริมการปลูกยังมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่หน่วยงานของรัฐต้องเข้ามามีส่วนให้ความช่วยเหลือในการคัดเลือกต้นพันธุ์ที่มีคุณภาพทั้งลักษณะ

ทางคุณภาพและทางปริมาณ เพื่อประสิทธิภาพการคัดพันธุ์ที่ดี หากมีข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมและข้อมูลผลผลิตของต้นพันธุ์ประกอบการตัดสินใจในการเลือกต้นพันธุ์ที่เหมาะสมจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินงานขยายพันธุ์และเพาะปลูก แต่ในปัจจุบันข้อมูลพันธุกรรมสัมพันธ์ของนานมีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นการพัฒนาข้อมูลเชิงวิชาการเกี่ยวกับระดับพันธุกรรมควรได้รับการศึกษาเพื่อคงไว้ซึ่งพันธุ์สัมพันธ์ของนานที่มีคุณภาพต่อไป

การศึกษาระดับพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์สามารถใช้ประโยชน์ในการประเมินพันธุกรรมระดับครอบครัวของสิ่งมีชีวิตได้ และด้วยข้อกำหนดการเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ที่กำหนดการพิสูจน์แหล่งของสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์คือ แหล่งพันธุ์และแหล่งปลูกสัมพันธ์ของนานต้องอยู่ในพื้นที่จังหวัดน่าน โดยกระบวนการผลิตต้องผ่านการควบคุมตรวจสอบ และสมาชิกเกษตรกรผู้ปลูกต้องขึ้นทะเบียนรวมทั้งต้องมีหลักฐานกำกับเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับ ดังนั้นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมของสัมพันธ์ของนานจึงมีประโยชน์ทั้งในส่วนของการเพิ่มประสิทธิภาพการคัดพันธุ์เพื่อส่งเสริมการเพาะปลูก การอนุรักษ์แหล่งพันธุ์และการตรวจสอบแหล่งพันธุ์กรรมตามข้อกำหนดของสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

รวบรวมตัวอย่างภาคสนาม

รวบรวมตัวอย่างยอดอ่อนสัมพันธ์จากพื้นที่ปลูกสัมพันธ์จังหวัดน่านจำนวน 5 กลุ่มตัวอย่าง ละ 30 ตัวอย่าง ได้แก่ 1) สัมถึงตอนน่านดั้งเดิม (G1) 2) สัมที่เกิดจากเพาะเมล็ดสัมพันธ์ดั้งเดิม (G2) ทั้งกลุ่ม 1 และ 2 รวบรวมจากสวนสัมพันธ์ในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านน่าน ตำบลฝายแก้ว อำเภอภูเพียง จังหวัดน่าน เป็นพื้นที่ที่ได้รับมอบหมายให้ปลูกสัมพันธ์ของนานเพื่อเป็นแหล่งพันธุ์ดูแลสวนแบบเกษตรปลอดภัย ขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งที่พิจารณาจากต้นพันธุ์ที่สมบูรณ์ ไม่มีโรค 3) สวนสัมพันธ์

อำเภอทุ่งช้าง จังหวัดน่าน ดูแลสวนแบบเกษตรปลอดภัยซื้อต้นพันธุ์จากแหล่งอื่นและขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งจากต้นที่สมบูรณ์และไม่มีโรคภายในสวน (A) 4) สวนสัมพันธ์อำเภอทุ่งช้าง จังหวัดน่าน ดูแลสวนแบบเกษตรอินทรีย์ไม่ซื้อต้นพันธุ์จากแหล่งอื่น ขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งจากต้นที่สมบูรณ์และไม่มีโรคภายในสวน (B) 5) สวนสัมพันธ์อำเภอทุ่งช้าง จังหวัดน่าน ดูแลสวนสัมพันธ์ของนานแบบเกษตรอินทรีย์ ซื้อต้นพันธุ์จากแหล่งอื่นและขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งจากต้นที่สมบูรณ์และไม่มีโรคภายในสวน (C)

การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ โดยวิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ และย้อมด้วยเทคนิค Silver staining มีขั้นตอนดังนี้

