

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์โกโก้ที่นำมาแปรรูป
ในจังหวัดนครศรีธรรมราช ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี
Genetic Diversity of Cocoa Varieties in Nakhon Si Thammarat
Province Assessed by AFLP Markers

เกษศิรินทร์ รัทจอร์¹ วีระเกียรติ ทรัพย์มี² และจุฑามาศ ศุภพันธ์^{3*}
Kedsirin Ruttajorn¹, Verakiat Supmee² and Juthamas Suppapan^{3*}

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์โกโก้ (*Theobroma cacao* L.) ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism: AFLP) ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างโกโก้จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ที่ทราบชื่อ 2 พันธุ์ คือ Pa7 × Na32 และ UIT1 × Na32 จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร และต้นโกโก้จากสวนเกษตรกรในจังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 4 ต้น คือ C-4 C-6 C-8 และ C-9 โดยใช้คู่ไพรเมอร์เอเอฟแอลพีจำนวน 3 คู่ ได้แก่ E-AAC/M-CTC E-AAG/M-CTA และ E-AAC/M-CTA ผลการวิเคราะห์พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) เฉลี่ย 4.67 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยคู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTC ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสูงสุด 9 แถบ ค่าความแตกต่างของไพรเมอร์ในการจำแนก (polymorphism information content: PIC) เฉลี่ยเท่ากับ 0.32 และคู่ไพรเมอร์ E-AAG/M-CTA ให้ค่า PIC สูงสุดเท่ากับ 0.37 ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นคู่ไพรเมอร์ที่ให้ข้อมูลมากที่สุดในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกโก้ในการศึกษานี้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการจัดกลุ่มโดยใช้วิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างโกโก้ออกเป็น 2 กลุ่มหลักอย่างชัดเจน โดยกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม (outgroup) และกลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างต้นโกโก้จากแปลงเกษตรกรกับพันธุ์ที่ทราบชื่อ ข้อมูลจากการศึกษานี้มีความสำคัญต่อการสนับสนุน

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมดิจิทัล มหาวิทยาลัยทักษิณ

² สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

³ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

¹ Department of Biological Science, Faculty of Science and Digital Innovation, Thaksin University

² Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya

³ Faculty of Education, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University

* Corresponding author e-mail: jutamas_sup@nstru.ac.th

DOI: <https://doi.org/10.65217/wichchajinstru.2026.v45i1.265084>

Received: 23 October 2024, Revised: 12 November 2024, Accepted: 13 November 2024

ข้อมูลพันธุกรรมเพื่อระบุแหล่งที่มาและสายพันธุ์ของโกโก้ในพื้นที่ ตลอดจนเป็นข้อมูลประกอบการคัดเลือกเพื่อการขยายพันธุ์และการแปรรูปโกโก้ในจังหวัดนครศรีธรรมราชอย่างเหมาะสม

คำสำคัญ: เอเอฟแอลพี เครื่องหมายดีเอ็นเอ โกโก้ ความหลากหลาย

Abstract

The genetic diversity of *Theobroma cacao* L. was investigated using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. DNA was analyzed from six cocoa samples: two known varieties (Pa7 × Na32 and UIT1 × Na32) obtained from the Chumphon Horticultural Research Centre and four farmer-grown trees (C-4, C-6, C-8, and C-9) collected from Nakhon Si Thammarat Province. Three primer combinations (E-AAC/M-CTC, E-AAG/M-CTA, and E-AAC/M-CTA) yielded an average of 4.67 polymorphic bands per combination, with E-AAC/M-CTC producing the highest number of polymorphic bands (9). The mean polymorphism information content (PIC) value was 0.32, and E-AAG/M-CTA exhibited the highest PIC value (0.37), indicating that it was the most informative primer combination for genetic diversity assessment in this study. Cluster analysis using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) separated the samples into two major clusters, with the second cluster serving as an outgroup. Within Cluster I, two subclusters were identified, revealing close genetic relationships between farmer-grown trees and the known varieties. The findings provide useful information for identifying genetic origins of local cocoa and support appropriate selection for propagation and processing in Nakhon Si Thammarat Province.

Keywords: AFLP, DNA marker, Cocoa, Diversity

บทนำ

โกโก้ (*Theobroma cacao* L.) เป็นพืชในวงศ์ Sterculiaceae เป็นไม้ยืนต้น ใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปขอบขนานแกมไข่กลับหรือรูปขอบขนาน ดอกเดี่ยวหรือออกเป็นกระจุกที่ลำต้นและกิ่งก้าน กลีบดอกสีขาวแกมเหลือง เกสรตัวผู้เป็นหมันสีม่วงเข้ม ปลายยอดสีขาว ผลสดเป็นรูปไข่แกมรูปกระสวย ผิวย่นเมื่อสุกสีม่วงหรือเหลือง เมล็ดรูปกระสวยสีน้ำตาล มีแหล่งกำเนิดอยู่ในแถบลุ่มน้ำอเมซอนตอนบน โกโก้แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มพันธุ์ (varieties) ได้แก่ 1) กลุ่มพันธุ์คริโอโล (Criollo) 2) กลุ่มพันธุ์เนชันนัล (Nacional) 3) กลุ่มพันธุ์ฟอร์สเตอร์ (Forastero) แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยแอฟริกัน อมีโลนาโด (West African Amelonado) และกลุ่มย่อยอัฟเปอร์อเมซอน (Upper Amazon) และ 4) กลุ่มพันธุ์ตรินิตาโร (Trinitario) (Afoakwa, 2014) ปัจจุบันพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในแอฟริกา ตะวันตก ประเทศในเขตร้อนของอเมริกา และเอเชีย คิดเป็นร้อยละ 63 20 และ 17 ตามลำดับ

ในประเทศไทยศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรมีการคัดเลือกและผลิตพันธุ์โกโก้โดยการเปรียบเทียบพันธุ์โกโก้ลูกผสมจากประเทศมาเลเซียกับพันธุ์ที่เกษตรกรปลูกอยู่เดิม พบว่าคู่ผสมระหว่าง Parinari 7 กับ Nanay 32 ($Pa7 \times Na32$) เป็นพันธุ์ที่มีผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดดีเหมาะสมต่อการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก จึงได้ขึ้นทะเบียนรับรองพันธุ์เป็นโกโก้ลูกผสมพันธุ์ลูกผสมชุมพร 1 แหล่งปลูกโกโก้ที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น จันทบุรี เชียงราย นครศรีธรรมราช และประจวบคีรีขันธ์ เป็นต้น (สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, 2564) ต้นโกโก้สามารถใช้ประโยชน์จากส่วนต่าง ๆ ได้ เมล็ดเป็นวัตถุดิบทำเป็นช็อกโกแลต เนื้อสามารถใช้ทำเครื่องดื่ม ส่วนเปลือกของฝักเป็นส่วนเหลือทิ้งจากการแปรรูป นอกจากใช้ผลิตเป็นปุ๋ยหมักแล้ว ยังสามารถใช้ทำเป็นสีผงสำหรับใช้ย้อมผ้าสีธรรมชาติได้อีกด้วย (จุติพร และคณะ, 2568)

จังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกโกโก้เป็นแหล่งใหญ่ที่สุดในภาคใต้ มีเนื้อที่ปลูก 580 ไร่ ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ 11,200 กิโลกรัม (สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, 2564) โดยเฉพาะในอำเภอท่าศาลามีประวัติการปลูกโกโก้มาประมาณ 40 ปี โดยกรมวิชาการเกษตรได้เข้ามาพัฒนาและสนับสนุนให้เกษตรกรปลูกโกโก้มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2525 เนื่องจากพื้นที่และภูมิอากาศมีความเหมาะสม หลังจากนั้นเกิดการหยุดส่งเสริมการปลูกโกโก้ขึ้น ทำให้เกษตรกรโค่นโกโก้ทิ้งและเปลี่ยนเป็นการปลูกยางพาราทดแทน การปลูกโกโก้จึงเริ่มซบเซาลงมาเรื่อย ๆ จนกระทั่งโกโก้จากจังหวัดนครศรีธรรมราชได้รับรางวัลในระดับเวทีโลก ทำให้ราคาผลผลิตโกโก้พุ่งสูงขึ้นอีกครั้ง และมีราคาขายในตลาดล่วงหน้า (cocoa continuous contract: CCOO) มีแนวโน้มปรับตัวเพิ่มขึ้นมากในตลาดโลก ซึ่งเป็นสถิติราคาสูงที่สุดในรอบ 47 ปี ของราคาโกโก้ (เทคโนโลยีชาวบ้าน, 2567) ซึ่งจะช่วยผลักดันการผลิตและการส่งออกโกโก้ภายในประเทศ อย่างไรก็ตามเกษตรกรปลูกโกโก้ไม่น้อย และไม่ได้ส่งออกไปยังต่างประเทศ อีกทั้งปัญหาจากการทิ้งช่วงในการปลูกมาเป็นระยะเวลานาน ทำให้สายพันธุ์ต่าง ๆ ของโกโก้ รวมถึงสายพันธุ์ดั้งเดิมเริ่มหายไป

