

การศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียว

Inheritance of Phytic Acid Content in Seed of Mungbean

(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

คำนำ

ภาวะทุพโภชนาการเป็นปัญหาที่สำคัญยิ่งต่อการพัฒนาประเทศ การขาดธาตุเหล็กและสังกะสี เป็นภาวะทุพโภชนาการหนึ่งที่เกิดขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก สาเหตุของการขาดธาตุดังกล่าวมีหลายประการ ได้แก่ (1) การมีธาตุเหล็กและสังกะสีปริมาณน้อยในอาหาร (2) ไม่สามารถรับประทานอาหารที่มีธาตุเหล็กและสังกะสีที่เพียงพอได้ เนื่องจากธาตุทั้งสองมีมากในเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ที่มีราคาสูง และ (3) การได้รับธาตุอาหารทั้งสองเพียงพอ แต่ไม่สามารถนำไปใช้ได้ เพราะถูกขัดขวางการดูดซึม

กรดไฟติกเป็นสารชนิดหนึ่งที่ขัดขวางการดูดซึมธาตุเหล็กและสังกะสีในสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น มนุษย์ ทำให้ไม่สามารถนำกรดไฟติกมาสลายเป็นธาตุฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายได้ อีกทั้งการขับถ่ายกรดไฟติกสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำเนื่องจากฟอสฟอรัส หลายประเทศทั่วโลกจึงให้ความสนใจกับปัญหาดังกล่าว กรดไฟติกพบได้ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะผลผลิตจากพืช เพราะพืชสะสมฟอสฟอรัสในรูปกรดไฟติกเป็นส่วนใหญ่พืชที่มีปริมาณกรดไฟติกมาก ได้แก่ ธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว ซึ่งปัจจุบันได้มีการศึกษาปริมาณกรดไฟติกในอาหารที่ผ่านการปรุงในขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อหาเทคนิคการปรุงอาหารที่สามารถลดปริมาณกรดไฟติกลงได้ รวมทั้งมีการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณกรดไฟติกในธัญพืชต่าง ๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น เพื่อนำข้อมูลมาใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณกรดไฟติกที่เหมาะสมได้

ถั่วเขียวเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งผลผลิตที่นิยมนำมารับประทานคือ เมล็ดและถั่วงอก ปัจจุบันยังไม่มีผู้ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณกรดไฟติกในถั่วเขียว จึงสมควรศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้มีปริมาณกรดไฟติกที่เหมาะสมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาแหล่งพันธุกรรมเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้มีปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียว

การตรวจเอกสาร

ภาวะทุพโภชนาการ (Malnutrition)

โภชนาการที่ดีมีความสำคัญยิ่งต่อสุขภาพ แต่ในปัจจุบัน การขาดสารอาหารยังคงเป็นปัญหาสำคัญ โดยมีสาเหตุต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณแคลอรีและโปรตีนไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย ขาดความรู้เรื่องโภชนาการทำให้พฤติกรรมการรับประทานอาหารไม่เหมาะสม ขาดธาตุอาหารรอง เช่น เหล็กและสังกะสี และการติดเชื้อ เป็นต้น

ภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดธาตุเหล็ก (เหล็กเป็นองค์ประกอบสำคัญของฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นโปรตีนในเม็ดเลือดแดง) เป็นปัญหาที่มีผลกระทบต่อประชากรของประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย ปัจจุบันมีประชากรโลกประมาณ 3,000 ล้านคนหรือเกือบครึ่งหนึ่งของประชากรโลก กำลังขาดธาตุเหล็ก หากเกิดในสตรีมีครรภ์ จะทำให้อัตราการตายของแม่และลูกระหว่างคลอดสูง ถ้าเกิดในช่วงแรกของการตั้งครรภ์ จะทำให้เสี่ยงต่อการคลอดก่อนกำหนด และทารกมีน้ำหนักแรกคลอดต่ำ การขาดธาตุเหล็กในเด็กทารก ทำให้พัฒนาการทางสมองลดลง และเกิดผลเสียด้านการเรียนรู้อย่างถาวร ในเด็กวัยเรียนทำให้ประสิทธิภาพการเรียนรู้ต่ำ ขาดสมาธิ ส่วนในวัยทำงานทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานต่ำ

การขาดธาตุสังกะสีในประเทศไทยไม่พบบ่อย แต่ประชาชนในประเทศกำลังพัฒนาซึ่งรับประทานเนื้อสัตว์ค่อนข้างน้อย จะส่งผลให้ขาดธาตุสังกะสีไปพร้อม ๆ กัน เนื่องจากแหล่งของธาตุอาหารโดยเฉพาะเหล็กและสังกะสี ของประชากรในเขตชนบทของประเทศกำลังพัฒนาได้รับจากพืชผักเป็นส่วนใหญ่ การขาดธาตุดังกล่าว นอกจากทำให้ร่างกายแคระแกร็นแล้ว ยังทำให้ภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ของร่างกายบกพร่องไปด้วย เนื่องจากสังกะสีมีบทบาทสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันแก่ร่างกาย

โดยทั่วไปการขาดธาตุเหล็กและสังกะสี มีสาเหตุมาจากการได้รับธาตุทั้งสองจากอาหารประจำวันไม่เพียงพอ โดยเฉพาะในพื้นที่ชนบท เนื่องจากแหล่งของธาตุเหล็กและสังกะสีที่ดีอยู่ในเนื้อสัตว์ ตับ และเลือด ซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ การดูดซึมธาตุเหล็กและสังกะสีจะดีขึ้นเมื่ออยู่ในโปรตีนที่มีคุณภาพดีและการดูดซึมไม่ถูกขัดขวางโดยสารบางชนิด เช่น กรดไฟติก ที่สามารถจับกับ

เหล็ก สังกะสี และโปรตีน (Oberleas and Prasad, 1969) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ จึงไม่สามารถถูกดูดซึมไปใช้ได้

การควบคุมป้องกันปัญหาการขาดธาตุเหล็กและสังกะสี โดยทั่วไปทำได้ 4 วิธี คือ

1. ทำอาหารเสริมป้องกันปัญหาการขาดธาตุเหล็กและสังกะสี โดยอาจทำในรูปยาเม็ด
2. การเติมธาตุเหล็กและสังกะสีในอาหาร
3. ปรับปรุงพันธุ์พืชสำคัญให้มีธาตุเหล็กและสังกะสีสูง
4. ป้องกันการขัดขวางการดูดซึมธาตุเหล็กและสังกะสี โดยลดปริมาณกรดไฟติกในอาหารที่รับประทาน

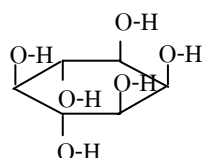
กรดไฟติก

เมล็ดพืชประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลและแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่ต่างกัน ขึ้นกับชนิดของพืช ได้แก่ โปรตีน ไขมัน แป้ง น้ำตาล วิตามิน โพแทสเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น สารแต่ละชนิดต่างก็มีความสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ของพืช ฟอสฟอรัสเป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลักของพืชนอกเหนือจากไนโตรเจนและโพแทสเซียม ฟอสฟอรัสช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต พัฒนาการของราก การออกดอกและการสุกแก่ของผลผลิตของพืช (Anon., 2004a) ฟอสฟอรัสในเมล็ดพบในรูปของสารประกอบต่าง ๆ ได้แก่ กรดไฟติก (phytic acid) สารประกอบฟอสฟอรัสอนินทรีย์ (inorganic phosphorus) ฟอสโฟลิปิด ฟอสโฟโปรตีน และกรดนิวคลีอิก (Reddy *et al.*, 1978) แต่พบฟอสฟอรัสในรูปของกรดไฟติกมากที่สุดถึงประมาณ 65-85 % ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดพืช (Coelho *et al.*, 2002; Latta and Eskin, 1980; Lott *et al.*, 2000; Raboy and Dickinson, 1993)

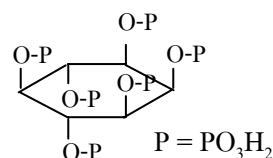
กรดไฟติก หรือ ไฟเตท มีชื่อทางเคมีว่า *myo* - inositol - 1, 2, 3, 4, 5, 6 - hexakisphosphate (InP_6) (Dorsch *et al.*, 2003) หรือ *myo* - inositol - hexakis (dihydrogenphosphate) (Haug and Lantzsch, 1983) หรือ inositol hexaphosphate (InsP_6) (Shamsuddin, 1999) หรือ inositol phosphate (Hatzack *et al.*, 2001) หรือ inositol polyphosphate (Mayr, 1988) กรดไฟติกมีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_6\text{H}_{24}\text{O}_{27}\text{P}_6$ เกิดจากปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) ของ โมเลกุล *myo* - inositol (วงของ 6 คาร์บอนอะตอมที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่ไฮดรอกซิล 6 หมู่) ดังภาพที่ 1 (Pathasathy and Eisenberg,

1990) จนได้เป็นโมเลกุลของกรดไฟติกซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2 (Ozaki and Watanabe, 1990) *myo* - inositol เป็นอนุพันธ์ของกลูโคส (Raboy, 2003) ซึ่งมีส่วนสำคัญยิ่งในกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืชดังภาพที่ 3 (Loewus and Murphy, 2000)