1. สกัดดีเอ็นเอจากยอดอ่อนสัมพันธ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอพีช (Qiagen) วัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคอเล็กโทรฟอริซิสบนอะกาโรสเจล 1% ด้วยเครื่องอเล็กโทรฟอริซิสแบบนอน (BIO-RAD SubcellGT, Italy) และผ่านกระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสารถย้อมดีเอ็นเอ (FluoroVue Nucleic Acid Gel Stain, SMOBIO, Malaysia) เทียบปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2. เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) บริเวณไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ GB-CU-098, GB-CU-125, GB-CU-096 (Elcy *et al.*, 2012), AC01 และ CT19 (Barakley *et al.*, 2006) ด้วยสารละลายพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร), 1X บัฟเฟอร์, นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 0.2 มิลลิโมล, แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) 1.5 มิลลิโมล, ไพรมเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.2 ไมโครโมล และ Taq Polymerase 0.12 ไมโครลิตร (ExcelTaq, SMOBIO, Malaysia; 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

ด้วยเครื่อง Thermal cycle (BioRad, MJ Mini Cycler, Italy) มีวัฏจักรพีซีอาร์ 5 วัฏจักร คือ 1) อุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (Denaturation) 94°C. 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2) อุณหภูมิ 94°C. นาน 30 วินาที อุณหภูมิที่ไพรเมอร์มาเกาะกับสายดีเอ็นเอตั้งต้น (Annealing temperature; Ta) สำหรับทั้ง 5 ไพรเมอร์ คือ อุณหภูมิ 52°C. นาน 30 วินาที และอุณหภูมิที่ Taq Polymerase สามารถซ่อมสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์เป็นดีเอ็นเอเส้นใหม่ (Extension temperature) 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 3) อุณหภูมิ 72°C. นาน 5 นาที

3. แยกผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่าน 6% Denaturing polyacrylamide gel ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแนวตั้ง (SCIE-PLAS SEQ3341, United Kingdom) ในบัฟเฟอร์ 1XTBE ผ่านกระแสไฟฟ้า 1,200 โวลต์ เป็นเวลา 3.30 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอที่แยกขนาดแล้วด้วยเทคนิค Silver staining (Promega, USA) โดยดีเอ็นเอจับกับซิลเวอร์ไนเตรต (Silver nitrate) เป็นแถบสีน้ำตาลเข้มที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า วัดขนาดของแอลลิล (Base pair, bp) บนแผ่นเจลที่แต่ละตำแหน่ง โดยเทียบกับตำแหน่งที่แน่นชัดของลำดับเบสของ pGEM-3Zf (+) Vector (Promega, USA) บันทึกจีโนไทป์ของแต่ละตัวอย่าง

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร โดยคำนวณค่าความถี่ของแอลลิล (Allele frequency) ในแต่ละตำแหน่งของประชากร ด้วยโปรแกรม GenAEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) จำนวนแอลลิลต่อตำแหน่ง (number of alleles per locus, A) ค่า Effective number of allele (A_e) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (Heterozygosity) และค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficients) โดยใช้โปรแกรม GenAEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) คำนวณค่า Allelic Richness (A_r) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version

2.9.3 (Goudet, 2001) เปรียบเทียบระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมจากค่า A_r ระหว่างกลุ่มตัวอย่างโดยวิธี Mann-Whitney U

2. การทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ของความถี่จีโนไทป์ที่แต่ละตำแหน่งภายในประชากร โดยการประเมินค่า Exact p-value ด้วยวิธี Markov chain ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per batch = 1000) ในโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p -value) สำหรับการใช้อัลโมลิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (Multiple tests) ด้วยวิธี Bonferroni correction (Rice, 1989)

3. ประเมินจำนวน Effective population size (N_e) โดยโปรแกรม NeEstimator version 2.01 (Do *et al.*, 2014)

4. ประเมินการมีสถานะคอขวดในกลุ่มตัวอย่าง โดยโปรแกรม Bottleneck version 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999)

5. ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Analysis of Molecular Variance; AMOVA) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างประชากรเทียบกับความแปรปรวนภายในประชากร ทดสอบค่าสถิติ Φ_{ST} ระหว่างคู่ตัวอย่าง โดยโปรแกรม ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier and Lischer, 2010) ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ด้วยโปรแกรม GenAEx version 6.1 (Peakall and Smouse, 2006) ค่าความต่างทางพันธุกรรม (Genetic differentiation) ทดสอบความแตกต่างของความถี่แอลลิลของแต่ละประชากรโดย Exact test ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per batch = 1000) ในโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2008) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p -value) สำหรับการใช้อัลโมลิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง

(Multiple test) ด้วย Bonferroni correction (Rice, 1989) และสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei's genetic distances) ด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) จากโปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999)

ผลการวิจัย

ความหลากหลายภายในประชากรของกลุ่มตัวอย่าง

พบความหลากหลายรูปแบบของเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ 5 ตำแหน่ง โดยมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (A) เฉลี่ยรวมทั้ง 5 กลุ่มตัวอย่างที่ตำแหน่ง GB-CU-096, GB-CU-098, GB-CU-125, AC01 และ CT19 เท่ากับ 5, 6, 5, 5.2 และ 4.2 แอลลีล ตามลำดับ โดยแต่ละกลุ่มตัวอย่างมีค่าเฉลี่ยดังนี้ กลุ่มตัวอย่างส้มกิ่งตอน นานดั้งเดิม G1 พบมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (A) 5 ± 1.22 แอลลีล ค่า Effective number of allele (A_e) 2.97 ± 0.51 แอลลีล ค่า Allelic richness (A_r) 4.99 ± 0.21 แอลลีล ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (Observed heterozygosity: H_o) 0.97 ± 0.05 และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการค่าคาดหวัง (Expected heterozygosity: H_e) 0.66 ± 0.06 และมีค่า Fixation Index (F_{is}) -0.48 ± 0.07 กลุ่มตัวอย่างต้นส้มที่เกิดจากเพาะเมล็ดจากส้มนานดั้งเดิม G2 พบมี A 5 ± 1.22 แอลลีล ค่า A_e 3.90 ± 0.94 แอลลีล ค่า A_r 5.00 ± 1.22 แอลลีล ค่า H_o 0.93 ± 0.10 และค่า H_e 0.73 ± 0.09 และมี F_{is} -0.28 ± 0.14 กลุ่มตัวอย่าง A พบมีค่า A 5.00 ± 0.71 แอลลีล ค่า A_e 3.46 ± 1.20 แอลลีล ค่า

A_r 4.97 ± 0.71 แอลลีล ค่า H_o 0.96 ± 0.03 และค่า H_e 0.69 ± 0.09 และมีค่า F_{is} -0.41 ± 0.18 กลุ่มตัวอย่าง B พบมีค่า A 5.40 ± 0.55 แอลลีล ค่า A_e 3.49 ± 0.43 แอลลีล ค่า A_r 5.38 ± 0.53 แอลลีล ค่า H_o 0.93 ± 0.05 และค่า H_e 0.71 ± 0.03 และมี F_{is} -0.31 ± 0.10 กลุ่มตัวอย่าง C พบมี A 5.00 ± 0.71 แอลลีล ค่า A_e 3.70 ± 1.07 แอลลีล ค่า A_r 4.99 ± 0.71 แอลลีล ค่า H_o 0.92 ± 0.05 และค่า H_e 0.71 ± 0.08 และมีค่า F_{is} -0.31 ± 0.17 (Table 1) จากดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่กล่าวมาข้างต้นพบว่ากลุ่มตัวอย่างส้มสีทองนานจากทั้ง 5 กลุ่มตัวอย่างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันเมื่อนำค่า A_r เรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ 5.38 ± 0.53 (B), 5.00 ± 1.22 (G2), 4.99 ± 0.71 (C), 4.99 ± 0.21 (G1) และ 4.97 ± 0.71 (A) ซึ่งเมื่อทดสอบความแตกต่างของความหลากหลายทางพันธุกรรมจากค่า A_r โดยวิธี Mann-Whitney U-Test พบว่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างส้มสีทองทั้ง 5 กลุ่มตัวอย่างมีความหลากหลายไม่ต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) การทดสอบความเบี่ยงเบนของสัดส่วนจีโนไทป์ที่สังเกตได้กับค่าที่คาดหวังตามสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ด้วยวิธี Markov chain และปรับระดับความน่าจะเป็นด้วย Bonferroni correction ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง พบการไม่อยู่ในสมดุลในทั้ง 5 กลุ่มตัวอย่างที่ทุกตำแหน่ง ซึ่งการออกจากสมดุลเป็นการมีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการคาดหวัง (H_e) น้อยกว่าค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (H_o) และที่ทุกตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ในทั้ง 5 กลุ่มตัวอย่างเบี่ยงเบนออกจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

