

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของถั่วหรั่ง

ถั่วหรั่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna subterranea* (L.) Verdc. เนื่องจากมีลักษณะคล้ายคลึงกับพืชในสกุล *Vigna* มีชื่อสามัญคือ Bambara groundnut เป็นพืชที่มีความสำคัญในทวีปแอฟริกา (sub-Saharan Africa) จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae วงศ์ย่อย Papilionaceae มีจำนวนโครโมโซม $2n=22$ จากการศึกษาพบว่าถั่วหรั่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปแอฟริกา โดยมีศูนย์กลางอยู่ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไนจีเรียและตอนเหนือของประเทศคาเมอรูน มีรายงานการปลูกถั่วหรั่งครั้งแรกในศตวรรษที่ 17 โดยเรียกพืชชนิดนี้ว่า “Mandubi d’ Angola” และมีการแพร่กระจายจากทวีปแอฟริกาไปยังประเทศอินเดีย ศรีลังกา อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย บราซิล (Duke, 1981) สำหรับประเทศไทยนั้นคาดว่า มีการปลูกถั่วหรั่งในภาคใต้ของประเทศไทยมาไม่น้อยกว่า 200 ปีแล้ว (กรมวิชาการเกษตร, 2541) โดยสันนิษฐานว่าถั่วหรั่งเข้าสู่ประเทศไทยทางตอนใต้โดยผ่านทางประเทศมาเลเซีย ในปัจจุบันนี้พบว่านิยมปลูกถั่วหรั่งกันมากในสวนยางพาราทางภาคใต้ของประเทศไทย และบางครั้งก็ปลูกบนที่ราบหรือปลูกเป็นพืชแซมในแปลงปลูกพืชอื่น ๆ โดยมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปตามแหล่งปลูก เช่น ในจังหวัดนราธิวาส ยะลา ปัตตานี เรียกว่า “กาแจโป” จังหวัดสงขลา เรียกว่า “ถั่วไทร” จังหวัดภูเก็ต เรียกว่า “ถั่วป็นหยี” จังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง และจังหวัดอื่น ๆ ทางภาคใต้ เรียกว่า “ถั่วเม็ดเดียวหรือถั่วหรั่ง” (สุกัญญา, 2547)

ถั่วหรั่งเป็นพืชที่สามารถปรับตัวได้ดีในพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ ในพื้นที่ดินดอนที่มีการระบายน้ำดี เช่น ดินทราย ดินร่วน และดินร่วนปนทราย ทนต่อดินกรด แต่ไม่ทนต่อดินด่างและดินเค็ม เจริญเติบโตได้ดีใน pH 5.0-6.5 เป็นพืชที่ต้องการอุณหภูมิสูง มีแดดจัด โดยอุณหภูมิเฉลี่ยกลางวัน-กลางคืน 20-28 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 600-750 มิลลิเมตรต่อปี และจะให้ผลผลิตสูงขึ้นเมื่อมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 900-1,200 มิลลิเมตรต่อปี (สุเทพ, 2525; สุกัญญา, 2547)

ความสำคัญของถั่วหรั่ง

ถั่วหรั่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่ให้โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ใช้เมล็ดเป็นอาหาร จากการศึกษาของ Duke (1981) พบว่าในเมล็ดแห้ง 100 กรัมมีสารอาหารที่สำคัญเป็นส่วนประกอบคือ พลังงาน 367 กิโลแคลอรี โปรตีน 18.8 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 6.2 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 61.3 เปอร์เซ็นต์ และ

ไฟเบอร์ 4.8 เปอร์เซ็นต์ และ Nwokolo and Smartt (1996) รายงานว่าเมล็ดแห้ง (dry seed) และเมล็ดสด (fresh seed) มีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเมล็ดในถั่วหรั่งเมล็ดแห้ง (dry seed) และเมล็ดสด (fresh seed)

Nutrient (%)	Dry seed	Fresh seed (Immature seed)
Dry matter	90.40	42.70
Protein	22.50	7.80
Ether extract	2.90	3.10
Crude fiber	6.20	3.00
Ash	5.10	1.80
Nitrogen-free extract	55.80	30.00