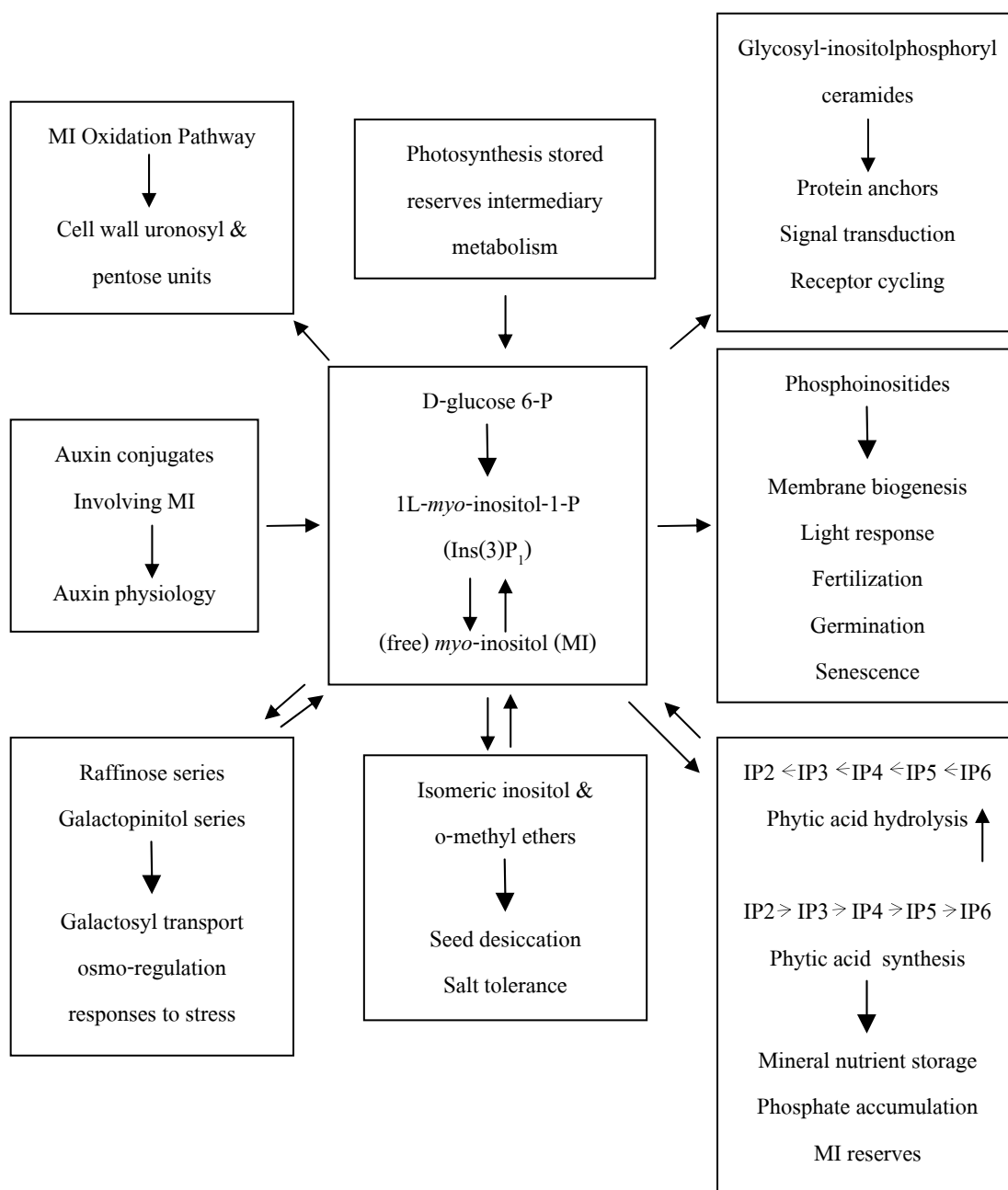
เมตาบอลิซึมของ *myo* - inositol ในพืช เริ่มต้นจาก D - glucose - 6 - P ซึ่งเป็น intermediate จาก glycolysis ถูกเปลี่ยนเป็น Ins(3)P₁ ด้วย *myo* - inositol(3) P₁ synthase (MIP) (Raboy, 2001) Ins(3)P₁ ถูกกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกด้วย MI phosphatase ได้ *myo*-inositol ซึ่งเป็น cryoprotectant ใน ladybird beetles (*Creatomegilla undecimnotata*) ในพืชทนหนาวการขนส่ง *myo* - inositol ทาง โพลีเอม เป็นการเพิ่มการขนส่ง Na⁺ ไปยังใบ และ Na⁺/MI symport ยังช่วยในการ uptake Na⁺ อีก ด้วย ปฏิกริยาดังกล่าวยังสามารถผันกลับได้ด้วย MI kinase ปฏิกริยาออกซิเดชันของ *myo* -inositol ได้ D - glucuronic acid ซึ่งใช้ในการสังเคราะห์ uronosyl และ pentosyl unit ซึ่งเป็นหน่วยย่อยใน pectin hemicellulose และโครงสร้างอื่นที่เกี่ยวข้องในผนังเซลล์พืช ปฏิกริยา esterification ของ *myo*-inositol ได้เอสเทอร์ของออกซิน หรือ IAA - MI (indole - 3 - acetic acid - *myo* - inositol) และ IAA - MI ที่ conjugate กับ galactosyl และ arabinosyl *myo* - inositol เกิด conjugate กับ UDP - D - galactose ด้วย galactinol synthase (GolS) ที่สกัดได้จากถั่วลิสงแดง (*Vigna umbellata*) ได้ galactinol ซึ่งเป็นตัวให้ galactosyl ในการสร้าง raffinose และ galactopinitol ที่ทำหน้าที่คงโครงสร้างของเซลล์พืชในสภาวะขาดน้ำ และเป็นแหล่งของคาร์บอนในช่วงแรกของกระบวนการงอก (Karner *et al.*, 2004) ปฏิกริยา isomerization และ methylation ของ *myo* - inositol ได้อนุพันธ์ต่าง ๆ เช่น O - methyl inositol, sequeoyitol, bornesitol, pinitol และ ononitol เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม การสังเคราะห์กรดไฟติกและ phytic acid pyrophosphates เกิดที่ cisternal endoplasmic reticulum เริ่มศึกษาใน duck weed (*Spirodela polyrhiza*) และ slime mold (*Dictyostelium*) ดังภาพที่ 4 จนในปัจจุบันสามารถสรุปเป็น pathway การสังเคราะห์กรดไฟติกในพืชได้ดังภาพที่ 6 สาร intermediate ตัวหนึ่งคือ phosphatidylinositol ซึ่งใช้ใน signal transduction ของเซลล์พืช



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของ *myo*-inositol
ที่มา: อรุณธรรม (2543)

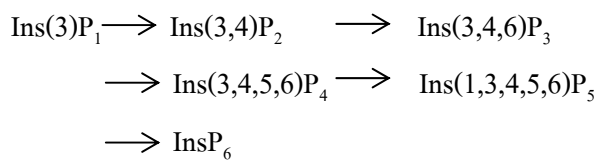
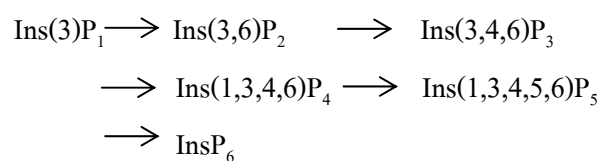


ภาพที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของกรดไฟติก
ที่มา: อรุณธรรม (2543)

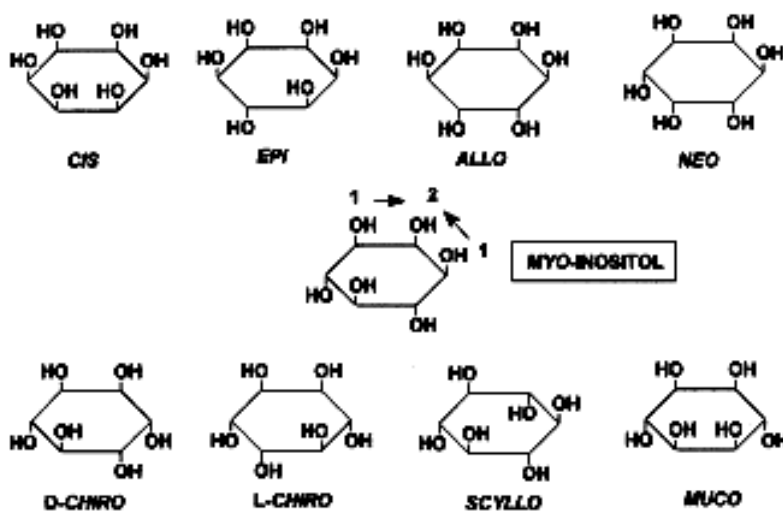


ภาพที่ 3 เมตาบอลิซึมของ *myo*-inositol ในพืช

ที่มา : Loewus and Murphy (2000)

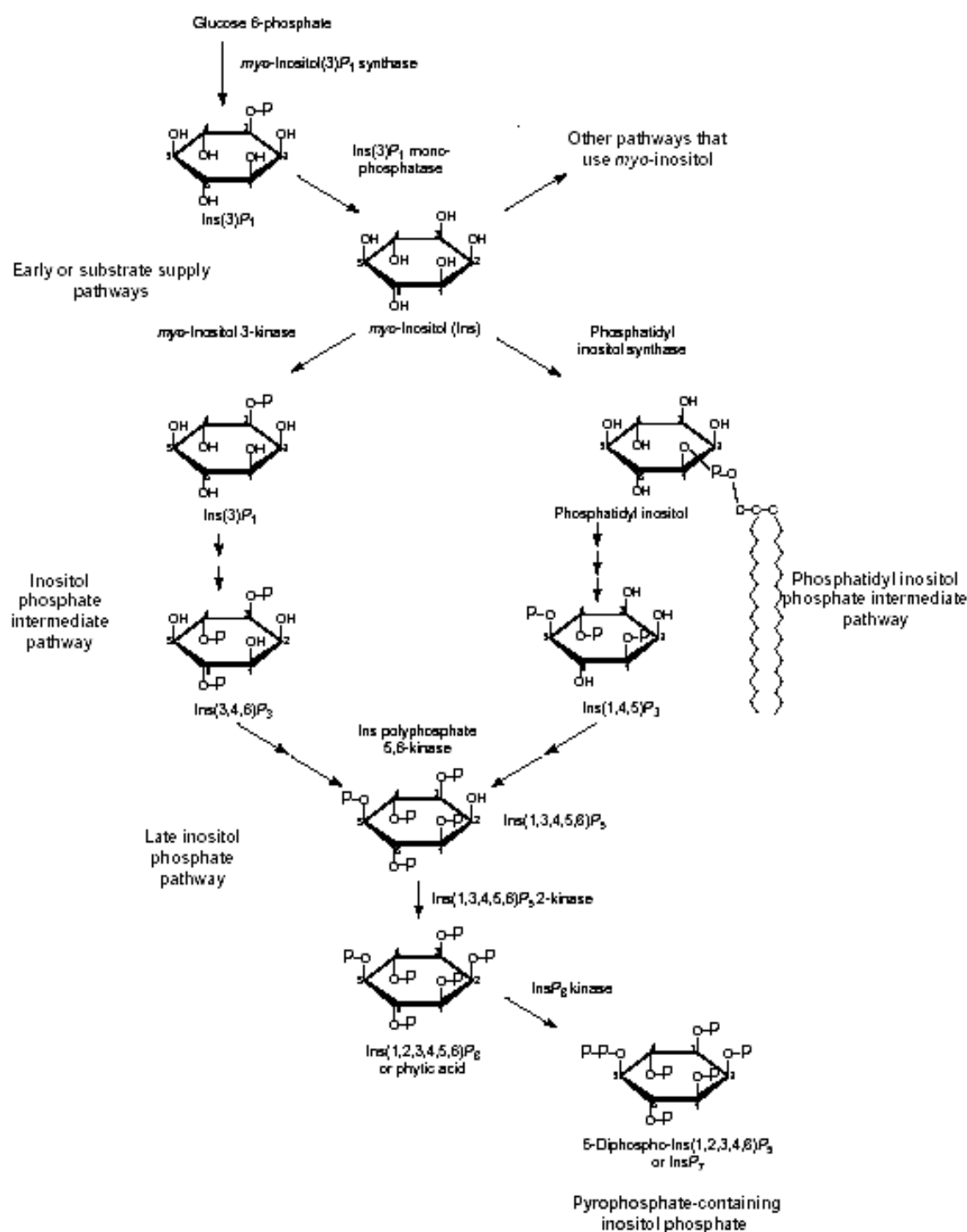
Spirodela polyrrhiza***Dictyostelium***

ภาพที่ 4 การสังเคราะห์กรดไฟติกใน duck weed (*Spirodela polyrrhiza*) และ slime mold (*Dictyostelium*)
ที่มา : Loewus and Murphy (2000)



ภาพที่ 5 isomeric inositols

ที่มา : Loewus and Murphy (2000)

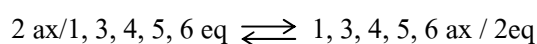
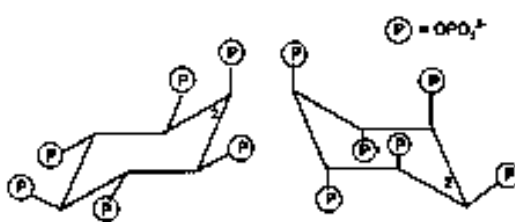


ภาพที่ 6 การสังเคราะห์กรดไฟติกในพืช

ที่มา : Raboy (2003)

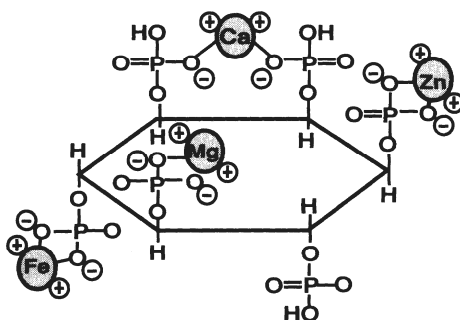
กรดไฟติกมี 9 isomer ดังภาพที่ 5 โดยมีทั้ง diastereomer และ enantiomer แต่ที่พบในพืช ได้แก่ *myo*-, *scyllo*-, *muco*-, *neo*-, *D-chiro*- และ *L-chiro*- ซึ่ง isomer ดังกล่าวถูกสร้างขึ้นจาก เมตาบอลิซึมของ *myo* - inositol โดยบาง isomer เกิดขึ้นอย่างจำเพาะในบาง species เช่น 1D-4-*O*-methyl-*chiro*-inositol หรือ pinitol ในกระบวนการสร้าง stachyose ด้วย stachyose synthase ซึ่งสกัดได้จาก adzuki bean (*Vigna angularis*)