Table 1 Average allelic variability at five microsatellite loci of Nan Golden Orange, Nan province

Samples	G1	G2	A	B	C	Average
<i>N</i>	30.00±0.00	29.60±0.55	30.00±0.00	30.00±0.00	29.40±0.89	29.80±0.50
<i>A</i>	5.00±1.22	5.00±1.22	5.00±0.71	5.40±0.55	5.00±0.71	5.08±0.86
<i>A_e</i>	2.97±0.51	3.90±0.94	3.46±1.20	3.49±0.43	3.70±1.07	3.50±0.87
<i>A_r</i>	4.99±0.21	5.00±1.22	4.97±0.71	5.38±0.53	4.99±0.71	5.07±0.86
<i>H_o</i>	0.97±0.05	0.93±0.10	0.96±0.03	0.93±0.05	0.92±0.05	0.94±0.06
<i>H_e</i>	0.66±0.06	0.73±0.09	0.69±0.09	0.71±0.03	0.71±0.08	0.70±0.07
<i>F_{is}</i>	<u>-0.48±0.07</u>	<u>-0.28±0.14</u>	<u>-0.41±0.18</u>	<u>-0.31±0.10</u>	<u>-0.31±0.17</u>	<u>-0.36±0.15</u>

The indices included the number of samples in each group (*N*), number of alleles per locus (*A*), effective number of alleles (*A_e*), allelic richness (*A_r*), observed heterozygosity (*H_o*), expected heterozygosity (*H_e*), fixation index (*F_{is}*) (*F_{is}* values and probability of significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium are given for each population. Values underlined indicate statistical significance, $p < 0.002$, after Bonferroni correction = 0.05/25)

การประเมินจำนวน Effective population size (*N_e*) พบกลุ่มตัวอย่าง G1 มีจำนวนมากเกินการประเมิน (Infinite) (Infinite–Infinite) กลุ่มตัวอย่าง G2 มี 53.4 (16.1–Infinite) กลุ่มตัวอย่าง A มี 51.4 (16.3–Infinite) กลุ่มตัวอย่าง B มี 11.7 (6.1–23.4) และกลุ่มตัวอย่าง C มี Infinite (67.5–Infinite) การมีสภาวะคอขวด (Bottlenecks) พบได้ในกลุ่มตัวอย่าง G2 (p -value<0.05) (Table 2)

Table 2 Estimates and 95% confidence intervals of contemporary effective population size (*N_e*), and the detection of bottlenecks based on Wilcoxon's test for five population samples at five microsatellite loci

Samples	Effective population size (<i>N_e</i>)			Bottleneck test
	<i>N_e</i>	Lower bound	Upper bound	TPM (<i>P</i> -value)
G1	Infinite	Infinite	Infinite	0.812
G2	53.4	16.1	Infinite	0.031
A	51.4	16.3	Infinite	0.156
B	11.7	6.1	23.4	0.094
C	Infinite	67.5	Infinite	0.094

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

กลุ่มตัวอย่างส้มสีทองน่านมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ค่า $Global F_{ST} = 0.01559$; AMOVA, $p=0.0000$) การทดสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม AMOVA พบว่า 1.56% ของความแปรปรวนเกิดจากความแตกต่างระหว่างประชากร และ 98.44% ของความแปรปรวนที่เกิดจากความแตกต่างระหว่างสมาชิกในประชากร เมื่อวิเคราะห์ความต่างระหว่างคู่ของกลุ่มตัวอย่างจากค่า pairwise F_{ST} ที่ระดับ $p<0.005$ พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง G1 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับกลุ่ม G2 กลุ่ม B และกลุ่ม C แต่ไม่ต่างจากกลุ่ม A ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างอื่นๆ มี