ที่มา: Nwokolo and Smartt (1996)

เมล็ดของถั่วหรั่งสามารถนำมาบริโภคได้หลายรูปแบบ เมล็ดสดก่อนถึงระยะสุกแก่นำมาต้มหรือคั่วรับประทาน ส่วนเมล็ดที่สุกแก่เต็มที่แล้วจะมีความแข็งของเมล็ดมากกว่าเมล็ดสด ก่อนการบริโภคต้องนำมาต้มเพื่อให้เมล็ดนุ่ม หรือบดเป็นแป้งเพื่อใช้ประกอบอาหารต่าง ๆ ทางด้านอุตสาหกรรมใช้ถั่วหรั่งในลักษณะคั้นน้ำเกลือบรรจุกระป๋องสำหรับการประกอบอาหาร และยังมีการนำมาบริโภคในรูปของอาหารขบเคี้ยว หรืออาหารเพื่อสุขภาพอีกด้วย ถั่วหรั่งจึงเป็นที่ต้องการอย่างมากของตลาดในเขตภาคใต้ของไทย รวมทั้งในสิงคโปร์และมาเลเซีย (สุกัญญา, 2547)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วหรั่ง

ถั่วหรั่งจัดเป็นพืชล้มลุก อายุฤดูเดียวลำต้นเลื้อยไปตามพื้นดิน เป็นที่เกิดของใบ รากวิสามัญ รวมทั้งดอกและฝัก ลำต้นเลื้อยมีกิ่งก้านเป็นจำนวนมาก ความยาวของกิ่งที่แตกออกจากลำต้นที่แตกต่างกันนั้นมิพลงให้เกิดความแตกต่างในการแตกกอ ทำให้สามารถแบ่งลำต้นออกเป็น 2 แบบ คือ ลำต้นตั้งตรง (intermediate หรือ semi-bunched) ถือเป็นลำต้นที่เจริญในระยะแรก และในระยะต่อมา มีการแตกแขนงของลำต้นเลื้อยขนานไปกับผิวดิน (spreading) บริเวณแขนงของลำต้นเลื้อยขนานนั้นจะมีการแตกของใบ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปดังนี้

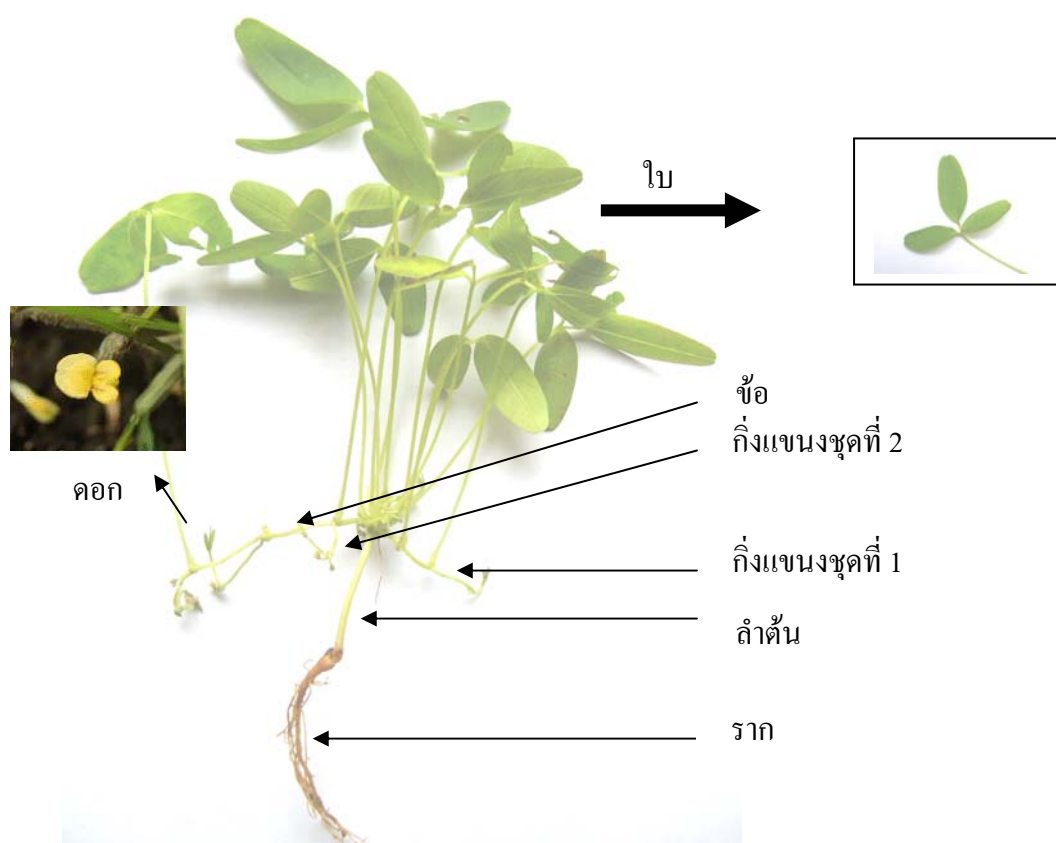
ราก (root) ถั่วหรั่งมีระบบรากแก้ว (tap root system) เมื่อเมล็ดเริ่มงอก รากแก้วที่พัฒนามาจากส่วนของ radicle จะหยั่งลึกลงไปดิน พร้อมกับมีรากแขนงแตกออกทางด้านข้าง รากจะเจริญเป็นกระจุกที่บริเวณข้อในระดับผิวดินเป็นส่วนใหญ่ และมีส่วนของปมรากเพื่อใช้ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดย *Rhizobium* (Goli, 1995)