กรดไฟติกมี 2 conformation ที่ต่างกันในรูปแบบโมเลกุลและทิศทางตำแหน่งของหมู่ ฟอสเฟต ดังภาพที่ 7 โดย conformation แบบ 1ax/5eq (มี ฟอสเฟต 1 หมู่ออยู่ในแนว axial และ 5 หมู่ออยู่ในแนว equatorial) จะพบเมื่อกรดไฟติกอยู่ในสารละลายที่มี pH 1.0-9.0 ส่วน conformation แบบ 5ax/1eq (มี ฟอสเฟต 5 หมู่ออยู่ในแนว axial และ 1 หมู่ออยู่ในแนว equatorial) จะพบเมื่อกรดไฟติกอยู่ในสารละลายที่มี pH มากกว่า 9.5 แต่ถ้า pH อยู่ระหว่าง 9.0 - 9.5 ซึ่งเป็นช่วงของ pKa ของกรดไฟติก จะพบทั้งสอง conformation ในสมดุลไดนามิก แต่ถ้าระบบมี counter ion ขนาดใหญ่ เช่น tetramethylammonium (TMA) และ tetrabutylammonium (TBA) จะพบกรดไฟติกใน conformation เดียว คือ แบบ 1ax/5eq เพราะเกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนดังกล่าวจนไม่สามารถ เปลี่ยน conformation (ring inversion) ได้



ภาพที่ 7 phytic acid conformations

ที่มา : Loewus and Murphy (2000)



ภาพที่ 8 เกลือไฟเตท

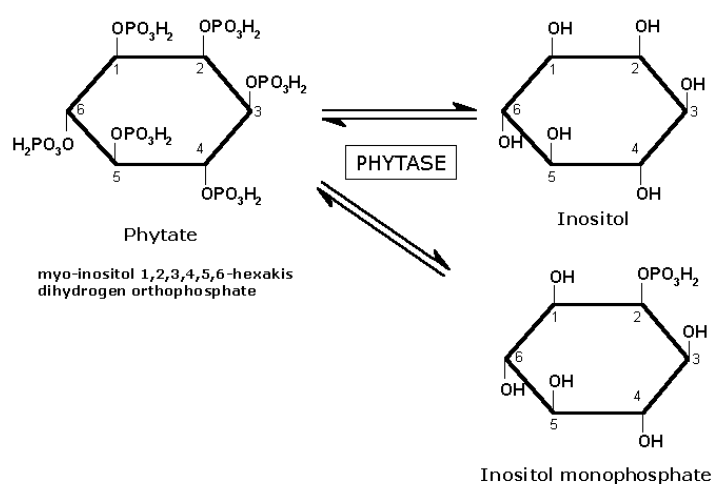
ที่มา : Kley (2006)

โมเลกุลของกรดไฟติกมีสภาพขั้วสูงจึงสามารถละลายน้ำได้ มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน สามารถแตกตัวให้ไฮโดรเจนอะตอมหลุดออกมาจากหมู่ฟอสเฟตได้ 12 อะตอม (จากหมู่ฟอสเฟต 6 หมู่ ที่มีไฮโดรเจนหมู่ละ 2 อะตอม) ทำให้เกิดประจุลบในโมเลกุล จึงจับกับประจุบวกได้ดี เช่น โพแทสเซียมไอออน (K^+) แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) แมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) สังกะสีไอออน (Zn^{2+}) และ เหล็กไอออน (Fe^{2+} และ Fe^{3+}) เป็นต้น โดยเฉพาะประจุบวกที่มีสภาพไอออนหลายค่า (polyvalent) จะถูกกรดไฟติกจับได้ดีกว่าประจุบวกที่มีสภาพไอออนค่าเดียว (monovalent) (Lott *et al.*, 2000) จึงทำให้กรดไฟติกเป็นตัวจับประจุบวก (chelator) ที่ดี (Talamond *et al.*, 2000) ดังภาพที่ 8 ได้เกลือไฟเตทที่ไม่ละลายน้ำที่ pH เป็นกลางและเป็นเบส ดังเช่นในลำไส้คน และย่อยสลายได้ยาก ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมทั้งกรดไฟติกและธาตุที่ถูกกรดไฟติกจับไว้ไปใช้ประโยชน์ได้ (Makower, 1970)

การควบคุมการสังเคราะห์กรดไฟติกในพืชเกิดได้ 2 ทาง คือ ทางแรก เมื่อเกิด photoassimilates มาก ๆ จะทำให้เกิดฟอสฟอรัสเคลื่อนย้าย (translocate) ไปยังเมล็ด และสะสมในรูปกรดไฟติก และทางที่สอง คือ เกิด partition ของสารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดไฟติกในเมล็ดที่กำลังพัฒนา ทำให้สร้างกรดไฟติกขึ้น (Coelho *et al.*, 2002) กรดไฟติกจะสะสมในรูปของไฟติน (phytin) ซึ่งเป็นเกลือของ K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Zn^{2+} โดยสะสมในรูปของ globoid ซึ่งเป็นกลุ่มของโมเลกุลที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง รวมตัวกันเป็นอนุภาคกลม ๆ (electron dense sphere) กระจายอยู่ใน proteinaceous matrix ของ protein bodies ลักษณะเป็นถุงที่มีเยื่อหุ้มชั้นเดียว (microvacuoles) ที่มีโครงสร้างประกอบด้วย H^+ -pyrophosphatase ขนาดและปริมาณของ globoid จะสัมพันธ์กับอัตราส่วนของแมกนีเซียมและแคลเซียมต่อโพแทสเซียมในเมล็ด จึงเชื่อว่า ประจุบวก

เหล่านี้จะเกิดเป็น multivalent cation ที่จับกับประจุลบบนหมู่ฟอสเฟตบนโมเลกุลกรดไฟติก จึงเกิดเป็น globoid ที่เสถียรอยู่ได้ อย่างไรก็ตาม globoid ไม่ได้เป็นโครงสร้างเดียวที่ใช้สะสมกรดไฟติก (static storage structure) เพราะเมื่อปรากฏภายใน globoid เปลี่ยนแปลง จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายใน globoid ในระหว่างการสร้างเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้ ในระยะนี้ globoid ใน cotyledon cell จะเจริญเป็น 4 เท่าของเดิมในเมล็ดโดยวัดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (Lott *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่า กระบวนการ chilling มีผลต่อการเคลื่อนย้ายหมู่ฟอสเฟตและการสะสมของกรดไฟติกในเมล็ดของ *Prunus cerasus* (Vasilios *et al.*, 2005)

กรดไฟติกจะสะสมมากในเมล็ด และพบในปริมาณน้อยในราก หัว ละอองเรณู (Bohn *et al.*, 2004, Bryant *et al.*, 2005, Dorsch *et al.*, 2003, Ockenden *et al.*, 2004, Raboy and Dickinson, 1993 and Wilcox *et al.*, 2000) และ ยอดและคอเกสรตัวเมีย (Jackson *et al.*, 1983) ในเมล็ดของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะพบกรดไฟติกสะสมอยู่บริเวณ aleurone และ scutellum (Liu *et al.*, 2005 and Lin *et al.*, 2005) ส่วนในเมล็ดของพืชใบเลี้ยงคู่จะพบที่ endosperm และ cotyledon (Pederson *et al.*, 2002 and Bohn *et al.*, 2004) กรดไฟติกจะถูกตัดหมู่ฟอสเฟตออกในระหว่างการงอก (Kerovuo *et al.*, 2000 and Hegeman and Grabau, 2001) เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่นที่สามารถย่อยสลายกรดไฟติกได้ด้วยเอนไซม์ไฟเตสดังภาพที่ 9 (Veum *et al.*, 2002) ที่พบมากในวัว ควาย พืช (Oltman *et al.*, 2004 and Guttieri *et al.*, 2004) และราบางชนิด เช่น *Aspergillus niger* (Li *et al.*, 1997) ซึ่งใช้สกัดเอนไซม์ไฟเตสมาเติมในอาหารสัตว์ แต่ไม่พบเอนไซม์ไฟเตสในสัตว์กระเพาะเดี่ยวได้แก่ มนุษย์ สัตว์ปีก และปลา เป็นต้น



ภาพที่ 9 การย่อยสลายเกลือไฟเตดด้วยเอนไซม์ไฟเตส

ที่มา : Loewus and Murphy (2000)

นอกจากกรดไฟติกจะเป็นโมเลกุลที่ใช้สะสมฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชแล้ว ยังมีประโยชน์ในระดับเซลล์ ได้แก่

1. เป็นสารที่เก็บสะสมพลังงาน เช่นเดียวกับ ATP (Talamond *et al.*, 2000)
2. เป็นสารกระตุ้นให้เมล็ดพักตัว (Reddy *et al.*, 1978)
3. อนุพันธ์ของกรดไฟติกช่วยใน signal transduction ของฮอร์โมน growth factor neurotransmitters (Xizhang, 2004)
4. ควบคุม Ca^{2+} ion channel ในเซลล์กลุ่มที่ปากใบ (Xu *et al.*, 2005)
5. inositol pyrophosphate เช่น InsP_6 , InsP_7 และ InsP_8 พบทั่วไปในเซลล์ยูคาริโอต ทำหน้าที่เป็นผู้ให้ฟอสฟอรัสเพื่อสร้าง ATP จาก ADP (Raboy, 2001)
6. มีหน้าที่ใน DNA double-strand break repair (Raboy, 2001)
7. มีหน้าที่ช่วยขนส่ง mRNA ออกจากนิวเคลียส (Raboy, 2001)

นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในแง่อื่น ๆ อีก ได้แก่

1. เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Coelho *et al.*, 2002; Lott *et al.*, 2000; Talamond *et al.*, 2000) โดยพบว่า เมื่อนำรังสีแกมมาให้แก่อาหาร เพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหารจากเชื้อจุลินทรีย์โดยไม่ทำลายคุณค่าทางโภชนาการ จะทำให้กรดไฟติกมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ โดยวัดจากค่า ferric reducing/antioxidant power (FRAP) แต่ยังมีค่า FRAP ที่ต่ำกว่า วิตามินซี วิตามินอี และ BHA (butylated hydroxyl anisole) ซึ่งเป็นสารกันหืนที่ใช้กันทั่วไป แต่จะยับยั้ง lipid oxidation ได้ดีกว่าสารกันหืนทั้งสามชนิดดังกล่าว (Ahn *et al.*, 2004)
2. เป็นสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Talamond *et al.*, 2000)
3. เป็นสารต้านมะเร็ง (anti-cancer) (Lott *et al.*, 2000; Shamsuddin, 1999) เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Coelho *et al.*, 2002)
4. ใช้เป็น displacer ในการทำให้บริสุทธิ์ แยกและหาปริมาณ โปรตีนในสารผสมของโปรตีนด้วย anion-exchange displacement chromatography (Luo and Andrade, 2000)

แต่เนื่องจากไม่พบเอนไซม์ไฟเตสในมนุษย์และสัตว์กระเพาะเดี่ยว ดังนั้น เมื่อกรดไฟติกเข้าสู่ร่างกายจึงไม่สลายให้ฟอสฟอรัส แต่จะจับกับแร่ธาตุพวก สังกะสี แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และโปรตีน ที่บริเวณลำไส้เล็ก เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมได้ จึงเป็นปัญหาสุขภาพโภชนาการในปัจจุบัน นอกจากนี้ เมื่อสัตว์ขับถ่ายสารประกอบเชิงซ้อนนี้ออกมา จะทำให้เกิดมลภาวะทางน้ำ ดังเช่นในยุโรปและอเมริกา (Raboy, 2002 and Ertl *et al.*, 1998) โดยพบว่า ในแหล่งน้ำธรรมชาติ หากมีการปนเปื้อนของฟอสฟอรัสในปริมาณสูง จะเป็นปัจจัยสำคัญในการจำกัดการเจริญเติบโตของแพลงตอนก่และสาหร่าย ทั้งยังทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำลง เกิดน้ำเน่าเสียได้ (Sugiura *et al.*, 1999)