พันธุกรรมไม่ต่างกัน (Table 3) สำหรับการทดสอบระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของกลุ่มตัวอย่างมีค่าจากมากไปน้อยได้ดังนี้ 0.166 (G1:B), 0.141 (G1:G2), 0.110 (G1:C), 0.064 (B:C), 0.06 (G2:A), 0.055 (B:A), 0.048 (G2:B), 0.046 (G2:C), 0.043 (G1:A) และ 0.037 (A:C) (Table 3) แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมพบว่า ส้มสีทองน่าน 5 กลุ่มตัวอย่างถูกจัดออกเป็น กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มตัวอย่าง A และ C กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มตัวอย่าง G2 และ B ซึ่ง 2 กลุ่มย่อยนี้สามารถจัดเป็นกลุ่มเดียวกันได้ในขณะที่กลุ่มตัวอย่าง G1 ถูกจัดเป็นกลุ่มที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกลุ่มอื่น (Figure 1)

Table 3 Pairwise F_{ST} values (lower diagonal) and genetic distance (upper diagonal) among Nan Golden Orange

Samples	G1	G2	B	A	C
G1		0.141	0.166	0.043	0.110
G2	<u>0.04262</u>		0.048	0.060	0.046
B	<u>0.05179</u>	0.00168		0.055	0.064
A	0.00398	0.00834	0.00644		0.037
C	<u>0.03229</u>	0.00031	0.00751	-0.00096	

Values underlined indicate statistical significance ($p<0.005$, P-values adjusted for multiple comparisons using Bonferroni correction = 0.05/10)

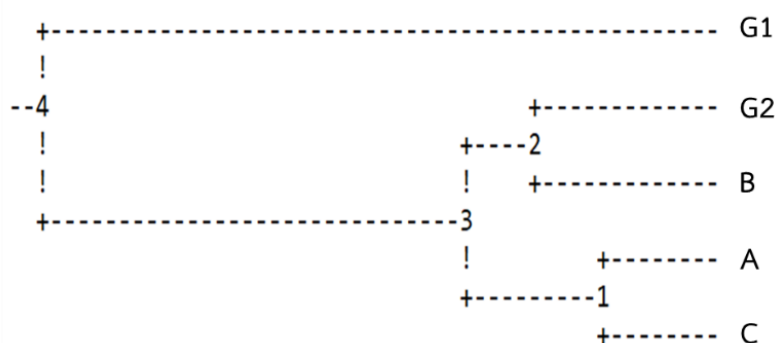


Figure 1 Dendrogram of five population samples of Nan Golden Orange

วิจารณ์ผลการวิจัย

ความหลากหลายรูปแบบของเครื่องหมายพันธุกรรม

พบความหลากหลายรูปแบบของเครื่องหมายในกลุ่มตัวอย่างส้มสีทองน่าน (*C. reticulata* Blanco) โดยมีจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งเฉลี่ยรวมทั้ง 5 กลุ่มตัวอย่างที่ตำแหน่ง GB-CU-096, GB-CU-098, GB-CU-125, AC01 และ CT19 เท่ากับ 5, 6, 5, 5.2 และ 4.2 แอลลีล ซึ่งมีค่าจำนวนแอลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งที่ทุกตำแหน่งรวมทั้ง 5 กลุ่มตัวอย่างเป็น 5.08 ± 0.86 แอลลีล เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Elcy *et al.* (2012) ในส้ม Lima Madu (*C. reticulata* Blanco) จำนวน 118 ตัวอย่าง พบมีจำนวนแอลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง 5.227 แอลลีล ที่ตำแหน่ง GB-CU-096 มี 9 แอลลีล และ ค่า H_o เท่ากับ 0.873, ตำแหน่ง GB-CU-098 มี 5 แอลลีล และค่า H_o เท่ากับ 0.966 และตำแหน่ง GB-CU-125 มี 10 แอลลีล และค่า H_o เท่ากับ 0.983 ตามลำดับ และ Barkley *et al.* (2006) ศึกษาในพืชตระกูลส้ม (*Citrus*) จำนวน 370 ตัวอย่าง พบมีจำนวนแอลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง 11.5 แอลลีล โดยที่ตำแหน่ง CT19 มี 14 แอลลีล และค่า H_o เท่ากับ 0.619 และที่ AC01 มี 15 แอลลีล และค่า H_o เท่ากับ 0.130 จากข้างต้นการศึกษานี้พบจำนวนแอลลีลที่เครื่องหมายแต่ละตำแหน่งน้อยกว่าในการศึกษาอื่น