ใบ (leave) ใบถั่วหรั่งเป็นใบประกอบแบบ trifoliate ซึ่งประกอบด้วย 3 ใบย่อย คือ terminal leaflet 1 ใบ และ lateral leaflet 2 ใบ ลักษณะผิวใบเรียบ (glabrous) เป็นร่องตรงกลางใบ (grooved) บริเวณโคนใบจะหนากว่าปลายใบ ใบมีรูปร่างคล้ายหอก (lanceolate) หรือรูปไข่ (elliptic) ที่ terminal leaflet พบหูใบ (stipule) 2 อันอยู่บริเวณฐานใบ ขนาดใบมีความกว้างเฉลี่ย 3.9 เซนติเมตร และความยาวเฉลี่ย 12 เซนติเมตร ก้านใบมีลักษณะยาวและตรง มีความยาวเฉลี่ย 12 เซนติเมตร (Linnemann and Azam-Ali, 1993) และมีสีที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ เช่น ชมพู ม่วง และ ฟ้ามอมเขียว (Goli, 1995)

ดอก (flower) ถั่วหรั่งมีช่อดอกแบบ raceme เกิดตามมุมใบและข้อของลำต้นเลื้อยขนาน ดอกย่อยเป็นแบบ papilionaceous คล้ายกับพืชตระกูลถั่วชนิดอื่น ๆ คือ มีกลีบดอก 5 กลีบที่มีขนาดไม่เท่ากัน เรียกว่า standard 1 อัน wings 2 อัน และ keel 2 อัน ซึ่งอยู่แยกกันอย่างอิสระทำหน้าที่ห่อหุ้มเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ดอกย่อยมีขนาดเล็กมีความกว้างเฉลี่ย 0.4 เซนติเมตร มีความยาวเฉลี่ย 0.6 เซนติเมตร (Linnemann and Azam-Ali, 1993) กลีบดอกมีสีเหลืองอ่อนไปจนถึงเหลืองปนน้ำตาล ขึ้นกับสายพันธุ์ แต่ละดอกย่อยประกอบด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบที่มีฐานเชื่อมติดกัน โดยแต่ละช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อยจำนวน 1-3 ดอก ที่พบมากคือมีดอกย่อยจำนวน 2 ดอก ถั่วหรั่งจัดเป็นพืชผสมตัวเอง ซึ่งหลังจากที่มีการปฏิสนธิแล้วช่อดอกจะโค้งและฝังตัวลงสู่ดินและพัฒนาเป็นฝักต่อไป (Goli, 1995)