ดังนั้น กรดไฟติกจึงเป็นสารที่ทำให้ทั้งประโยชน์และโทษ ทำให้มีการศึกษาการลดปริมาณกรดไฟติกให้เหลือปริมาณที่เหมาะสมในอาหารพวกธัญพืชต่าง ๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ และถั่วเขียวผิวดำ (black gram) โดยให้ฟอสฟอรัสสะสมในรูปอื่นแทน เพื่อแก้ไขปัญหาสุขภาพโภชนาการดังกล่าวไว้ข้างต้น

ถั่วเขียว (mungbean)

ถั่วเขียวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna radiata* (L.) Wilczek อยู่ในสกุล *Vigna* ซึ่งมี 7 subgenera พืชสกุลนี้มีถิ่นกำเนิดอยู่ใน 3 ทวีป ได้แก่ เอเชีย แอฟริกา และ อเมริกา โดย subgenus ที่มีความสำคัญที่สุด คือ *Ceratotropis* ซึ่งประกอบด้วย ถั่วเขียวผิวดำ หรือ blackgram (*V. mungo*) ถั่วเขียวนางแดง หรือ rice bean (*V. umbellata*) adzuki bean (*V. angularis*) mothbean (*V. aconitifolia*) และ ถั่วเขียว หรือ mungbean (*V. radiata*) ซึ่งเป็นพืชไร่ที่สำคัญของประเทศที่กำลังพัฒนา มีอายุสั้น ต้องการน้ำน้อย จึงสามารถเจริญเติบโตได้แม้ในที่แห้งแล้ง

ถั่วเขียวมีสารอาหารที่สำคัญ ดังนี้ (เพิ่มพูน, 2531)

1. แป้ง ถั่วเขียวมีแป้งเป็นปริมาณสูงกว่าถั่วชนิดอื่น ๆ จึงสามารถนำไปทำเป็นแป้งถั่วเขียวในอุตสาหกรรมได้ โดยทำเป็นแป้งผงสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร หรือใช้ทำขนม เช่น สลิม ส่วนที่เป็นแป้งสาคูใช้ในอุตสาหกรรมวันเส้น ซึ่งจะเป็นวันเส้นชั้นดี เนื้อใส เส้นมีความสม่ำเสมอ ไม่เปื่อยยุ่ยง่าย แม้จะแช่น้ำไว้นาน ๆ ก็ตาม

2. โปรตีน ถั่วเขียวใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนได้ ถ้ามีการผลิตอาหารจากถั่วเขียวทั้งเมล็ดสามารถทำเป็นอาหารเสริมโปรตีนต่าง ๆ สำหรับคน หรือทำเป็นอาหารสัตว์ อาหารโปรตีนเหล่านี้จะช่วยแก้ภาวะทุพโภชนาการของประเทศกำลังพัฒนา นอกจากนี้ ในชนบทหรือท้องถิ่นที่ขาดแคลนอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ก็สามารถรับประทานถั่วเขียวเป็นอาหารเสริมทดแทนได้

3. วิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินซี โพแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และแคลเซียม

นอกจากนี้ ถั่วเขียวยังเป็นพืชตระกูลถั่วที่ให้ความอุดมสมบูรณ์แก่ดิน เนื่องจากขบวนการตรึงไนโตรเจน ซึ่งเป็นกิจกรรมของเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว ทำให้สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาแปรสภาพเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ และเมื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นถั่วอันได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และฝัก เน่าเปื่อยในดิน จะทำให้มีปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์วัตถุสูงขึ้น เป็นประโยชน์ต่อพืชที่ปลูกร่วมหรือพืชที่ปลูกตามหลัง (เพิ่มพูน, 2531)

ถั่วเขียวที่ปลูกกันในปัจจุบันนี้ เชื่อว่ามีถิ่นกำเนิดในประเทศพม่าและอินเดีย ต่อมาจึงแพร่กระจายไปยังทวีปต่าง ๆ ของโลก สำหรับประวัติที่มาของถั่วเขียวในประเทศไทย ยังไม่มีผู้ใดทราบว่าเริ่มปลูกตั้งแต่เมื่อใด แต่มีบันทึกการปลูกถั่วเขียวในประเทศไทยเท่าที่มีหลักฐานเก่าแก่ที่สุดในปี พ.ศ. 2480 ว่าขุนเพ่งจินานุเคราะห์ได้เขียนถึงการทำไร่ถั่วเขียวในจังหวัดสวรรคโลก (จังหวัดสุโขทัยในปัจจุบัน) ต่อมาราวปี พ.ศ. 2503 ได้มีการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวขึ้นเป็นครั้งแรกจำนวน 4 พันธุ์ ที่สถานีกลีกรมศรีสำโรง พบว่า ให้ผลผลิตสูงถึง 132 กก./ไร่ เมื่อถึงปี พ.ศ. 2512 กรมกลีกรมได้เริ่มรวบรวมพันธุ์ถั่วเขียวจำนวน 12 พันธุ์ ปลูกศึกษาที่สถานีกลีกรมแม่โจ้ และบ้านใหม่สำโรง ปรากฏว่า มี 2 พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ปี 2514 มีการศึกษาพันธุ์ M-7-A ที่สถานีกลีกรมอุทอง พบว่า ให้ผลผลิตสูงสม่ำเสมอ จึงตั้งเป็นพันธุ์อุทอง 1 กลายเป็นพันธุ์ส่งเสริมในปี 2519 ต่อมาปี พ.ศ. 2528 ได้มีรายงานผลทดสอบเสถียรภาพของถั่วเขียวหลายพันธุ์ ซึ่งทดสอบที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน และสถานีวิจัยสุวรรณวาจกกสิกิจ จนพบ 2 พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง คือ VC1973A และ VC2278A และได้รับการคัดเลือกต่อมาจนได้เป็นถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 ที่มีฝักชูขึ้นเหนือพุ่มใบ ทำให้เก็บเกี่ยวได้ง่าย และกำแพงแสน 2 ที่มีผลผลิตต่ำกว่ากำแพงแสน 1 เล็กน้อย แต่เมล็ดสีเขียวเข้มกว่า จึงเป็นที่ต้องการของพ่อค้าถั่วเขียว และมีความต้านทานต่อโรคราแป้งและใบจุดดีกว่าพันธุ์กำแพงแสน 1 (พิระศักดิ์และเจริญศักดิ์, 2529)

การศึกษาการลดปริมาณกรดไฟติกในพืช

กรดไฟติกมีปริมาณต่าง ๆ กัน ในพืชชนิดต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 จากตารางพบว่า กรดไฟติกพบมากใน ข้าว ข้าวสาลี และถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า พบกรดไฟติกปริมาณมากในธัญพืชและพืชตระกูลถั่วอื่น ๆ (Makower, 1970)

กรดไฟติกในอาหารเป็นสาเหตุหนึ่งของภาวะทุพโภชนาการในเด็กและสตรีมีครรภ์ในประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งมักบริโภคธัญพืชและพืชตระกูลถั่วเป็นอาหารหลัก ปัจจุบันจึงมีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณกรดไฟติกในธัญพืชต่าง ๆ เพื่อนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ให้มีปริมาณกรดไฟติกที่น้อยลง ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ ข้าว ถั่วเหลือง และถั่วเขียวผิวดำ

Raboy (2002) รายงานว่า การที่ข้าวโพดและข้าวสาลีพันธุ์ กลายมีปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดลดลง 50-95 % โดยที่ปริมาณฟอสฟอรัสรวมยังคงเท่าเดิม แต่มีปริมาณของสารประกอบฟอสฟอรัสอินทรีย์มากขึ้น ในรูปของกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) และ *myo* - inositol phosphate ที่มีหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่า 6 โมเลกุล

ตารางที่ 1 ปริมาณกรดไฟติกในพืช

ชนิดพืช	ปริมาณกรดไฟติกในส่วนที่รับประทานได้ของพืช (มก./ก.)
แอปเปิ้ล	0.62
แครอท	0.09
ข้าวโพด	0.31
มันฝรั่ง	0.80
ข้าว	25.38
มะเขือเทศ	0.06
ข้าวสาลี	40.71
กล้วย	0.00
ถั่วเหลือง	18.80

ที่มา : Oberleas and Harland (1981)

1. ข้าวโพด (maize)

มีการปรับปรุงพันธุ์ให้เมล็ดมีปริมาณกรดไฟติกต่ำ โดยใช้วิธีผสมกลับ (traditional backcrossing breeding method) ของพันธุ์กลาย จนได้เป็นข้าวโพดลูกผสมที่มีปริมาณกรดไฟติกลดลง 55-60 % มีจีโนไทป์เป็น *lpa1-1lpa1-1* (*lpa* คือ low phytic acid allele) ซึ่งเป็น nonlethal homozygous recessive gene คาดว่า *Lpa* allele จะ encode ให้เกิดเอนไซม์ *myo* - inositol (3) P₁ synthase (MIPs) ซึ่งจะช่วยในการสังเคราะห์ InsP₆ ต่อไป ยีนดังกล่าวไม่มีผลต่อการงอก อัตราการเจริญเติบโต ความยาวฝัก ความสูง และความชื้นในเมล็ด แต่ทำให้ผลผลิตเฉลี่ยลดลง 5.5 % เพราะมีผลต่อ vegetative process ของการเจริญเติบโตของพืช (Raboy, 2002) นอกจากนี้ ยังมีการพัฒนา non-lethal maize low phytic acid mutant ได้แก่ *lpa1-1* และ *lpa2-1* mutant ที่อยู่บนโครโมโซม 1S ทั้งคู่ โดย *lpa1-1* mutant มีปริมาณกรดไฟติกลดลงและฟอสฟอรัสอินทรีย์เพิ่มขึ้น แต่ใน *lpa2-1* mutant นั้น ยังพบ *myo* - inositol phosphate โมเลกุลอื่นที่มีหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่า 6 หมู่ด้วย (Raboy *et al.*, 2000)

นอกจากนี้ยังมี single recessive gene (*lpa241*) ที่อยู่บนโครโมโซม 1S เช่นเดียวกับ *lpa1-1* และทำให้ปริมาณของเอนไซม์ MIPs ลดลงเช่นกัน ทำให้จำนวนและขนาดของ globoid ลดลง และยังพบ negative pleiotropic effect กับการพัฒนาของเอ็มบริโอ ขนาดของเอ็มบริโอ อัตราการงอก อัตราการเจริญของต้นกล้า และขนาดฝัก (Pilu *et al.*, 2005) *lpa241* mutant สามารถลดปริมาณกรดไฟติกได้ถึง 90% โดยเพิ่มปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ได้ถึง 10 เท่าของปริมาณเดิม (Pilu *et al.*, 2003) นอกจากนี้ บริษัท Pioneer Hi-Bred International ยังจดลิขสิทธิ์พันธุ์ข้าวโพดลูกผสมที่มีกรดไฟติกในปริมาณต่ำในปี 1998 ได้เป็นพืชแรก (Raboy, 1998)

2. ถั่วเหลือง (soybean)

กรดไฟติกในถั่วเหลืองมีประมาณ 70 % ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด (Raboy and Dickinson, 1993) การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม พบว่า การมีปริมาณกรดไฟติกต่ำถูกควบคุมด้วยยีนด้อย คือ *pha1* และ *pha2* ซึ่งอยู่คนละตำแหน่งกันบนโครโมโซม และเป็นอิสระต่อกันโดยไม่เกิดการข่มข้ามคู่ (epistasis) มียีนหนึ่งเป็นยีนหลัก (major gene) และไม่มี maternal effect มีอัตราพันธุกรรมประมาณ 81 % (Coelho *et al.*, 2002) ต่อมา Walker *et al.* (2006) พบว่า ยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง (*pha1* อยู่บน LG N และ *pha2* อยู่บน LG L) นั้น มี epistasis interaction