อาจเป็นผลมาจากจำนวนสายพันธุ์ส้ม จำนวนตัวอย่างและขนาดพื้นที่ในการรวบรวมตัวอย่าง โดยการศึกษาครั้งนี้ศึกษาส้ม 1 ชนิด จำนวน 150 ตัวอย่าง พื้นที่รวบรวมตัวอย่างประมาณ 100 กิโลเมตร ในขณะที่ Barkley *et al.* (2006) ศึกษาพืชตระกูลส้มจำนวน 370 ตัวอย่าง การศึกษาของ Elcy *et al.* (2012) ศึกษาส้ม 1 ชนิด จำนวน 118 ตัวอย่าง รวบรวมส้มมาจากหลายแหล่งและครอบคลุมพื้นที่กว้างมากกว่า 500 กิโลเมตร

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

กลุ่มตัวอย่างส้มสีทองน่านที่รวบรวมมาจาก 5 กลุ่ม มีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มใกล้เคียงกันและไม่ต่างทางสถิติ ค่าเฉลี่ยรวมของส้มสีทองน่านที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดน่านมีค่า A_r เท่ากับ 5.08 ± 0.86 , ค่า H_o เท่ากับ 0.94 ± 0.06 และค่า H_e เท่ากับ 0.70 ± 0.07 ค่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบจากตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 150 ตัวอย่างและจากเครื่องหมายพันธุกรรม 5 ตำแหน่ง เป็นระดับที่มีความหลากหลายใกล้เคียงกับส้มชนิดอื่น เช่น ในส้ม Limau Madu (*C. reticulata* Blanco) จำนวน 118 ต้นที่ปลูกในประเทศมาเลเซีย ศึกษาโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 22 ตำแหน่ง มีค่าเฉลี่ยจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง 2-10 แอลลีล และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.227 แอลลีล, ค่า H_o

อยู่ระหว่าง 0.051-1.00 และมีค่าเฉลี่ย H_o เท่ากับ 0.511 (Ely *et al.*, 2012) สัมสืทองน่านยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Barkley *et al.* (2006) ที่พบว่าพืชตระกูลส้มจำนวน 370 ตัวอย่าง ศึกษาโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 24 ตำแหน่งพบจำนวนแอลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ระหว่าง 3-30 แอลลิล และมีค่าเฉลี่ยโดยรวมของค่า H_o เท่ากับ 0.4318

สำหรับการพบจำนวน N_e ที่ค่อนข้างน้อยในกลุ่มตัวอย่าง B ทำให้เกิดข้อสังเกตถึงกระบวนการจัดการสวนของกลุ่มตัวอย่างนี้ ที่พบว่าเกษตรกรมีการจัดการต้นพันธุ์โดยการตอนกิ่งจากต้นพันธุ์ภายในสวนเท่านั้นไม่มีการซื้อจากแหล่งอื่น จากการลงพื้นที่สวนเกษตรกรสังเกตพบว่าต้นส้มที่ถูกเลือกเป็นต้นพันธุ์ที่สมบูรณ์และไม่เป็นโรค ซึ่งต้นพันธุ์ 1 ต้นจะถูกตอนกิ่งจำนวนหลายกิ่งและกิ่งเหล่านั้นจะถูกนำมาปลูกทดแทนในรอบการปลูกต่อไป จึงอาจเป็นไปได้ว่าการที่กลุ่มตัวอย่าง B มีจำนวน N_e ที่น้อยแสดงถึงโอกาสที่ประชากรของกลุ่มตัวอย่าง B จะมีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีลดลงหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่แอลลิลที่เป็นผลมาจากการขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) (Allendorf and Luikart, 2007) เช่นเดียวกับการพบสถานะคอขวดในตัวอย่าง G2 ที่แสดงถึงประชากรจำนวนจำกัด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากประวัติการปลูกในระยะเริ่มต้นได้มีการรวบรวมกิ่งพันธุ์ที่ได้จากการตอนส้มสืทองน่านดั้งเดิมซึ่งปลูกจากกิ่งตอนที่ยังคงมีอยู่ คือกลุ่มตัวอย่าง G1 ในการศึกษา นี้ โดยได้รับการสนับสนุนจากสมาชิกชมรมผู้ปลูกส้ม น่าน จำนวน 260 ต้น ในปี พ.ศ. 2552 หลังจากนั้นเพาะเมล็ดจาก G1 คือ กลุ่มตัวอย่าง G2 ในการศึกษา นี้ซึ่งเริ่มต้นปลูกในปี พ.ศ. 2553 จำนวน 26 ต้น จากข้อมูลข้างต้นแสดงถึงความสำคัญของการจัดการพันธุ์การมีข้อมูลประวัติของต้นพันธุ์และการวางแผนคัดพันธุ์โดยคำนึงถึงการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต้องมีเพียงพอที่จะรักษาและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไป

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

กลุ่มตัวอย่างส้มสืทองน่านในการศึกษา นี้พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมและค่าความต่างทางพันธุกรรม F_{ST} ที่แสดงความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่าง G1 กับกลุ่ม G2 กลุ่ม B และกลุ่ม C แต่ไม่ต่างจากกลุ่ม A ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างอื่นๆ มีพันธุกรรมไม่ต่างกันซึ่งให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกับค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่พบค่อนข้างสูงระหว่างกลุ่ม G1 กับกลุ่มตัวอย่างส้มสืทองน่านอื่นๆ เช่นเดียวกับแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้จัดให้กลุ่มตัวอย่าง G1 เป็นกลุ่มที่ถูกแยกออกจากกลุ่มอื่นๆ ซึ่งระยะห่างทางพันธุกรรมที่พบในผลการศึกษา นี้ที่มีค่าสูงสุดเป็น 0.166 และมีค่าเฉลี่ย 0.077 จัดได้ว่ามีระยะห่างทางพันธุกรรมที่ต่ำเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Elcy *et al.* (2012) ส้ม Limau Madu (*Citrus reticulata* Blanco) ที่ปลูกในประเทศมาเลเซีย มีระยะห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 0.170 ทั้งนี้การพบระยะห่างทางพันธุกรรมที่สูงอาจเป็นผลมาจากการรวบรวมส้มจากพื้นที่ที่มีระยะทางห่างกันมากกว่า 500 กิโลเมตร ในขณะที่การศึกษานี้รวบรวมภายในจังหวัดน่านซึ่งแต่ละกลุ่มตัวอย่างมีระยะห่างกันไม่เกิน 100 กิโลเมตร

จากผลการศึกษา นี้การดำเนินงานที่ควรจะได้รับการพัฒนาต่อ คือ วางแผนอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมดั้งเดิมของส้มสืทองน่าน ด้วยเหตุที่พืชสกุลส้มมีความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเนื่องจากส้มเป็นพืชผสมข้าม โอกาสที่จะเกิดการผสมข้ามกันระหว่างชนิดและพันธุ์เป็นไปได้ค่อนข้างสูง (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996) นอกจากนี้ความแปรปรวนของพืชสกุลส้มมีผลมาจากปัจจัยหลายประการนอกเหนือจากการเกิดการผสมข้าม เช่น การเกิดการกลายพันธุ์และวิธีการที่ใช้ในการขยายพันธุ์ (Novelli *et al.*, 2006) ดังนั้นในการวางแผนงานเพื่อการจัดการพันธุกรรมและอนุรักษ์พันธุ์ส้มสืทองน่านต้องมีการวางแผนจัดการพันธุ์อย่างมีระบบ