ฝัก (pod) ฝักของถั่วหรั่งเกิดเป็นฝักเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มตามลำต้น โดยหลังจากมีการผสมพันธุ์ก้านดอกจะยึดตัวออกในช่วงเริ่มต้นของการสร้างฝักและแทงลงสู่ดิน ทำให้มีการพัฒนาของฝักอยู่ใต้ดินเช่นเดียวกับถั่วลิสงฝักอ่อนผิวเรียบมีสีขาว เมื่อถึงระยะสุกแก่ฝักจะมีรอยย่นและเปลือกฝักหนาและแข็งมากขึ้นแต่ไม่แตกออกจากกันมีสีน้ำตาล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-2.0 เซนติเมตร (Linnemann and Azam-Ali, 1993) โดยปกติแล้วใน 1 ฝักจะประกอบด้วย 1-2 เมล็ด (Goli, 1995)

เมล็ด (seed) เมล็ดถั่วหรั่งมีลักษณะผิวเรียบ มีรูปร่างค่อนข้างกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเมล็ดประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร ผิวเมล็ดเรียบ เมื่อเมล็ดแก่จัดจะแข็งเนื่องจากมีเปลือกเมล็ดค่อนข้างแข็งและหนา สีเมล็ดจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ เช่น สีครีม แดง ดำ หรืออาจมีลายบริเวณกึ่งกลางเมล็ดมีส่วนของ hilum ที่มีสีขาว แต่อาจพบว่ามีแนววงกลมสีดำอยู่รอบ hilum ที่เรียกว่า black eye (Goli, 1995)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วหรั่ง

การจำแนกสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิตในโลกนี้มีอยู่มากมายหลายชนิด และไม่มีสิ่งมีชีวิตใดที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการศึกษาทางด้านชีววิทยาและนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ จึงต้องมีการจัดแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็นหมวดหมู่โดยมีหลักเกณฑ์ในการพิจารณาหลายประการ ในปัจจุบันนี้มีการใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการจำแนกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกของสิ่งมีชีวิตในสายพันธุ์ที่แตกต่างกันโดยใช้เครื่องหมาย (marker) เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างระหว่างและภายในชนิด (species) ระหว่างและภายในประชากร (population) หรือระหว่างแต่ละตัวหรือต้น (individual) เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างมี 2 ประเภท คือ

2.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker)

เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาเป็นการบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานหรือทางสรีระ ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ทำให้ผลการตรวจสอบอาจผิดพลาดได้ จึงจำเป็นต้องใช้ผู้มีความชำนาญพิเศษและต้องมีวิธีการที่จะบอกจีโนไทป์ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ที่ตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะเป็นการตรวจสอบที่มีความคลาดเคลื่อนได้ง่ายแต่ยังมีความจำเป็นที่ต้องทำในอันดับแรก จากนั้นจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น (สุรินทร์, 2545)

2.2 เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker)

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีนซึ่งเป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และระดับดีเอ็นเอซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2.2.1 เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนต่าง ๆ ในแต่ละสิ่งมีชีวิต ได้แก่ ไอโซไซม์ (isozyme) ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ต่างชนิดกันที่ทำหน้าที่เดียวกันและอัลโลไซม์ (allozyme) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ผลิตจากอัลลีลที่ต่างกันจากยีนเดียวกัน

การตรวจสอบความแตกต่างของโปรตีนนี้อาศัยหลักการของความสามารถในการเคลื่อนตัวของโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งเอนไซม์แต่ละแบบจะมีความสามารถในการเคลื่อนตัวผ่านเจลไม่เท่ากัน ทำให้เกิดความแตกต่างของแถบโปรตีนในสิ่งมีชีวิตที่มีโปรตีนต่างแบบกัน ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือ สามารถตรวจสอบได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก เป็นเครื่องหมายแบบ codominant marker คือ สามารถตรวจสอบอัลลีลที่เป็นโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ชนิดของเอนไซม์ที่เป็นไอโซไซม์ ที่สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างนั้นมีจำนวนจำกัดและสิ่งแวดล้อมและระยะของการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตมีผลต่อการเกิดขึ้นของแถบโปรตีนด้วย (สุรินทร์, 2545)