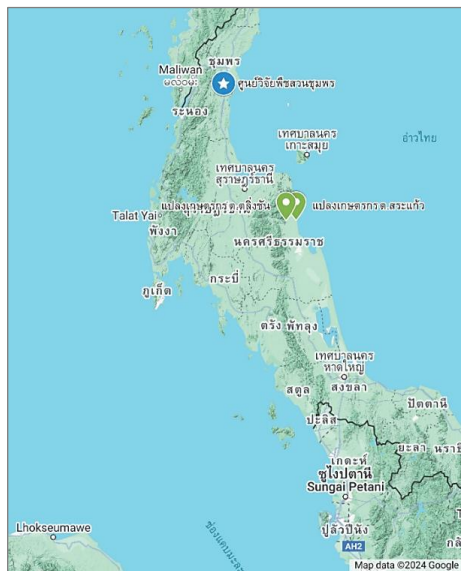
ปัจจุบันมีการเก็บรักษาสายพันธุ์โกโก้ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่มีการพัฒนาโดยการผสมข้ามสายพันธุ์หลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่จำแนกชนิดของสายพันธุ์ไม่ชัดเจน ด้วยเหตุนี้การจำแนกความหลากหลายของโกโก้โดยอาศัยเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงได้รับความนิยม (Korzun, 2002) เพื่อใช้บ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism: AFLP) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่อาศัยพื้นฐานการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวพอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) โดยไม่ต้องการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำได้รวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นความเข้มข้นน้อย และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (Vos *et al.*, 1995) คล้ายกับเครื่องหมายอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA: RAPD) จากงานวิจัยของ Ronning *et al.* (1995) และ Syahri *et al.* (2019) ได้นำเครื่องหมายอาร์เอพีดีเพื่อจำแนกประชากรของโกโก้ตัวอย่างพันธุ์พ่อแม่ ลูกชั่วรุ่นที่ 1 และประชากรจากการผสมทดสอบ (backcross) สอดคล้องกับแบบแผนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของเมนเดล ร้อยละ 68.3 นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีอย่างแพร่หลายเพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เพื่อความเข้าใจระดับสายวิวัฒนาการและชีวภูมิศาสตร์ระดับประชากร เพื่อสร้างแผนที่พันธุกรรม และเพื่อจำแนกความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ (Paunand Schönschwetter, 2012) รวมทั้งการประยุกต์ใช้

เพื่อประเมินความหลากหลายของประชากรของถั่วฟาบ่า (faba) ที่ทนต่อสภาพภูมิอากาศ (Numansyah *et al.*, 2020) ซึ่งเครื่องหมายเอเอฟแอลพีมีความสามารถในการตรวจสอบความหลากหลายได้หลายตำแหน่ง ให้ผลแม่นยำ และสามารถทำซ้ำได้เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกโก้สายพันธุ์ที่นำมาแปรรูปในจังหวัดนครศรีธรรมราช เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมกับลักษณะประจำพันธุ์ของโกโก้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างใบโกโก้ (*T. cacao* L.) ที่มีการเก็บรักษาสายพันธุ์จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อำเภอสวี จังหวัดชุมพร ได้แก่ สายพันธุ์โกโก้ลูกผสมชุมพร 1 (Pa7 x Na32) และสายพันธุ์ UIT1 x Na32 จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดนครศรีธรรมราชที่เป็นรายใหญ่ของการแปรรูปโกโก้เป็นผลิตภัณฑ์ โดยการสอบถามสายพันธุ์เบื้องต้นจากตำบลลิงชั้น อำเภอนาทาสา ได้แก่ หมายเลข 4 (C-4) และหมายเลข 6 (C-6) จากตำบลสระแก้ว อำเภอนาทาสา หมายเลข 8 (C-8) และหมายเลข 9 (C-9) (ภาพที่ 1) ตัดตัวอย่างใบโกโก้เป็นกิ่งเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่มีกระดาษเปียกบรรจุอยู่ เก็บรักษาที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ในภาชนะปิด เพื่อนำมายังห้องปฏิบัติการ และใช้กระเจียบเขียว (*Abelmoschus esculentus*: okra) เป็นตัวอย่างควบคุม (outgroup) รวมเป็นทั้งหมด 7 ตัวอย่างใช้สายพันธุ์ละ 5 ต้น เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงตำแหน่งของจุดเก็บตัวอย่างของงานวิจัย ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร จังหวัดชุมพร และแปลงเกษตรกรในตำบลลิงชั้น และตำบลสระแก้ว อำเภอนาทาสา จังหวัดนครศรีธรรมราช

ที่มา: Google Maps (2024)

2. การสกัดดีเอ็นเอของใบโกโก้

การสกัดดีเอ็นเอของใบโกโก้ใช้วิธีประยุกต์จาก Doyle and Doyle (1987) โดยตัดใบโกโก้ น้ำหนัก 0.2 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลว ตักใบที่บดละเอียดใส่หลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ (microcentrifuge tube) แล้วเติมสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 2 เท่า (2X CTAB) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำหลอดตัวอย่างบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก ๆ 20 นาที เติมสารละลายฟีนอล (phenol) : คลอโรฟอร์ม (chloroform) : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากัน (vortex) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่ เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 10 ของสารละลาย และเติมไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropanol) ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 เท่า ของสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 45 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่แช่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอ และตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้รอใช้งานที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างใบโกโก้ที่สกัดได้ด้วยการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (NanoDrop spectrophotometer, Thermo Fisher) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในบัฟเฟอร์ทีเออี (TAE buffer) ความเข้มข้น 0.5 เท่า (สารละลายทริส ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ กรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ (EDTA) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 8.0) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วนำแผ่นเจลแช่ในสีย้อมดีเอ็นเอ (ViSafe green gel stain: Vivantis) เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นตรวจสอบผลด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (UV transilluminator) แล้วบันทึกภาพ