โดยยีนตำแหน่งบน LG N อธิบายความแปรปรวนของปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ได้ถึง 41 % ในขณะที่ยีนบน LG L อธิบายได้ 11 % และ interaction ของ 2 ตำแหน่ง ก็อธิบายได้เพิ่มขึ้นอีก 8-11 % การปรับปรุงถั่วเหลืองให้มีปริมาณกรดไฟติกต่ำ ทำได้โดยสร้างลูกผสมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์กลาย M153 และ M766 (Oltmans *et al.*, 2004) ซึ่งถั่วเหลืองพันธุ์กลายดังกล่าว มีปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดลดลงถึง 70 % (Wilcox *et al.*, 2000)

3. ข้าวบาร์เลย์ (barley)

ข้าวบาเลย์พันธุ์กลายได้แก่ M422, M635 และ M955 มีปริมาณกรดไฟติกลดลงถึง 75-90 % โดยพันธุ์ที่มี homozygous genotype ของ *lpa 1-1* สามารถลดปริมาณกรดไฟติกในรูป InsP_6 แต่เพิ่มปริมาณของฟอสฟอรัสอินทรีย์ ส่วนพันธุ์ที่มี homozygous genotype ของ *lpa 2-1* InsP_6 ลดลง แต่มีฟอสฟอรัสอินทรีย์และ InsP ที่มีจำนวนหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่า 6 หมู่เพิ่มขึ้น

4. ข้าว (rice)

มีการฉายรังสีแกมมาให้กับเมล็ดข้าว แล้วตรวจหาเมล็ดกลายพันธุ์ที่มีปริมาณกรดไฟติกต่ำ พบ 2 พันธุ์กลาย ที่เป็น lethal และ non-lethal mutant โดย allele ที่ควบคุม non-lethal mutant ได้รับการตั้งชื่อว่า *lpa1-1* เช่นเดียวกับข้าวโพดและข้าวบาเลย์ ยีนนี้ทำให้ปริมาณกรดไฟติกลดลงจาก 71 % เป็น 39 % และมีปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์เพิ่มขึ้นจาก 5 เป็น 32 % *lpa1* นี้ อยู่บนโครโมโซม 2L (Larson *et al.*, 2000) Liu *et al.* (2005) พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณกรดไฟติกและปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าว จึงมีแนวทางปรับปรุงพันธุ์ข้าวดังกล่าวให้มีปริมาณกรดไฟติกต่ำ แต่มีปริมาณโปรตีนสูง

5. ข้าวสาลี (wheat)

มีการสร้างข้าวสาลีพันธุ์กลายด้วย ethyl-methanesulfonate (EMS) ได้สายพันธุ์ Js-12-LPA ซึ่งมีปริมาณกรดไฟติก 48.2 % ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด ซึ่งลดลงจาก wild type (Js-12-WT) ซึ่งมีปริมาณกรดไฟติก 74.7 % ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด แม้ปริมาณกรดไฟติกจะลดลง แต่ปริมาณฟอสฟอรัสรวมในเมล็ดกลับไม่เปลี่ยนแปลง เพราะมีสารประกอบฟอสฟอรัสอินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็น 50.1 % จากเดิม 9.1 % ปกติข้าวสาลีจะมีปริมาณกรดไฟติกมาก

ที่สุดใน aleulone layer และเมื่อผ่านการขัดสีจะมีในร่ามากที่สุด แต่พันธุ์กลายมีปริมาณกรดไฟติกในร่าลดลงถึง 43 % และมีฟอสฟอรัสอินทรีย์เพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า (Guttieri *et al.*, 2004)

6. ถั่วเขียวผิวดำ (black gram)

มีการศึกษาปริมาณฟอสฟอรัส กรดไฟติกและแร่ธาตุต่าง ๆ ในระหว่างการงอกและระหว่างขั้นตอนนำมาปรุงเป็นอาหารของถั่วเขียวผิวดำ พบว่า มีปริมาณกรดไฟติก 79 % ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด (Reddy *et al.*, 1978)

7. ถั่วเขียว (mungbean)

เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาการถ่ายลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณกรดไฟติกในถั่วเขียว มีแต่รายงานโดย Chitra *et al.* (1995) ว่า มีปริมาณกรดไฟติกเป็น 78.2 % ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

1. การแสดงออกของลักษณะที่ควบคุมด้วยยีน 1 คู่

จีโนไทป์ (genotype) ของสิ่งมีชีวิตดิพลอยด์ (diploid) อยู่ในสภาพคู่ ยีน 1 คู่จะมีการแสดงออกของยีนได้ 2 แบบ ได้แก่

- 1.1 การแสดงออกแบบผลบวก (additive effect)
- 1.2 การแสดงออกของยีนแบบข่ม (dominant effect หรือ intraallelic interaction) แบ่งได้เป็น
 - 1.2.1 ข่มแบบสมบูรณ์ (complete dominant)
 - 1.2.2 ข่มแบบไม่สมบูรณ์ (incomplete dominant)
 - 1.2.3 ข่มเกิน (overdominant)
 - 1.2.4 ข่มร่วมกัน (codominant)

2. การแสดงออกของลักษณะที่ควบคุมด้วยยีน 2 คู่

การถ่ายทอดทางพันธุกรรมเมื่อมียีนเกี่ยวข้องด้วย 2 คู่ ใช้พื้นฐานการแยกตัวและการรวมตัวของยีนเป็นสำคัญ ถ้ายีน 2 ตำแหน่งเป็นอิสระต่อกัน และแต่ละตำแหน่งมีการข้ามแบบสมบูรณแล้ว สัดส่วนหรืออัตราส่วนลูกชั่วที่ 2 จาก dihybrid cross จะมีอัตราส่วนเป็น 9 : 3 : 3 : 1 ยกเว้นเกิดปฏิกริยาระหว่างยีนต่างคู่ (non-allelic genes) ทำให้สัดส่วนผิดแผกไป ปฏิกริยาระหว่างยีนแบ่งได้หลายแบบดังนี้

2.1 Dominant epistasis หรือ Masking action เป็นปฏิกริยาที่ยีนตัวหนึ่งบดบังลักษณะการแสดงออกของยีนอีกตัวหนึ่งซึ่งอยู่ต่างคู่กัน ฟีนไทป์ในลูกชั่วที่ 2 มีอัตราส่วนเป็น 12 : 3 : 1

2.2 Recessive epistasis หรือ Modifying action เป็นปฏิกริยาที่ยีนตัวหนึ่งแสดงลักษณะออกมาได้โดยต้องมียีนอีกตัวหนึ่งซึ่งอยู่ต่างตำแหน่งกัน ฟีนไทป์ในลูกชั่วที่ 2 มีอัตราส่วนเป็น 9 : 3 : 4

2.2 Duplicate dominant epistasis หรือ Duplicate action ปฏิกริยานี้เกิดจากยีน 2 คู่ ควบคุมการแสดงออกของลักษณะเดียวกัน แม้มียีนข่มเพียงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งก็สามารถควบคุมการแสดงออกของลักษณะนั้น ๆ ได้เหมือนมีอยู่ทั้งสองตำแหน่ง ฟีนไทป์ในลูกชั่วที่ 2 มีอัตราส่วนเป็น 15 : 1

2.3 Duplicate recessive epistasis หรือ Complementary action เป็นปฏิกริยาที่ยีนต่างคู่กันให้ผลแสดงออกแบบเดียวกันโดยสนับสนุนซึ่งกันและกัน ฟีนไทป์ในลูกชั่วที่ 2 มี dihybrid ratio เป็น 9 : 7

2.4 Inhibition action เป็นปฏิกริยาที่ยีนตัวหนึ่งบังคับไม่ให้ยีนอีกตัวหนึ่งซึ่งอยู่ต่างคู่กันแสดงออก ฟีนไทป์ในลูกชั่วที่ 2 มีอัตราส่วนเป็น 13 : 3

2.5 Additive effect เป็นปฏิกริยาที่ยีน 2 ตำแหน่งแสดงออกในลักษณะเดียว การแสดงออกของลักษณะนั้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนยีนข่ม ฟีนไทป์ในลูกชั่วที่ 2 มีอัตราส่วนเป็น 9 : 6 : 1

3. การแสดงออกของลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนมากกว่า 2 คู่

ลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนมากกว่า 2 คู่ ในทางทฤษฎี จะมีจำนวนฟีโนไทป์ในลูกชั่วที่ 2 ได้ดังตารางที่ 2 ทั้งนี้ การศึกษาการทำงานของยีนและปฏิริยาระหว่างยีน นิยมศึกษาในลักษณะคุณภาพ (qualitative traits) ซึ่งควบคุมด้วยยีนน้อยคู่ และการแสดงออกมีความแปรปรวนน้อย เนื่องจากอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม ส่วนลักษณะปริมาณ (quantitative traits) นั้น ถูกควบคุมด้วยยีนมากคู่ และการแสดงออกมีความแปรปรวนมากเนื่องจากอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม จึงศึกษาถึงผลของยีนและสิ่งแวดล้อมไปพร้อมกัน แล้วแสดงค่าเป็นอัตราพันธุกรรม

อัตราพันธุกรรม (heritability; h^2) คือ สัดส่วนของความแปรปรวนของฟีโนไทป์ อันเนื่องมาจากผลของยีน แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

1. อัตราพันธุกรรมอย่างแคบ คำนวณได้จาก

$$h_a^2 = \frac{V_A}{V_P}$$

ตารางที่ 2 จำนวน gamete, genotype และ phenotype แบบต่าง ๆ ในลูกชั่วที่ 2 หลังทำการผสมตัวเองของลูกชั่วที่ 1 ที่มียีนแตกต่างกันอยู่ n คู่

No. of gene	F_1 gamete	Possible F_2 genotype	Possible F_2 combination	Kinds of F_2 phenotype	
				Dominance	Additive
1	2	3	4	2	3
2	4	9	16	4	9
3	8	27	64	8	27
4	16	81	256	16	81
10	1,024	95,049	1,084,576	1,024	95,049
21	2,097,152	10,460,353,203	4,398,046,511,104	2,097,152	10,460,353,203
n	2^n	3^n	4^n	2^n	3^n

2. อัตราพันธุกรรมอย่างกว้าง คำนวณได้จาก

$$h_b^2 = \frac{V_G}{V_P}$$

เมื่อ V_A คือ ความแปรปรวนเนื่องจากการแสดงออกของยีนแบบผลบวก

V_P คือ ความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ ($V_P = V_G + V_E$)

V_G คือ ความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรม

V_E คือ ความแปรปรวนเนื่องจากสภาพแวดล้อม

การคำนวณหาอัตราพันธุกรรมทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. การศึกษาจากความแปรปรวนของประชากรที่มีส่วนประกอบทางพันธุกรรมเหมือนกัน

1.1 อัตราพันธุกรรมอย่างแคบ คำนวณได้ดังสูตรข้างต้น แต่ต้องมีลูกผสมกลับไปยังแม่ (B_1) หรือพ่อ (B_2) หรือทั้ง B_1 และ B_2 จากนั้นใช้ความแปรปรวนของลูกชั่วที่ 2 แทนความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ ใช้ค่าเฉลี่ยความแปรปรวนของพ่อแม่และลูกชั่วที่ 1 แทนความแปรปรวนเนื่องจากสภาพแวดล้อมเช่นกัน จากนั้น สามารถหาความแปรปรวนเนื่องจากการแสดงออกของยีนแบบผลบวก ได้จากความสัมพันธ์

$$V_{F_2} = \frac{1}{2}V_A + \frac{1}{4}V_D + V_E$$

$$V_{B_1} = V_{B_2} = \frac{1}{4}V_A + \frac{1}{4}V_D + V_E$$

1.2 อัตราพันธุกรรมอย่างกว้าง คำนวณได้ดังสูตรข้างต้นเช่นกัน โดยใช้ความแปรปรวนของลูกชั่วที่ 2 แทนความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ และใช้ค่าเฉลี่ยความแปรปรวนของพ่อแม่และลูกชั่วที่ 1 แทนความแปรปรวนเนื่องจากสภาพแวดล้อม จะคำนวณหาความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรมได้