2.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นเครื่องหมายที่บ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหรือต้นหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง ชนิดหนึ่ง หรือในระดับต่างชนิด เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือ ดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้ เนื่องจากความแปรปรวนของ นิเวศิโอไทป์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือการเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอในแต่ละสิ่งมีชีวิต

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีมากกว่าการตรวจสอบในระดับโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บได้นาน ทำให้สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บเป็นเวลานานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบในเซลล์เกือบทุกเซลล์ จึงสามารถตรวจสอบ ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใดและระยะการเจริญเติบโตใดก็ได้โดยสภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อการผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545)

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอต้องอาศัยเทคนิคการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นั้นถูกพัฒนาขึ้นใช้ครั้งแรกกับมนุษย์โดย Jeffreys *et al.* ในปี ค.ศ. 1985 เพื่อบ่งชี้ความจำเพาะของแต่ละบุคคล โดยสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วตรวจหาความแตกต่างที่เกิดขึ้นของลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือโพลิมอร์ฟิซึมด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอที่เป็นมินิแซเทลไลต์ (minisatellite DNA) เป็นตัวตรวจสอบ (probe) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซมที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นั้นมีการถ่ายทอดตามกฎของเมนเดล จึงสามารถใช้ในการพิสูจน์บุคคลเพื่อบอกความสัมพันธ์

ระหว่างพ่อแม่กับลูกและสามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ (สุรินทร์, 2540)

ในปัจจุบันเทคนิคในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เทคนิคที่อาศัยหลักการ hybridization (Soller and Beckman, 1983) และเทคนิคที่อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) (Welsh and McClelland, 1990; William *et al.*, 1990)

1. เทคนิคที่ตรวจหาโดยวิธี hybridization มีเพียงเทคนิคเดียว คือ อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จดจำลำดับเบสของดีเอ็นเอและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจดจำ เทคนิคเริ่มจากการตัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำไปแยกขนาดบนแผ่นเจลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและถ่ายดีเอ็นเอลงบนแผ่นกรอง (membrane filter) ด้วยวิธี Southern blot แล้วตรวจหาการเข้าคู่กันของตัวตรวจสอบ (probe) ที่ติดฉลาก ที่มีความจำเพาะกับจีโนมดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ บนแผ่นกรองนั้น (วิสุทธิ และคณะ, 2530) ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากการกลายที่ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์หรือมีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของเบส เทคนิคอาร์เอฟแอลพีนี้มีคุณสมบัติที่ดีคือเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ codominant marker คือ สามารถตรวจสอบอัลลีลที่เป็นโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ ตรวจสอบได้ในทุกส่วนของพืช จำนวนของตัวตรวจสอบมีจำนวนไม่จำกัด แต่มีข้อเสียคือวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูง (พัฒนา, 2539; สุรินทร์, 2545)

2. เทคนิคที่อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคพีซีอาร์เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาอันรวดเร็ว เป็นเทคนิคที่ค้นพบโดย Saiki *et al.* (1985) ที่ประยุกต์วิธีการมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต (DNA replication) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ชนิดที่ทนความร้อนสูงได้ ประกอบด้วยการทำงาน 3 ขั้นตอนคือ การทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เสียสภาพ (denature) แยกตัวเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อนสูง จากนั้นลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วในขั้นต่อมา เพื่อให้ไพรเมอร์ (primer) หรือดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่มีเบสคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาจับคู่กับชิ้นดีเอ็นเอนั้น (annealing) และขั้นตอนสุดท้ายเปลี่ยนอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอนหรือ 1 รอบ โมเลกุลของดีเอ็นเอ

เป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลาย ๆ รอบจะมีดีเอ็นเอ 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (สุรินทร์, 2545) สำหรับเทคนิคที่อาศัยหลักการพีซีอาร์นี้มีหลายเทคนิคที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่

2.1 เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดย Williams *et al.* ในปี 1990 เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้น ๆ ความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์และมีลำดับเบสเป็นแบบสุ่มไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนและแสดงผลในรูปของการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งหนึ่ง ๆ คุณสมบัติที่สำคัญของการใช้เทคนิคนี้คือ สะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบสที่เฉพาะเจาะจงของดีเอ็นเอ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย มีดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ dominant marker คือ อาจสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้เฉพาะบางอัลลีลเท่านั้น ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลที่เป็นโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ (สุรินทร์, 2545)