3. เครื่องหมายเอเอฟแอลพี

ลำดับเบส (sequence) ของไพรเมอร์ (primers) ทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ รายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของอะแดปเตอร์ (adapter) และไพรเมอร์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' - 3')	
	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
อะแดปเตอร์ ฟอว์เวิร์ด (adapter forward)	CTCGTAGACTGCGTACC	GACGATGAGTCCTGAG
อะแดปเตอร์ รีเวิร์ด (adapter reverse)	AATTGGTACGCAGTCTAC	GACGATGAGTCCTGAG
ไพรเมอร์จำเพาะขั้นแรก (pre-selective primer)	GACTGCGTACCAATTCA	GATGAGTCCTGAGTAAC
ไพรเมอร์จำเพาะ (selective primer)	E-AAG:	M-CTC:
	GACTGCGTACCAATTCAAG	GATGAGTCCTGAGTAACTC
	E-AAC:	M-CTA:
	GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACTA

การตรวจสอบและวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี โดยวิธีดัดแปลงจาก Vos *et al.* (1995) ขั้นตอนการย่อยดีเอ็นเอ (DNA digestion) เริ่มต้นจากเตรียมดีเอ็นเอให้ทุกตัวอย่างมีความเข้มข้นเท่ากัน 800 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* (5'-GAATCC-3') และ *MseI* (5'-TTAA-3') โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย บัฟเฟอร์สำหรับใช้กับเอนไซม์ตัดจำเพาะความเข้มข้น 10 เท่า (10X Cut Smart) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร *EcoRI* ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร *MseI* ปริมาตร 0.250 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้นำไปบ่มโดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และตรวจสอบผลด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

ขั้นตอนการเชื่อมต่อ (ligation) โดยนำชิ้นส่วนที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* มาต่อปลายด้าน 5' และ 3' ด้วยอะแดปเตอร์ ใช้สารละลายที่ได้จากขั้นตอนการย่อยเป็นตัวอย่าง และเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาประกอบด้วย บัฟเฟอร์ทีโฟร์ (T4 buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ทีโฟร์ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA ligase) 20 ไมโครลิตร อะแดปเตอร์ของ *EcoRI* ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร อะแดปเตอร์ของ *MseI* ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปบ่มโดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำผลที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสความเข้มข้นร้อยละ 1.0

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ครั้งที่ 1 (pre-selective amplification) นำสารละลายที่ได้เชื่อมต่อดัวยอะแดปเตอร์ เตรียมส่วนผสมประกอบด้วย สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.9 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ *EcoRI*-A และไพรเมอร์ *MseI*-C

ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 2 ไมโครลิตร ส่วนผสมพร้อมใช้ของเอนไซม์สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Taq master mix) ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ (PCR) ตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler) คือ ขั้นตอนเริ่มต้นการแยกสายดีเอ็นเอ (pre-denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนการจับของไพรเมอร์ (annealing) ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ ตามด้วยขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ รอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสความเข้มข้นร้อยละ 1.6

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ครั้งที่ 2 (selective amplification) นำผลผลิตพีซีอาร์ จากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ครั้งที่ 1 ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ไมโครลิตร เตรียมส่วนผสม ปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.125 ไมโครลิตร ไพรเมอร์จำเพาะ E-NNN และ M-NNN ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 2.5 ไมโครลิตร ส่วนผสมพร้อมใช้ของเอนไซม์สังเคราะห์ดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและใช้โปรแกรมการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จำนวน 35 รอบ อุณหภูมิและเวลา เช่นเดียวกับขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ครั้งที่ 1

4. การวิเคราะห์เครื่องหมายเอเอฟแอลพีด้วยวิธีการแยกขนาดสารพันธุกรรมอัตโนมัติด้วยกระแสไฟฟ้า

การตรวจสอบผลของเครื่องหมายเอเอฟแอลพีด้วยการแยกขนาดสารพันธุกรรมอัตโนมัติด้วยกระแสไฟฟ้า (capillary electrophoresis) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ รุ่น QIAxcel advanced system (Qiagen, Hilden, Germany) เป็นการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุ ในรูปของสารละลาย เมื่อมีการให้ศักย์ไฟฟ้าจะทำให้ไอออนของสารละลายเคลื่อนที่ไปทั่วไฟฟ้าแต่ละขั้ว เกิดการไหลของอิเล็กโทรไลต์ไปตามหลอดรูเล็ก (capillary) จึงเป็นการวิเคราะห์ผลที่มีความสะดวก และรวดเร็ว วิเคราะห์และบันทึกผลแถบดีเอ็นเอจากการพิจารณาด้วยโปรแกรมภาพเจล (gel image) และอิเล็กโทรเฟอโรแกรม (electropherogram) การเพิ่มปริมาณของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ใช้สัญลักษณ์เป็น “1” ถ้าไม่มีแถบดีเอ็นเอใช้สัญลักษณ์เป็น “0” คำนวณค่าความสามารถในการจำแนก ความแตกต่างของไพรเมอร์แต่ละชนิดด้วยค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism information content: PIC) และระดับความเชื่อมั่นแบบบูตสตรัป (bootstrap) จำนวน 100 ครั้ง โดยโปรแกรม PowerMarker (Liu and Muse, 2004) วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) จากนั้นนำค่าความเหมือน (similarity matrix) มาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) เพื่อจัดกลุ่มตัวอย่างโดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบลำดับชั้น (unweighted pair group method with arithmetic mean: UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโกโก้โดยใช้โปรแกรม NTSyspc รุ่น 2.10e (Rohlf, 2000)