2. การศึกษาจากความคล้ายคลึงของลักษณะปรากฏระหว่างเครือญาติ แบ่งได้เป็น 2 วิธี ได้แก่

2.1 การคำนวณจากรีเกรสชันระหว่างลูกกับพ่อแม่ (regression of offspring on parent)

โดยเก็บข้อมูลจากพ่อแม่ฝ่ายใดฝ่ายหนึ่ง หรือทั้งสองฝ่ายเป็นตัวแปรอิสระ (X) เก็บข้อมูลจากลูกเป็นตัวแปรตาม (Y)

2.2 การวิเคราะห์ค่าสังเกตของลูก (sib analysis)

เป็นการประเมินองค์ประกอบของความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยสร้างลูกผสม half sib หรือ full sib ตามแผนการผสมพันธุ์ต่าง ๆ ขึ้นมา แล้วนำลูกที่ได้ไปปลูกในแผนการทดลองต่าง ๆ

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด

ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียว เพื่อนำมาใช้เป็นพ่อแม่ของลูกผสมที่จะศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมปริมาณกรดไฟติก ในเบื้องต้นจะใช้ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดเป็นตัวบ่งชี้ในการคัดเลือกพันธุ์ดังกล่าว เพราะสะดวกกว่าการใช้ปริมาณกรดไฟติก ซึ่งใช้เวลาและค่าใช้จ่ายมาก ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์สายพันธุ์ถั่วเขียวจำนวนมาก เมื่อเลือกคู่พ่อแม่ได้จำนวนหนึ่งแล้ว จึงนำมาวิเคราะห์ปริมาณกรดไฟติก

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การบดตัวอย่างพืช
2. การย่อยสลายพืช ซึ่งทำได้ 2 วิธี (จำเป็น, 2545; ทศนีย์และคณะ, 2532; Anon., 2004b) ดังนี้

2.1 การเผาให้เป็นเถ้า (dry ashing)

โดยการนำตัวอย่างพืชไปเผาที่อุณหภูมิ 550°C เป็นเวลา 5 ชม. หากอุณหภูมิสูงกว่า 600°C จะทำให้สูญเสียฟอสฟอรัสได้ ธาตุต่าง ๆ รวมทั้งฟอสฟอรัสจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบออกไซด์ ซึ่งมีลักษณะเป็นเถ้าสีขาว แต่ไนโตรเจนและคาร์บอนจะหายไปในรูปแบบก๊าซ แล้วจึงนำไปละลายในสารละลายกรดเจือจางก่อนนำมาวิเคราะห์ต่อไป

2.2 การย่อยด้วยกรด (wet ashing)

โดยการนำตัวอย่างพืชไปเติมกรดและให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ $180-200^{\circ}\text{C}$ ซึ่งจะทำให้กรดออกซิไดซ์ หรือย่อยเนื้อเยื่อพืชได้เร็วขึ้น กรดที่ใช้ได้แก่ กรดกำมะถัน (H_2SO_4) กรดไนตริก (HNO_3) กรดเพอร์คลอริก (HClO_4) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยอาจใช้กรดเพียงชนิดเดียว หรือมากกว่า 1 ชนิดผสมกัน แล้วแต่ความเหมาะสม

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธีวัดสี (Colorimetric method หรือ Spectrophotometry) ซึ่งมี 3 วิธี ได้แก่

3.1 Vanadomolybdate method

โดยฟอสฟอรัสจะทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมของ vanadate และ molybdate ในสภาพที่เป็นกรด เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลือง วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว (ทัศนีย์และคณะ, 2532; Anon., 2004c)

3.2 Ascorbic acid method

เป็นวิธีที่มีความไวสูง เป็นการวัดสีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อน phosphomolybdate ที่เกิดปฏิกิริยารีดักชัน โดยมีวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นตัวรีดิวซ์ วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 820 นาโนเมตร (Chen *et al.*, 1956; Fiske and Subbarow, 1925)

3.3 Aminonaphtholsulfonic acid method

โดยฟอสฟอรัสจะทำปฏิกิริยากับ Aminonaphtholsulfonic acid วัดสีน้ำเงินของสารประกอบที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (Leucena and Prat, 1957)

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ อาศัยหลักการวัดสีที่เกิดขึ้นจากสารประกอบเชิงซ้อนของหมู่ฟอสเฟตกับ molybdate มีทั้งแบบ Semi-Quantitative และ Quantitative method ดังนี้

1. Semi-Quantitative method

หรือ High inorganic phosphorus test (HIP-test) เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Raboy *et al.*(2000) จากวิธีของ Chen *et al.*(1956) เป็นวิธีการเบื้องต้นในการตรวจหาตัวอย่างที่มีปริมาณกรดไฟติกต่ำ เป็น indirect method เพราะเป็นการตรวจหาตัวอย่างที่มีปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์สูงแทน โดยนำตัวอย่างมาบดและสกัดด้วยกรดเกลือ แล้วนำสารสกัดที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ colorimetric reagent ที่ประกอบด้วยกรดกำมะถัน วิตามินซี ammonium molybdate และน้ำกลั่นใน microplate แล้วใช้สายตาเปรียบเทียบความเข้มของสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นด้วยตากับสารมาตรฐาน ฟอสฟอรัสอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ จะสามารถตรวจหาตัวอย่างที่ให้ความเข้มของสีน้ำเงินสูง ๆ ซึ่งแสดงว่ามีปริมาณกรดไฟติกต่ำได้

วิธีการดังกล่าวอาจพัฒนาเป็น Quantitative method ได้ โดยนำสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น มาตรวจหาความยาวคลื่นที่สารดังกล่าวสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด (λ_{max}) เพื่อนำมาใช้คำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ต่อไป

2. Quantitative method

เป็นวิธีการวัดสีของสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวเช่นเดียวกัน แต่มีวิธีการสกัดที่ซับซ้อนกว่า เหมาะกับตัวอย่างที่มีโปรตีนในปริมาณมาก และสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้ใน

isobutanol จะมีเสถียรภาพประมาณ 19 ชั่วโมง วิธีการคือ บดและสกัดตัวอย่างด้วย trichloroacetic acid นำสารสกัดที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ colorimetric reagent ที่ประกอบด้วย กรดกำมะถัน ammonium molybdate และ stannous chloride วัดสีของสารละลายสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร (Pon and Guthrie, 1946)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฟติก

การวิเคราะห์กรดไฟติกทำได้หลายวิธีดังนี้

1. ไทเทรตหาปริมาณกรดไฟติกโดยตรง

เป็นวิธีการหาปริมาณกรดไฟติก โดยไทเทรตสารละลายตัวอย่างกับเฟอร์ริก คลอไรด์ (FeCl_3) ได้เป็นเกลือเฟอร์ริกไฟเตท (ferric phytate) ซึ่งจะตกตะกอน แต่มีปัญหาในการหา จุดยุติ เพราะเมื่อตกตะกอนแล้ว จะทำให้ยากต่อการมองเห็นตะกอนด้วยสายตา (อรุณธรรม, 2543 และ Fables *et al.*, 2000)

2. หาปริมาณเหล็กที่เหลือจากการเติมเฟอร์ริกคลอไรด์ลงในตัวอย่าง

โดยเฟอร์ริกคลอไรด์จะถูกเติมในปริมาณที่มากเกินไปที่จะจับกับกรดไฟติก แล้วได้ ตะกอนเกลือเฟอร์ริกไฟเตท เมื่อกรองตะกอนออกก็หาปริมาณเหล็กที่เหลือ และสามารถนำมา คำนวณกลับเป็นปริมาณกรดไฟติกที่จับกับเฟอร์ริกคลอไรด์ที่หายไปได้ การหาปริมาณเหล็กที่เหลือทำได้ดังนี้ (Haug and Lantzsch, 1983; Mohamed *et al.*, 1986; Makower, 1970; Latta and Eskin, 1980; Thomson and Erdman, 1982)

2.1 Atomic absorption spectrophotometry

เป็นขบวนการที่อะตอมอิสระของเหล็กที่สถานะพื้น (ground state) ดูดกลืน พลังงานแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม แล้วอะตอมเหล่านั้นจะมีพลังงานสูงขึ้นไปอยู่ที่สถานะเร้า (excited state) ปริมาณของพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืนไว้จะเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนอะตอมที่เฉพาะกับความยาวคลื่นแสงนั้น ๆ เพิ่มขึ้น ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณพลังงานที่ถูกดูดกลืนไว้กับความ

เข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ทราบค่าแน่นอน จะสามารถนำมาหาความเข้มข้นของสารตัวอย่าง โดยการวัดปริมาณพลังงานแสงของสารตัวอย่างที่ดูดกลืนไว้

2.2 Spectrophotometry (Colorimetric method)

โดยนำสารละลายที่มีเหล็กที่เหลือนาเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เพื่อเปลี่ยนเฟอร์ริกคลอไรด์ที่เหลือไปเป็นเฟอร์ริกไฮดรอกไซด์ ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ hydroxylamine เพื่อเปลี่ยน Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ O-phenanthroline วัดสีของสารประกอบที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

3. Biosensor

เป็นวิธีการที่ง่ายในการวัดปริมาณกรดไฟติกและเอนไซม์ไฟเตส โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฟเตสร่วมกับ pyruvate oxidase (POD) ที่จะเปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตที่สลายจากกรดไฟติกกับออกซิเจนเป็น H_2O_2 โดยมี pyruvate เป็นโคเอนไซม์ วัดผลิตภัณฑ์ H_2O_2 ที่เกิดขึ้น สามารถคำนวณหาปริมาณกรดไฟติกตั้งต้นได้ (Mak *et al.*, 2004)

4. Nuclear magnetic resonance (NMR)

เป็นวิธีที่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง (Hatzack *et al.*, 2001)

5. Inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometer (ICP-AES)

เป็นการวัดปริมาณกรดไฟติกที่ง่ายและรวดเร็ว แต่เครื่องมือนี้ไม่เป็นที่แพร่หลายนัก (Plaami and Kumpulainen, 1991) เป็นการวัดปริมาณฟอสฟอรัสองค์ประกอบในหมู่ฟอสเฟตของกรดไฟติก (Grases *et al.*, 2004)

6. Liquid scintillation counter

โดยติดฉลาก (label) ไฮโดรเจนอะตอมในกรดฟอสฟอริกด้วย ^3H isotope จะสามารถวัดปริมาณกรดฟอสฟอริกได้ (Pittet *et al.*, 1989)

7. หาปริมาณกรดฟอสฟอริกโดยการแยกกรดฟอสฟอริกออกจากสารอื่น ๆ

โดยสกัดกรดฟอสฟอริกด้วยสารละลายกรดเจือจาง เช่น กรดเกลือ (HCl) หรือ trichloroacetic acid (TCA) เป็นต้น แล้วนำมาแยกกรดฟอสฟอริกออกจากสารอื่น ๆ ด้วยวิธีต่าง ๆ แล้วคำนวณปริมาณกรดฟอสฟอริกจากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสตั้งที่กล่าวมาแล้ว หรือคำนวณเป็นปริมาณกรดฟอสฟอริกโดยตรง วิธีแยกกรดฟอสฟอริกออกจากสารอื่น ๆ ทำได้ดังนี้ (Lott *et al.*, 2000; Stock and Rice; 1974)

7.1 ตกตะกอนกรดฟอสฟอริกด้วยเฟอริกคลอไรด์

7.2 ใช้โครมาโทกราฟี ต่าง ๆ ดังนี้

7.2.1 ชนิดของโครมาโทกราฟีแบ่งตามหลักการแยกได้แก่

ก. โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) อาศัยคุณสมบัติในการจับแบบผันกลับได้ (reversible) กับตัวดูดซับเพื่อแยกกรดฟอสฟอริกได้แก่

1) โครมาโทกราฟีกระดาษ (paper chromatography) โดยโมเลกุลของสารต่าง ๆ ในสารละลายจะวิ่งเร็วช้าต่างกันบนตัวดูดซับที่เป็นกระดาษ

2) โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin-layer chromatography; TLC) มีหลักการเช่นเดียวกับโครมาโทกราฟีกระดาษ แต่ตัวดูดซับเป็นเจลที่ฉาบบนแผ่นกระจก โดยนำสารสกัดมา load บนแผ่น TLC ที่ฉาบด้วยเซลลูโลส Huhurez *et al.* (1995) รายงานว่าเมื่อใช้เฟสที่เคลื่อนที่ได้เป็นสารละลายผสมของ propanol และ aqueous ammonia solution เมื่อเสร็จ spray ด้วย molybdate reagent นำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสี

น้ำเงินทั้งของฟอสฟอรัสอินทรีย์ และ *myo* - inositol phosphate ต่าง ๆ สามารถตัดแถบที่ได้มาจะออกแล้วนำไปหาปริมาณต่อไปได้

ข. โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) เนื่องจากกรดไฟติกเป็นสารที่มีประจุลบ จึงจับกับเรซินในคอลัมน์ที่มีประจุบวกได้ ตัวอย่างหมู่ที่มีประจุลบของเรซิน ได้แก่ aminoethyl, diethylaminoethyl และ quaternary aminoethyl เป็นต้น เมื่อนำสารละลายที่มีกรดไฟติกใส่ลงในคอลัมน์ แล้วล้างคอลัมน์เพื่อให้สารที่ไม่จับกับเรซินหลุดออกมาด้วยสารละลายเกลือ (NaCl) เจือจาง จากนั้น จะกรดไฟติกออกมาจากคอลัมน์ด้วยสารละลายเกลือเข้มข้น และนำไปย่อยกรดไฟติก (digest) เป็นฟอสฟอรัสอิสระด้วยกรดกำมะถัน และกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสต่อไป จากปริมาณฟอสฟอรัส สามารถคำนวณเป็นปริมาณกรดไฟติกได้ โดย 6 โมเลกุลของฟอสฟอรัสมาจากกรดไฟติก 1 โมเลกุล แต่วิธีนี้ใช้เวลาค่อนข้างมาก และไม่ไวต่อปริมาณกรดไฟติกที่น้อย ๆ (Ellis and Moris, 1983; Harland and Oberleas, 1977, 1986)

ค. โครมาโทกราฟีแบบแบ่งละลาย (partition chromatography) อาศัยสมบัติของการแบ่งละลายระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

7.2.2 ชนิดของโครมาโทกราฟีแบ่งตามสถานะของเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่

ก. gas chromatography โดยมีเฟสเคลื่อนที่ที่อยู่ในสถานะก๊าซ ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในรูปไอ แล้วเดินทางในคอลัมน์ไปแบ่งละลาย (Lott *et al.*, 2000 and Park *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีการใช้ GC-MS (gas chromatography-mass spectroscopy) (March *et al.*, 2001) ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติกอีกด้วย

ข. liquid chromatography สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามสถานะของเฟสอยู่กับที่ ได้แก่ liquid-solid chromatography มีเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็ง เช่น โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) และ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) เป็นต้น และ liquid-liquid chromatography มีเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวอยู่บนตัวเกาะยึด (supportor) ในคอลัมน์ เช่น โครมาโทกราฟีแบบแบ่งละลาย (partition chromatography) เป็นต้น

HPLC หรือ high performance liquid chromatography คือ โครมาโทกราฟีที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีเรซินเป็นเฟสที่อยู่กับที่ และมีของเหลวเป็นเฟสที่เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ (1) ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ และ acetonitrile เป็นต้น และ (2) สารละลายเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น โซเดียมคลอไรด์ และ โซเดียมอะซิเตท เป็นต้น ภายในคอลัมน์จะมีเรซินที่บรรจุมาสำเร็จรูป HPLC เป็นวิธีที่ไวต่อการวัดปริมาณกรดไขมันน้อย ๆ สะดวกและรวดเร็ว เพราะไม่ต้องเสียเวลาในการบรรจุเรซินลงในคอลัมน์ แต่สารละลายที่ใช้ต้องเป็นเกรดเฉพาะสำหรับ HPLC เนื่องจากมีความไวมากจึงต้องการความบริสุทธิ์สูง โดยสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมัน อาจต้องสกัดน้ำมันออกก่อนด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (Graf and Dinzis, 1982 and Talamond *et al.*, 2000) หรือกำจัดสารละลายกรดเกลือ หรือ TCA ที่ใช้ในสกัดกรดไขมันออกมาด้วยการทำ diethyl ether treatment (Mayr, 1988) และกำจัดกรดนิวคลีอิกออกไปด้วย charcoal treatment (Hatzack *et al.*, 2001)

RP-HPLC (Reverse phase – high performance liquid chromatography) เป็นโครมาโทกราฟีที่นิยมกันมากถึง 75% ของการแยกสารโดย HPLC (วัชรวิ, 2544) ใช้แยกโมเลกุลที่มีสภาพเป็นกลางในสารละลาย โดยอาศัยสมบัติ hydrophobicity แยกกรดและเบสอ่อน โดยเฟสที่อยู่กับที่จะไม่ขี้ขี้ แต่เป็น bonded phase ที่มีหมู่ฟังก์ชันเกิดพันธะกับเฟสที่อยู่กับที่ เช่น ซิลิกา หรือ พอลิเมอร์ เช่น polymethacrylate หรือ polystyrene หรือเป็นคาร์บอน เช่น porous graphite carbon มีกลไกการหน่วงเหนี่ยวแบ่งได้เป็น 2 ทฤษฎี คือ

1) Solvophobic theory เป็นอันตรกิริยา hydrophobic ระหว่างตัวถูกละลายและเฟสเคลื่อนที่ โดยตัวถูกละลายจะเกาะที่ผิวของเฟสที่อยู่กับที่ และการดูดซับจะเพิ่มขึ้น เมื่อแรงดึงดูดของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น

2) Partitioning theory ตัวถูกละลายจะถูกล้อมรอบด้วยห่วงโซ่ของเฟสที่อยู่กับที่ เมื่อห่วงโซ่ของสารเกิดพันธะยาวขึ้น กลไกการหน่วงเหนี่ยวจะเกิดการแบ่งส่วน

RP-HPLC แบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามหลักการที่ใช้กับสารตัวอย่าง (จันคณา, 2542) คือ

1) Ion-suppression chromatography ใช้วิธีปรับ pH ของสารละลาย ทำให้กรดอ่อนไม่แตกตัว หรือเบสอ่อนไม่เกิด protonation สารเหล่านี้จึงอยู่ในสภาวะเป็นกลาง Chen and Li (2003) ใช้หลักการนี้แยกสารผสมของ inositol phosphate 35 ชนิด ได้ 27 peak

2) Ion-pair chromatography การเติม counter ion ที่เหมาะสมเพื่อให้สารตัวอย่างเกิด ion-pair ซึ่งจะประพฤติตัวเหมือนโมเลกุลมีขั้วที่ไม่แตกตัว แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ counter ion ดังกล่าว เรียกว่า reagent PIC ตัวอย่างของ reagent PIC ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดไฟติกด้วย RP-HPLC ได้แก่ TBA-OH (tetrabutylammonium hydroxide) (Sanberge and Ahderinne, 1986) TBA-PO₄, TBA-Cl, TBA-Br, และ TPA-Cl (Shayman and BeMent, 1998)

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติกด้วย HPLC ทำได้โดยตรงโดยใช้ detector ต่าง ๆ ได้แก่

ก. Refractometer หรือ Refractive index detector เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดดัชนีการหักเหของสาร โดยสารแต่ละชนิดจะมีสมบัติในการหักเหแสงที่ส่องผ่านต่างกัน จึงสามารถหาเป็นปริมาณกรดไฟติกได้ (Camire and Clydesdale, 1982 and Graf and Dinzis, 1982)

ข. Absorption detector แบ่งออกได้เป็น

1) Atomic absorption spectrophotometer ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดไฟติกในรูปเฟอร์ริกไฟเตท เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว เป็นวิธีที่สะดวก แต่เครื่องมือดังกล่าวมีราคาสูง (Camire and Clydesdale, 1982)

2) UV/VIS Spectrophotometer โดยใช้ metal-dye method โดยมี post-column ที่มี colorimetric reagent คือ FeCl₃ และ sulfosalicylic acid วัดสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Carneiro *et al.*, 2002 and Larson *et al.*, 2000) หรือใช้ปฏิกิริยา metal replacement โดยเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ iron (III) thiocyanate แล้ววัดปริมาณที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร (Dost and Tokul, 2006)

ค. Conductance detector เป็นการวัดการนำไฟฟ้าของกรดไฟติกที่แยกได้ (Talamond *et al.*, 2000)

ง. Evaporative light scattering detector (ELSD) โดยสารละลายตัวอย่างที่แยกได้และเฟสเคลื่อนที่ถูกทำให้มีสภาพเป็น aerosol ด้วย nebulizer และก๊าซไนโตรเจน แล้วปล่อยให้ผ่าน drift tube ที่มีอุณหภูมิเหมาะสมที่ทำให้เฟสเคลื่อนที่ระเหยออกไป เหลือแต่สารตัวอย่าง เดินทางผ่านลำแสงเลเซอร์ ทำให้เกิดการกระเจิง (scattering) ของแสง เกิดเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า (Anon., 2004d) detector นี้ใช้ได้กับ RP-HPLC แบบ ion-suppression chromatography เท่านั้น เพราะ RP-HPLC แบบ ion-pair chromatography มี reagent PIC ในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งมีจุดเดือดสูงจึงไม่ระเหยไปพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่ ทำให้มารบกวน interfere การกระเจิงแสงของสารตัวอย่างได้

แผนการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกและเก็บเกี่ยวถั่วเขียว

ได้แก่

- 1.1 เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว
- 1.2 เครื่องปลูก
- 1.3 ตลับเมตร
- 1.4 ส้อมพรวน
- 1.5 ถังกระดาษขนาด 8 x 20 นิ้ว
- 1.6 ถังไนลอนขนาด 8X 20 นิ้ว
- 1.7 ถังพลาสติกแบบปากชิปขนาดต่าง ๆ

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผสมพันธุ์ลูกผสม

ได้แก่

- 2.1 ปากคีบ (forceps)
- 2.2 75% เอทานอล
- 2.3 ป้ายชื่อ

3. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

ได้แก่

- 3.1 เตาอบ
- 3.2 เครื่องปั่น (RT-02A)
- 3.3 ตะแกรงขนาด 0.5 มม. (40 mesh)
- 3.4 desiccator

4. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด

4.1 วัสดุอุปกรณ์

- 4.1.1 เตาเผา (muffle furnace; Carbolite CWF 1200)
- 4.1.2 แท่งคนสารแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
- 4.1.3 ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล.
- 4.1.4 กระดาษกรอง (Whatman No.1)
- 4.1.5 กรวยกรอง
- 4.1.6 ขาตั้งและที่จับ
- 4.1.7 บีกเกอร์ขนาด 50 และ 500 มล.
- 4.1.8 ถ้วยกระเบื้องมีฝาปิด (crucible)
- 4.1.9 ELISA reader (Multiskan EX Labsystems)
- 4.1.10 Multiskan transmit software
- 4.1.11 microplate ขนาด 96 หลุม
- 4.1.12 micropipette ขนาด 20 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- 4.1.13 microtube ขนาด 1.5 มล.