2.2 เทคนิคเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) เป็นเทคนิคที่รวบรวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าไว้ด้วยกัน เริ่มจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดและต่อเข้ากับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสอง แล้วเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adapter นั้น ๆ คุณสมบัติที่สำคัญของเทคนิคนี้คือสามารถตรวจสอบความแตกต่างได้สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย มีดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้งแบบ codominant และ dominant marker แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ วิธีการยุ่งยากและซับซ้อน (สุรินทร์, 2545)

2.3 เทคนิคเอสทีเอส (Sequence Tagged Site, STS) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของตำแหน่งเฉพาะในจีโนมมาออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นใช้หลักการของพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอแล้วนำไปแยกความแตกต่างโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งความแตกต่างนั้นเกิดจากการเพิ่มหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ในบริเวณจำเพาะนั้น เทคนิคนี้มีคุณสมบัติที่มีความสำคัญคือ มีความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายบนจีโนม และมีดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ codominant marker แต่มีข้อจำกัดคือต้องมีข้อมูลลำดับเบสสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ (สมวงษ์, 2540)

2.4 เทคนิคเอสเอสซีพี (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP) เป็นการตรวจหาความแตกต่างของลำดับเบสในระดับดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะแล้วอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-strand DNA) บนแผ่นเจล เนื่องจาก

รูปร่างของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ขดหรือพันกันเกิดเป็นโครงสร้างที่จำเพาะ จะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนแผ่นเจล ข้อดีของเทคนิคนี้คือมีดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ codominant marker และสามารถตรวจสอบได้แม้เกิดการกลายเพียงตำแหน่งเดียว (สุรินทร์, 2545)

2.5 เทคนิคซีเอฟแอลพี (Cleavage Fragment Length Polymorphism, CFLP) เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นจากเทคนิคเอสเอสซีพี โดยอาศัยหลักการที่โดยทั่วไปดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะงอพับและจับกันเป็นวงเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า hairpin หรือ stem loop เนื่องจากเกิดการจับคู่กันของเบสที่เป็นคู่สมกันที่อยู่บนดีเอ็นเอสายเดียวกัน จากนั้นใช้เอนไซม์ cleavage I ซึ่งสามารถจดจำตำแหน่งและตัดสายดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่อยู่ระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวและดีเอ็นเอสายคู่ มาทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างเป็น hairpin จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กันเพิ่มขึ้นมา เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอ 2 ตัวอย่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ hairpin (สุรินทร์, 2545)

2.6 เทคนิคเอสเอสอาร์ (Simple Sequence Repeat, SSR) หรือ microsatellite เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้หลักการของการกระจายตัวของเบสซ้ำในสิ่งมีชีวิต ลักษณะที่สำคัญของเบสซ้ำนี้คือการมีลำดับเบสจำเพาะอยู่บริเวณหัวท้ายของเบสซ้ำ ซึ่งเบสจำเพาะเหล่านี้สามารถนำมาใช้สร้างเป็นไพรเมอร์ ขนาดประมาณ 20 เบส เพื่อใช้ขยายปริมาณเบสซ้ำในตำแหน่งที่ต้องการ โดยใช้หลักการของพีซีอาร์ จากนั้นนำไปแยกความแตกต่างโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำในแต่ละสิ่งมีชีวิต คุณสมบัติที่สำคัญของเทคนิคนี้ คือความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนม และจำนวนของรูปแบบของอัลลีลที่สามารถตรวจสอบได้ และเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ codominant marker (สมวงษ์, 2540)

เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP)

เทคนิคเอเอฟแอลพีเป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิคอาร์เอฟแอลพีร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ โดย Zabeau และ Vos นักวิจัยชาวเนเธอร์แลนด์ในปี ค.ศ. 1993 ซึ่งเทคนิคเอเอฟแอลพีนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส (*EcoRI*) ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส (*MseI*) ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่พอเหมาะ แล้วเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อเป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ 2 ครั้ง การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดทำให้มีข้อดีหลายประการคือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้มีขนาดพอเหมาะสำหรับ

การเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำพีซีอาร์ และยังสามารถปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้โดยปรับจำนวนเบสเพื่อคัดเลือกว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันซึ่งการใช้ไพรเมอร์คู่ผสมทั้ง 2 ชนิดจำนวนน้อยก็ทำให้สามารถเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวนมาก นอกจากนี้การใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดทำให้สามารถเลือกติดฉลากที่ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่ง และเมื่อนำไปแยกขนาดโดย denaturing polyacrylamide gel จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวทำให้วิเคราะห์ผลง่าย ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพี จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคนี้มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอนั้น นอกจากนี้ยังไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถทำได้รวดเร็วและได้ผลคงเดิม (สุรินทร์, 2545)

ขั้นตอนการทำเอเอฟแอลพี

ในการทำเอเอฟแอลพีจะมีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นแรก คือการนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดที่มีจำนวนเบสของตำแหน่งจดจำต่างกัน เอนไซม์ตัดจำเพาะมีหลายชนิด เช่น *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BglIII*, *XbaI* (6-cutter) และ *Sse 8387I* (8-cutter) ร่วมกับ *MseI* หรือ *TaqI* ซึ่งเป็นชนิด 4-cutter เอนไซม์ *MseI* มีตำแหน่งจดจำเป็น 5' – TTAA – 3' และ *TaqI* มีตำแหน่งจดจำเป็น 5' – TCGA – 3' ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ *MseI* มากกว่า เพราะตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยใช้วิธีพีซีอาร์ และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่ใช้เป็นคู่กันจะเป็น *EcoRI* เนื่องจากมีราคาถูกและตัดดีเอ็นเอได้มีประสิทธิภาพดี พบการตัดไม่สมบูรณ์น้อย

เมื่อได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะแล้วจึงเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อเป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่ง adapter จะออกแบบให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดียวมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ แต่เบสคู่ที่อยู่ในตำแหน่งถัดมาเป็นเบสคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เข้าไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถตัดได้อีก

ขั้นที่สอง คือการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสที่ปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสของบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพื่อเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอบางชิ้น ส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณที่จดจำของเอนไซม์ เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้จะต้องมีลำดับเบสที่อยู่ตรงกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรากขึ้นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจะลดลงประมาณ 4 เท่าต่อทุก เบสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3' มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification

ขั้นสุดท้าย คือ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แลบดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่แยกได้อยู่ในช่วง 50 – 100 แล็บ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรด หรืออาจตรวจสอบโดยการทำออโตเรดิโอ กราฟ หรือตรวจสอบผลด้วยการไฮบริดเซชันกับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลดรังสี (non radioactive label) หรือตรวจสอบการเรืองแสงโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automatic sequencer) (สุรินทร์, 2545; Vos *et al.*, 1995)

ความแตกต่างระหว่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกว่า 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ ผลที่ได้จากการทำเอเอฟแอลพีสามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกคู่ของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่าไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ หรือเกิดจากชิ้นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ผลที่เกิดขึ้นคือ การมีแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป (สุรินทร์, 2545)

การประยุกต์ใช้เทคนิคเอฟแอลพี

เนื่องจากเทคนิคเอฟแอลพีสามารถทำให้เกิดโพลีเมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก จึงนิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง การจดทะเบียนพันธุ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม การติดตามยีนและการทำแผนที่จีโนม