ผลการวิจัย

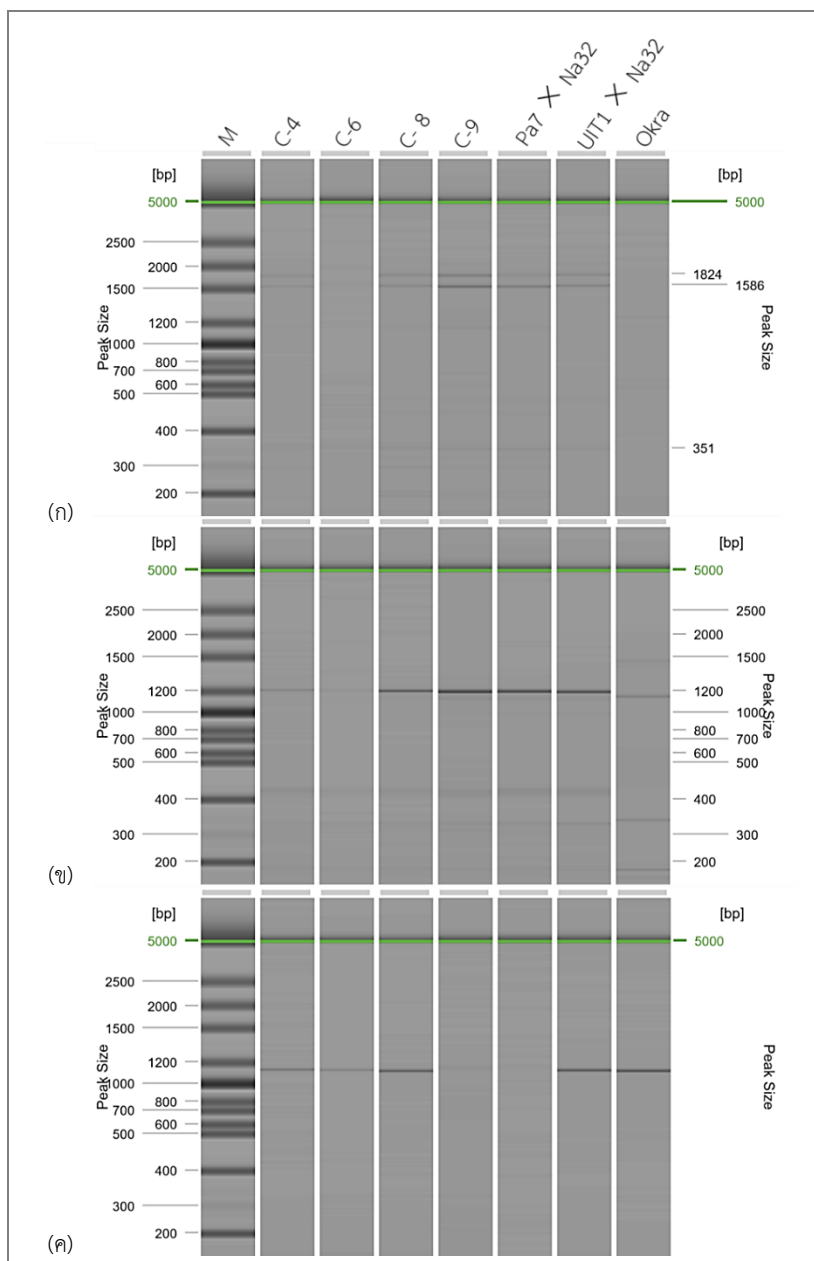
1. ผลเครื่องหมายเอเอฟแอลพีของโกโก้

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านขั้นตอนของการทำเอเอฟแอลพี วิเคราะห์ผลด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติในรูปแบบภาพเจล พบว่า 3 คูไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 23 แถบ เฉลี่ยเท่ากับ 7.67 แถบต่อคูไพรเมอร์ ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอพบว่าคูไพรเมอร์ E-AAC/M-CTC E-AAG/M-CTA และ E-AAC/M-CTA ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 12 8 และ 3 แถบ ตามลำดับ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) จำนวน 9 2 และ 3 แถบ ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 75.00 25.00 และ 100.00 ตามลำดับ และมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.28-0.37 ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพีของโกโก้

คูไพรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน	ร้อยละ ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน	ค่าความหลากหลาย ทางพันธุกรรม
E-AAC/M-CTC	12	9	75.00	0.28
E-AAG/M-CTA	8	2	25.00	0.37
E-AAC/M-CTA	3	3	100.00	0.31
ค่าเฉลี่ย	7.67	4.67	66.67	0.32