ตัวอย่างการศึกษาของ Kongpun (2009) รายงานว่าความหลากหลายของพืชสกุลส้มในภาคใต้ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดจากการผสมข้ามระหว่างชนิดหรือระหว่างพันธุ์ และมีการขยายพันธุ์ต่อมาโดยการใช้เมล็ด ความหลากหลายที่เกิดขึ้นนี้ สมควรที่จะต้องมีการอนุรักษ์พันธุ์เพื่อเป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ หรือใช้เป็นต้นตอสำหรับพันธุ์เศรษฐกิจที่อ่อนแอต่อโรคทางรากและสภาพแวดล้อม จากการศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง G1 เป็นแหล่งพันธุ์หนึ่งที่มีความเหมาะสมเนื่องจากมีความหลากหลายทางพันธุกรรม มี N_e จำนวนมาก ไม่มีสถานะคอขวด และมีความต่างที่ชัดเจนจากกลุ่มอื่น สำหรับกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ ที่พบข้อสังเกตในทิศทางที่อาจส่งผลต่อคุณภาพส้มสีทอง ในอนาคตเกษตรกรต้องพัฒนาแนวทางจัดการต้นพันธุ์โดยมีข้อมูลต้นและความเข้าใจต่อการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการรักษาคุณภาพส้มสีทองนานให้เป็นไปตามข้อกำหนดของการเป็นพืชบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่พบได้ในกลุ่มตัวอย่างส้มสีทองน่าน จังหวัดน่าน จากเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 5 ตำแหน่ง สรุปได้ดังนี้ กลุ่มตัวอย่างส้มสีทองน่านมีความหลากหลายภายในกลุ่มตัวอย่างและพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มตัวอย่างส้มกึ่งต่อนานดั้งเดิม ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันของแต่ละกลุ่มตัวอย่างเป็นผลมาจากการจัดการพันธุกรรมส้มสีทองของแต่ละสวนซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการจัดการพันธุกรรม แหล่งพันธุ์ และอนุรักษ์พันธุกรรมส้มสีทองน่าน

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ อุปรกรณ์ครุภัณฑ์ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

เอกสารอ้างอิง

- Allendorf, W.F. and G. Luikart. 2007. **Conservation and the Genetics of Population.** New York City: John Wiley & Sons, Inc. 642 p.
- Barkley, A.N., L.M. Roose, R.R. Krueger and T.C. Federici. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics** 112: 1519-1531.
- Do, C., R.S. Waples, D. Peel, G.M. Macbeth B.J. Tillett and J.R. Ovenden. 2014. NeEstimator v2: reimplemention of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. **Molecular Ecology Resources** 14: 209-214.
- Elcy, G.P.S., M.C. Mahani, Y.J. Park and N.M. Noor. 2012. Simple Sequence Repeat (SSR) profiling of cultivated Limau Madu (*Citrus reticulata* Blanco) in Malaysia. **Fruits** 67: 67-76.

- Excoffier, L. and H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** 10: 564-567.
- Goudet, J. 2001. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indice Version2.9.3**. [Online]. Available <https://www.scienceopen.com/document?vid=79097bb4-ec3c-47c3-94a1-47085d721e6b> (15 January 2021).
- Guo, S.W. and E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics** 48: 361-372.
- Intellectual Property Department. 2013. Nan Golden Orange. **ECAP 3 geographical indication Fiche**. [Online]. Available <http://www.aseangidatabase.org/gidatabase/sites/default/files/gidocs/THGI0000053100065-en.pdf> (15 January 2021).
- Kongpun B. 2009. **Genetic Diversity of *Citrus* spp. in Southern Thailand Based on RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and Microsatellite Techniques**. Master Thesis. Prince of Songkla University. 88 p. [in Thai]
- Novelli, V.M., M. Cristofani, A.A. Souza and M.A. Machado. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology** 29: 90-96.
- Office of Agricultural Economics. 2018. **Mandarin**. [Online]. Available <http://oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/lime61.pdf> (8 July 2021).
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel. population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6: 288-295.
- Piry, S., G. Luikart and J.M. Cornuet. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity** 90: 502-503.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical test. **Evolution** 43(1): 223-225.
- Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources** 8: 103-106.
- Spiegel-Roy, P. and E.E. Goldschmidt. 1996. **Biology of Citrus**. New York: Cambridge University Press. 230 p.
- Yeh, F.C, R.C. Yang and T. Boyle. 1999. **POPGENE VERSION 1.31 Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. [Online]. Available <http://ftp.microsoft.com/softlib/Mslfiles/hpgl.exe> (25 January 2021).