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เทคนิคเอฟแอลพีสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันได้ เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ในถั่ว azuki (*Vigna angularis*) ระหว่างสายพันธุ์ป่า สายพันธุ์ปลูก และถั่วที่เป็นวัชพืช ด้วยเทคนิคเอฟแอลพี พบว่า ภายในกลุ่มตัวอย่างเดียวกันมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดมากกว่าภายนอกกลุ่มตัวอย่าง สายพันธุ์ปลูกมีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับวัชพืชมากกว่าสายพันธุ์ป่ากับวัชพืช และยังสามารถใช้จำแนกความแตกต่างของพันธุ์จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ได้อีกด้วย (Xu *et al.*, 2000) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum* (Desf.) Husn.] จำนวน 13 สายพันธุ์ที่จดทะเบียนเป็น Canadian durum wheat ด้วยเทคนิคเอฟแอลพี สามารถจัดกลุ่มความหลากหลายของตัวอย่างเป็น 3 กลุ่มตามแหล่งปรับปรุงพันธุ์ (breeding regions) ที่แตกต่างกัน (Soleimani *et al.*, 2002) และการศึกษาในต้น cattail (*Typha* spp.) 2 ชนิด คือ *T. latifolia* และ *T. angustifolia* ที่มาจากตอนเหนือของประเทศเบลเยียมด้วยเทคนิคเอฟแอลพี สามารถใช้เทคนิคนี้จัดกลุ่มตัวอย่างได้โดยจัดแต่ละชนิดรวมเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน และพบว่าใน *T. angustifolia* ยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกจึงสันนิษฐานว่าภายใน *T. angustifolia* นี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง (Lamote *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคเอฟแอลพีบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้ เช่น Aggarwal *et al.* (1999) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชต่างชนิดในสกุลต่าง ๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด อ้อย และถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิคเอฟแอลพี ทำให้สามารถอธิบายวิวัฒนาการของพืชในสกุลนี้ได้ว่ามีบรรพบุรุษร่วมกันหรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่ถูกแยกออกจากกันในช่วงแรกของกระบวนการทางวิวัฒนาการ เกิดเป็นพืชหลายชนิดที่มีความแตกต่างกัน

2. การติดตามยีนและการทำแผนที่จีโนม

การติดตามยีนสามารถทำได้หลายวิธีซึ่งเอเอฟแอลพีก็เป็นวิธีหนึ่งที่สะดวกและรวดเร็วในการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ชิดกับยีน โดยนิยมใช้ร่วมกับเทคนิค bulked segregant analysis ซึ่งยีนที่ศึกษาส่วนใหญ่จะเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ยีนต้านทานหญ้าแม่มด (*Striga gesnerioides* (Wild) Vatke.) ซึ่งเป็นพarasit ในถั่ว cowpea (*Vigna unguiculata* L.) ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีร่วมกับเทคนิค bulked segregant analysis โดยการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อพarasit (IT82D-849) และสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อพarasit (TVX 3236) แล้วทำการศึกษาในชั่วที่ 2 ซึ่งเป็นชั่วที่มีการกระจายของทั้ง 2 ลักษณะ จัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะความต้านทานต่อพarasit ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ทำให้สามารถบอกตำแหน่งเครื่องหมายที่อยู่ชิดกับยีน *Rsg2-1* ที่ต้านทาน *S. gesnerioides* race 1 และยีน *Rsg4-3* ที่ต้านทาน *S. gesnerioides* race3 (Ouedraogo *et al.*, 2001), การหาตำแหน่งยีน *Rsv3* ต้านทานไวรัส SMV (soybean mosaic virus) ในถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merr.] ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีร่วมกับ bulked segregant analysis ซึ่งพบว่าตำแหน่งของเครื่องหมายที่อยู่ชิดกับยีน *Rsv3* บนโครโมโซมที่ 2 ของถั่วเหลือง โดยขนานข้างด้วยเครื่องหมาย A519 และ Mng247 (Jeong *et al.*, 2002) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Bai *et al.* (2003) เพื่อหาตำแหน่งยีนที่ต้านทานต่อโรค wheat head blight ที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium graminearum* Schwab. ในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีร่วมกับเทคนิคเอสเอสอาร์ และพบว่ายีนต้านทานมีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 3BS ของข้าวสาลี ใกล้กับเครื่องหมาย Ning7840 และการศึกษาหาตำแหน่งของยีนเพิ่มคุณภาพผลผลิต เช่น ยีน *Beta* (B) และ *Beta* modifier (MO_B) ที่มีผลในการเพิ่มการสะสมสารเบต้าแคโรทีนในมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculenta* Mill) ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี (Zhang and Stommel, 2002)