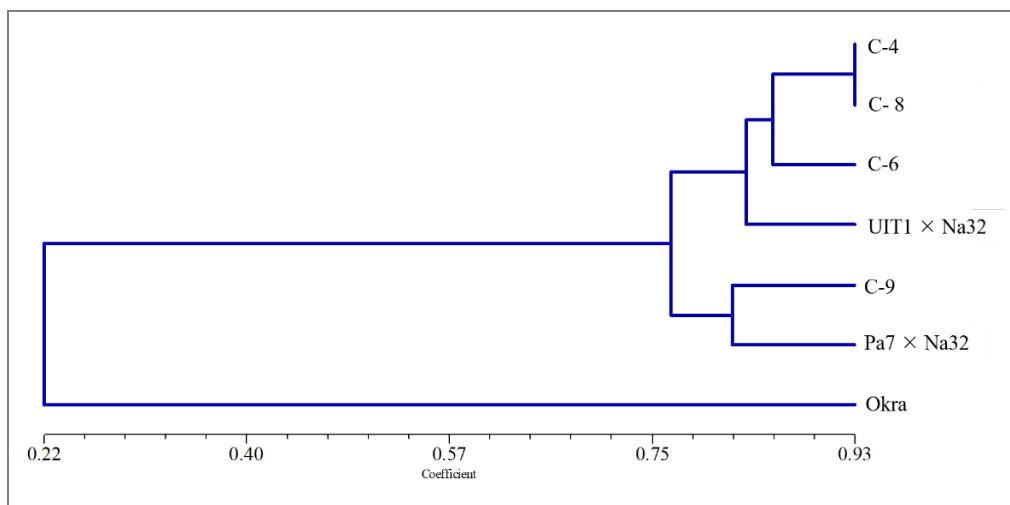
แผนภูมิความสัมพันธ์มีค่าดัชนีความเหมือน เท่ากับ 0.18-0.93 และการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS รุ่น 2.10e วิธี UPGMA พบว่า สามารถแยกความสัมพันธ์ของโกโก้ ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แบ่งย่อยได้ 2 กลุ่มย่อยแรก ได้แก่ C-4 C-8 C-6 และ UIT1 x Na32 และกลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ C-9 และ Pa7 x Na32 ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ okra เป็นกระเจี๊ยบเขียวใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (ภาพที่ 3) โดยพบว่าค่าดัชนีความเหมือนพันธุกรรมมากที่สุด คือ C-4 และ C-8 มีเท่ากับ 0.93 และจากแผนภูมิความสัมพันธ์ของ UIT1 x Na32 พบว่ามีดัชนีความเหมือนกับ C-4 C-8 และ C-6 เท่ากับ 0.89 0.82 และ 0.79 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ Pa7 x Na32 หรือสายพันธุ์โกโก้ชุมพร 1 มีค่าดัชนีความเหมือนพันธุกรรมกับ C-9 เท่ากับ 0.82 ดังตารางที่ 3



ภาพที่ 2 การวิเคราะห์ผลแถบดีเอ็นเอในรูปแบบภาพเจล โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ โดยใช้คู่มือไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน คือ E-AAC/M-CTC (ก) E-AAG/M-CTA (ข) และ E-AAC/M-CTA (ค)

หมายเหตุ: - M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- C-4 C-6 C-8 และ C-9 คือ ต้นโกโก้หมายเลข 4 6 8 และ 9 ตามลำดับ จากเกษตรกร
- Pa7 x Na32 คือ สายพันธุ์โกโก้ลูกผสมชุมพร 1
- UIT1 x Na32 คือ สายพันธุ์โกโก้จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร
- okra คือ กระเจี๊ยบเขียว เป็นตัวอย่างควบคุม



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโกโก้จากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีโดยวิธี UPGMA

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

กลุ่มตัวอย่าง	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม						
	C-4	C-6	C-8	C-9	Pa7xNa32	UIT1xNa32	Okra
C-4	1.00						
C-6	0.89	1.00					
C-8	0.93	0.82	1.00				
C-9	0.75	0.64	0.82	1.00			
Pa7xNa32	0.79	0.68	0.86	0.82	1.00		
UIT1xNa32	0.89	0.79	0.82	0.79	0.82	1.00	
Okra	0.25	0.36	0.18	0.07	0.25	0.21	1.00

การอภิปรายผลการวิจัย

การใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประกอบด้วย สายพันธุ์โกโก้จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Pa7 x Na32 และ UIT1 x Na32 และ โกโก้จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดนครศรีธรรมราช จากข้อมูลการสัมภาษณ์พบว่าไม่ทราบ สายพันธุ์ที่แน่ชัด ได้แก่ หมายเลข C-4 และ C-6 มีลักษณะผลสีเขียว ส่วนหมายเลข C-8 และ C-9 ให้ผลสีแดงและสีแดง ตามลำดับ เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมที่นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย เมื่อปี พ.ศ. 2522 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการพัฒนาพันธุ์โกโก้ในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2522 ได้นำผลโกโก้และ กิ่งพันธุ์โกโก้จากชาบารห์ ประเทศมาเลเซียมาปลูกที่สถานีทดลองพืชสวนสวี (สถาบันวิจัยพืชสวน กรม วิชาการเกษตร, 2564) นอกจากนี้งานวิจัยนี้ได้ใช้กระเจียบเขียวเป็นตัวอย่างควบคุม จากผลการ วิเคราะห์เครื่องหมายเอเอฟแอลพีให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 23 แถบ จาก 3 คู่ไพรเมอร์ เฉลี่ยเป็น 7.67 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ จากรายงานของ Saunders *et al.* (2000) ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี 7 คู่ไพรเมอร์

ร่วมกับเอสเอสอาร์ (simple sequence repeats: SSR) 15 ไพรเมอร์ เพื่อใช้คัดเลือกเชื้อพันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ของโกโก้ที่มีความต้านทานต่อโรค พบว่าคูไพรเมอร์ E-AAC/M-CTC ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมากที่สุด 30 แถบ ส่วน E-AAG/M-CTA ให้แถบดีเอ็นเอ 21 แถบ และคูไพรเมอร์ที่ให้แถบน้อยที่สุด คือ E-AAC/M-CAC ให้แถบดีเอ็นเอ 15 แถบ ซึ่งจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจะสัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย นอกจากนี้รูปแบบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอยังสามารถใช้บ่งชี้การแปรผันของพืชได้ ในงานวิจัยนี้ได้ใช้คูไพรเมอร์ E-AAC/M-CTC และ E-AAG/M-CTA เช่นเดียวกัน แต่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างน้อยกว่า ส่วนค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของคูไพรเมอร์ E-AAG/M-CTA มีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.37 ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ที่สำคัญสำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกโก้ในอนาคต

จากแผนภูมิทางพันธุกรรมของโกโก้ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพีในครั้งนี สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างสายพันธุ์โกโก้จากแปลงเกษตรกรกับสายพันธุ์ลูกผสมทางการค้าได้ โดยพบว่าตัวอย่างสายพันธุ์โกโก้จากแปลงเกษตรกรต้นหมายเลข C-4 C-6 และ C-8 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ UIT1 x Na32 ซึ่ง UIT (unidentified trinitario) เป็นกลุ่มพันธุ์ทรินิตาโรที่มีการสันนิษฐานว่าเกิดจากการผสมกันระหว่างกลุ่มพันธุ์ครีโอลกับฟอรัสเทอร์โร กลุ่มพันธุ์นี้มีคุณภาพดีและให้ผลผลิตสูง มีความทนทานต่อโรคดีกว่ากลุ่มฟอรัสเทอร์โร เมล็ดของทรินิตาโรบางพันธุ์จะมีรสชาติพิเศษ ส่วนสายพันธุ์โกโก้จากแปลงเกษตรกร C-9 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ Pa7 x Na32 หรือโกโก้ลูกผสมชุมพร 1 เป็นกลุ่มย่อยอัฟเปอร์อเมซอน ในกลุ่มพันธุ์ฟอรัสเทอร์โร รสชาติของเมล็ดโกโก้มีรสขมเล็กน้อยแต่มีรสชาติเข้มข้น ทำให้ช็อกโกแลตที่ผลิตจากพันธุ์นี้มีรสชาติที่ดีและเข้มข้นที่สุด (สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, 2564)

ในปัจจุบันสายพันธุ์โกโก้ที่ผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ปลูกในเชิงการค้า ส่วนมากจะเป็นลูกผสม เนื่องจากต้องการให้ลูกผสมที่เกิดขึ้นมีคุณภาพในด้านต่าง ๆ ดีขึ้นกว่าพันธุ์พ่อแม่ ทั้งในเรื่องการเจริญเติบโต การให้ผลผลิต คุณภาพและขนาดเมล็ด ความทนทานต่อโรคและแมลง ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์โกโก้เพื่อปลูกทางการค้าและการเลือกใช้ประโยชน์ในการแปรรูปอย่างเหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็น จากผลงานวิจัยนี้ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกโก้ที่มีการแปรรูปสามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์โกโก้จากแปลงเกษตรกรกับสายพันธุ์ที่ทราบแล้วจากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร เพื่อเป็นข้อมูลการใช้ประโยชน์การแปรรูปโกโก้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีสามารถประยุกต์ใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้ เช่น *Brassica oleracea* (El-Esawi *et al.*, 2016) และถั่วพาบ (Faba beans) พันธุ์กลาย (Nurmansyah *et al.*, 2020) เป็นต้น จะเห็นได้ว่าเครื่องหมายเอเอฟแอลพีสามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรม สามารถใช้บ่งชี้เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบความเป็นลูกผสม และการจดทะเบียนพันธุ์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีจะมีจำนวนมากและขนาดใกล้เคียงกัน แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอาจมีขนาดเท่ากันแต่มาจากชิ้นดีเอ็นเอคนละตำแหน่ง จึงอาจทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกโก้ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี โดยเก็บตัวอย่างสายพันธุ์โกโก้ลูกผสมทางการค้า ได้แก่ สายพันธุ์ Pa7 x Na32 และสายพันธุ์ UIT1 x Na32 จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อำเภอสวี จังหวัดชุมพร และตัวอย่างสายพันธุ์โกโก้ ต้นหมายเลข 4 (C-4) หมายเลข 6 (C-6) หมายเลข 8 (C-8) และหมายเลข 9 (C-9) จากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดนครศรีธรรมราชที่เป็นรายใหญ่ของการแปรรูปโกโก้เป็นผลิตภัณฑ์ ศึกษาเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 3 คูไพรเมอร์ สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโกโก้ด้วยรูปแบบภาพเจลจากโปรแกรม QIAxcel Advanced System พบว่าสายพันธุ์โกโก้จำนวน 6 ตัวอย่างและกระเจียบเขียว 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุม สามารถสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมของโกโก้ได้ 2 กลุ่ม โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างของโกโก้และตัวอย่างควบคุมออกจากกัน และสามารถแบ่งกลุ่มย่อยของโกโก้ได้ 2 กลุ่มย่อยตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันระหว่างสายพันธุ์โกโก้ของเกษตรกรและสายพันธุ์ลูกผสมทางการค้าของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกโก้ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จึงควรทดสอบตัวอย่างประชากรของโกโก้และคูไพรเมอร์เพิ่มมากขึ้น เพื่อให้ได้ความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์โกโก้ที่นำมาแปรรูปในจังหวัดนครศรีธรรมราชได้รับงบประมาณสนับสนุนจากเงินงบประมาณ ววน. ประจำปี พ.ศ. 2566 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช โดยมุ่งหวังเพื่อที่จะได้ข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์โกโก้เพื่อนำมายืนยันสายพันธุ์ที่เป็นต้นกำเนิดของโกโก้ในจังหวัดนครศรีธรรมราช เพื่อเป็นข้อมูลในการสร้างแบรนด์โกโก้ในจังหวัดนครศรีธรรมราชให้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้นและเป็นการยกระดับของผู้ประกอบการด้วย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่อนุเคราะห์เครื่องมือในการศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุลในการทำโครงการ และขอขอบคุณ คุณพัฒนพร รินจักร ที่ช่วยประสานงานในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรที่อนุเคราะห์ตัวอย่างสายพันธุ์ รวมถึงเกษตรกรทุกท่านที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในทุกพื้นที่

เอกสารอ้างอิง

จุติพร อัสวโสรธรณ วีระเกียรติ ทรัพย์มี และจุฑามาศ ศุภพันธ์. (2568). การทดสอบคุณภาพผ้าสีธรรมชาติที่ย้อมด้วยสีผงจากเปลือกฝักโกโก้ (*Theobroma cacao*) โดยการใช้สารช่วยติดสี. *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 44(2), 30-43, doi: <https://doi.org/10.65217/wichajainstru.2025.v44i2.264813>.

- เทคโนโลยีชาวบ้าน. (2567). “โกโก้ไทย” ฝ่าวิกฤต...โอกาสทะยานสู่ตลาดโลก. สืบค้นเมื่อ 1 พฤษภาคม 2567, จาก: https://www.khaosod.co.th/technologychaoban/techno-news/article_276150.
- สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. (2564). *การจัดการความรู้ เทคโนโลยีการผลิตโกโก้*. นนทบุรี: การันตี.
- Afoakwa, E.O. (2014). *Cocoa production and processing technology*. Boca Raton: CRC Press.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.
- El-Esawi, M.A., Germaine, K., Bourke, P. and Malone, R. (2016). AFLP analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships of *Brassica oleracea* in Ireland. *Comptes Rendus Biologies*, 339(5-6), 163-170, doi: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.03.002>.
- Google Maps. (2024). *Thailand*. Retrieved 11 November 2024, from: <https://maps.app.goo.gl/zoxGyZw1EQTL6NpLA>.
- Korzun, V. (2002). Use of molecular markers in cereal breeding. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7(2B), 811-820.
- Liu, K. and Muse, S.V. (2004). PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21(9), 2128-2129, doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282>.
- Nurmansyah, Alghamdi, S.S., Migdadi, H.M., Khan, M.A. and Afzal, M. (2020). AFLP-based analysis of variation and population structure in mutagenesis induced faba bean. *Diversity*, 12(8), 303, doi: <https://doi.org/10.3390/d12080303>.
- Paun, O. and Schönschetter, P. (2012). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) - An invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic and epigenetic studies. *Methods Molecular Biology*, 862, 75-87, doi: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-609-8_7.
- Rohlf, F.J. (2000). *NTSYS-pc V2.10e numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter Software.
- Ronning, C.M., Schnell, R.J. and Kuhn, D.N. (1995). Inheritance of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Theobroma cacao* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(4), 681-686, doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.120.4.681>.

- Saunders, J.A., Hemeida, A.A. and Mischke, S. (2000). USDA DNA fingerprinting programme for identification of *Theobroma cacao* accessions. In *Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding* (pp. 112-118). Sabah: Malaysian Cocoa Board.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973). *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W.H. Freeman and Company.
- Syahri, Y.F., Rauf, M., Paembonan, S.A., Larekeng, S.H. and Cahyaningsih, Y.F. (2019). RAPD amplification on cocoa (*Theobroma cacao* L.) from East Kolaka, Southeast Sulawesi Province. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 270, 012052, doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/270/1/012052>.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>.