4.2 สารเคมี

- 4.2.1 2 N กรดเกลือ (HCl)
- 4.2.2 40 ppm โพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 4.2.3 0.25% แอมโมเนียมเมตาวานาเดต (NH_4VO_3)
- 4.2.4 5% แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$)
- 4.2.5 ผงแคลเซียมออกไซด์ (CaO)

5. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์

5.1 วัสดุอุปกรณ์

- 5.1.1 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล.
- 5.1.2 กระดาษกรอง (Whatman No.1)
- 5.1.3 กรวยแยกขนาด 125 มล.
- 5.1.4 กระบอกตวงขนาด 25 มล.
- 5.1.5 ขาดั่งพร้อมที่จับ
- 5.1.6 ตู้ดูดควัน
- 5.1.7 บีกเกอร์ขนาด 50 และ 250 มล.
- 5.1.8 ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล.
- 5.1.9 ขวดมีฝาปิดขนาด 50 มล.
- 5.1.10 หลอดทดลองขนาด 15 มล. พร้อมที่ตั่งหลอดทดลอง (rack)
- 5.1.11 incubator shaker (Infors AI72 minitron)
- 5.1.12 micropipette ขนาด 200 และ 1000 มล.
- 5.1.13 plastic cuvette 1 มล.
- 5.1.14 spectrophotometer (Beckman Coulter™ DU 530® Life Science UV/VIS)

5.2 สารเคมี

- 5.2.1 0.75 N กรดไตรคลอโรอะซีติก (CCl_3COOH)
- 5.2.2 0.05% แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) โดยใช้ 4 N กรดกำมะถัน เป็นตัวทำละลาย
- 5.2.3 10 N กรดกำมะถัน (H_2SO_4)
- 5.2.4 ไอโซบิวทานอล ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$)
- 5.2.5 37% กรดเกลือ (conc. HCl)
- 5.2.6 1 มก./มล. โพแทสเซียมอโรฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 5.2.7 99.5% เอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- 5.2.8 1.34 M stannous chloride (SnCl_2) โดยใช้ 37% กรดเกลือ เป็นตัวทำละลาย

6. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฟติก

6.1 วัสดุอุปกรณ์

- 6.1.1 ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล.
- 6.1.2 กระบอกตวงขนาด 25 มล.
- 6.1.3 ตู้เย็น -20°C
- 6.1.4 กระดาษกรอง (Whatman No.1)
- 6.1.6 ขวดมีฝาปิดขนาด 50 มล.
- 6.1.7 ขวดกั่นกลมขนาด 100 มล.
- 6.1.8 กรวยกรอง
- 6.1.9 ขาดึงพร้อมที่จับ
- 6.1.10 ชุดสายยางและ stopcock
- 6.1.11 กระบอกนิตยา 10 มล.
- 6.1.12 ชุดกรองและปั๊ม (Rocker 300, 220 V, 50 Hz)
- 6.1.13 หลอดปั่นขนาด 15 มล.
- 6.1.14 micropipette ขนาด 1000 ไมโครลิตร
- 6.1.15 microtube 1.5 มล.
- 6.1.16 vial ขนาด 2 มล.
- 6.1.17 nylon millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
- 6.1.18 incubator shaker (Infors AI72 minitron)
- 6.1.19 centrifuge (Universal 32R Hettich Zentrifugen)
- 6.1.20 rotary evaporator (Buchi Rotavapor[®] R-205)
- 6.1.21 preparation column (AG1-X8, 200-400 mesh prefilled poly-prep[®] column 0.8 x 4.0 cm, Biorad)
- 6.1.22 sonicator (Transonic T 460/H)
- 6.1.23 controller (Alltech control unit)
- 6.1.24 ปั๊ม (Alltech 626 pump)
- 6.1.25 autosampler (Alltech 580) ขนาด 96 ตัวอย่าง
- 6.1.26 analytical column (C_{18} prevail 5 μm 250 x 4.6 mm)
- 6.1.27 guard column (All-GuardTM cartridge system 7.5 x 4.6 mm)

- 6.1.28 Evaporative light scattering detector (ELSD 2000)
- 6.1.29 SRI 203 PeakSimple Chromatography data system
- 6.1.30 PeakSimple 3.26 software
- 6.1.31 เครื่องทำน้ำความบริสุทธิ์สูง (maxima)

6.2 สารเคมี

- 6.2.1 0.025, 0.5 และ 2 N กรดเกลือ (HCl)
- 6.2.2 0.05 N กรดฟอร์มิก (HCOOH)
- 6.2.3 เมทานอล (CH₃OH)
- 6.2.4 10,000 ppm โซเดียมฟอสเฟต (C₆H₆Na₆O₂₄P₆)
- 6.2.5 ก๊าซไนโตรเจนความบริสุทธิ์ 99.95% (High pure N_{2(g)})
- 6.2.6 ไอโซโพรพานอล (C₃H₇OH)
- 6.2.7 น้ำความบริสุทธิ์สูง (ultra high pure water)

วิธีการ

การปลูกถั่วเขียวทุกครั้งใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยเริ่มต้นปลูกถั่วเขียวจำนวน 612 พันธุ์ที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน ในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม คัดเลือกไว้เพียง 250 พันธุ์ จาก 18 ประเทศ (ดังตารางที่ 3) จากพันธุ์ที่รอดตายและให้ผลผลิตเมล็ดพอเพียงสำหรับการปลูกครั้งต่อไป นำถั่วเขียวทั้ง 250 พันธุ์มาปลูกที่แปลงเดิม เก็บลักษณะทางพืชไร่ ได้แก่ อายุออกดอก อายุเก็บเกี่ยว น้ำหนัก 100 เมล็ด จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อฝัก จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดถั่วเขียวทั้ง 250 พันธุ์ จำนวน 3 ซ้ำ แทนการตรวจหาปริมาณกรดไฟติกโดยตรงซึ่งใช้เวลามากสำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างจำนวนมาก จากนั้นนำพันธุ์ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดสูงสุดและต่ำสุดอย่างละ 5 พันธุ์มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติก และฟอสฟอรัสอินทรีย์ จำนวน 3 ซ้ำ แล้วคัดเลือกพันธุ์ที่มีปริมาณกรดไฟติกสูงสุดและต่ำสุดมาใช้เป็นพ่อแม่ในการสร้างลูกผสมต่อไป แบ่งเมล็ดส่วนหนึ่งของลูกผสมชั่วที่ 1 มาปลูกเป็นต้นถั่วเขียวชั่วที่ 1 เก็บลักษณะพืชไร่เช่นเดิม อีกส่วนนำมาหาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ฟอสฟอรัสอินทรีย์ และกรดไฟติกในแต่ละต้น ทั้งจากลูกผสมตรงและผสมกลับอย่างละ 3 ต้น จำนวน 3 ซ้ำ

เลือกต้นถั่วเขียวชั่วที่ 1 จากกลุ่มผสมเดียวที่เกิดจากพ่อแม่ที่มีปริมาณกรดไฟติกสูงสุดและต่ำสุด นำเมล็ดชั่วที่ 2 จากต้นถั่วเขียวชั่วที่ 1 ที่เลือกไว้เพียง 1 ต้น มาปลูกเป็นต้นถั่วเขียวชั่วที่ 2 เก็บลักษณะทางพืชไร่เช่นเดิม วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ฟอสฟอรัสอินทรีย์ และกรดไฟติกในเมล็ดชั่วที่ 2 จากต้นถั่วเขียวชั่วที่ 1 ที่เลือกไว้ทั้งจากกลุ่มผสมตรงและผสมกลับอย่างละ 8 ต้น จำนวน 3 ซ้ำ

วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ฟอสฟอรัสอินทรีย์ และกรดไฟติกในเมล็ดชั่วที่ 3 จากต้นถั่วเขียวชั่วที่ 2 จำนวน 161 ต้น จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำผลการวิเคราะห์มาคำนวณหาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมและอัตราพันธุกรรม ค่าเฉลี่ยของลักษณะ และสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ

ตารางที่ 3 เชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว 250 พันธุ์จากประเทศผู้ปลูกถั่วเขียวที่สำคัญ

No.	Acc No.	Source	No.	Acc No.	Source	No.	¹ Acc No.	Source	No.	¹ Acc No.	Source
1	V1016AY	Thailand	36	V1157AG	Iran	71	V1553AG	India	106	V1945AG	Philippines
2	V1066AG	Philippines	37	V1157BLY	Iran	72	V1555AG	India	107	V1946AY	Philippines
3	V1067BG	Philippines	38	V1158AG	Iran	73	V1556AG	India	108	V1948AG	Philippines
4	V1098ABLM	India	39	V1168ABR	Afghanistan	74	V1557AG	India	109	V1946BY	Philippines
5	V1099BG	India	40	V1171AG	Afghanistan	75	V1573BG	Pakistan	110	V1947AG	Philippines
6	V1100BG	India	41	V1174AG	India	76	V1631BG	India	111	V1968AG	USA
7	V1103AG	India	42	V1191ABR	Afghanistan	77	V1656BG	Iran	112	V1969AG	India
8	V1105BG	India	43	V1196ABR	Afghanistan	78	V1658BBR	Afghanistan	113	V1998BG	Iran
9	V1106BG	India	44	V1198BG	Afghanistan	79	V1660BG	Afghanistan	114	V1999BG	Iran
10	V1110AY	India	45	V1242BG	Afghanistan	80	V1661BG	Afghanistan	115	V2010BG	China
11	V1111BG	India	46	V1250BG	India	81	V1671BG	Afghanistan	116	V2184AG	Philippines
12	V1112AG	India	47	V1252AG	India	82	V1672AG	Afghanistan	117	V2190BG	Afghanistan
13	V1113BG	India	48	V1253BG	India	83	V1672BG	Afghanistan	118	V2191BG	Philippines
14	V1114AG	India	49	V1254BG	India	84	V1676BBR	Afghanistan	119	V2209BG	Iran
15	V1114BG	India	50	V1255AG	India	85	V1687ABLM	Afghanistan	120	V2268BG	India
16	V1121BG	India	51	V1256AG	India	86	V1709BG	Iran	121	V2365BG	India
17	V1123AG	India	52	V1257AG	India	87	V1713BG	Iran	122	V2396BG	India
18	V1124AG	India	53	V1261AG	India	88	V1716AG	Iran	123	V2467BG	Afghanistan
19	V1125AG	India	54	V1262BG	India	89	V1717BG	Iran	124	V2476AG	Afghanistan
20	V1126BG	India	55	V1273AG	India	90	V1719BG	Iran	125	V2479AG	Afghanistan
21	V1131AG	India	56	V1131AG	Iraq	91	V1710BG	Iran	126	V2481AG	Afghanistan
22	V1132AG	India	57	V1311BG	Iraq	92	V1721BG	Iran	127	V2490AG	Iran
23	V1133BG	India	58	V1379BG	Philippines	93	V1722BG	Iran	128	V2495AG	Afghanistan
24	V1134AG	India	59	V1387AG	Philippines	94	V1723AG	Iran	129	V2523BG	Iran
25	V1137BG	India	60	V1399BG	Philippines	95	V1724AG	Iran	130	V2525AG	Iran
26	V1138BG	India	61	V1410AG	Philippines	96	V1725BG	Iran	131	V2709BG	India
27	V1139AG	India	62	V1414AG	Philippines	97	V1726BG	Iran	132	V2774AG	India
28	V1140BG	India	63	V1415AG	Philippines	98	V1735AG	India	133	V2787AG	India
29	V1141BG	India	64	V1532BG	India	99	V1766BG	India	134	V2802BBL	Philippines
30	V1142BG	India	65	V1544AG	India	100	V1837BG	India	135	V2915BG	England
31	V1144AG	India	66	V1536BG	India	101	V1844ABLM	India	136	V2949BG	India
32	V1145AG	India	67	V1539AG	India	102	V1857ABLM	India	137	V3017BG	India
33	V1148BG	India	68	V1546BG	India	103	V1877AG	India	138	V3088AG	Iran
34	V1153AG	Iran	69	V1548AG	India	104	V1927AG	India	139	V3088BG	Iran
35	V1156AG	Iran	70	V1552AG	India	105	V1944BY	Philippines	140	V3092AG	India

¹Acc No. = Accession number

ที่มา : David *et al.* (1995)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	Acc No.	Source	No.	Acc No.	Source	No.	¹ Acc No.	Source	No. ¹	Acc No.	Source
141	V3096AG	Korea	176	V3735AG	Iran	211	V3788AG	Iran	246	KPS1	Thailand
142	V3109AG	Korea	177	V3736AG	Iran	212	V3791AG	Iran	247	KPS2	Thailand
143	V3131AG	Thailand	178	V3737AG	Iran	213	V3792BBR	Iran	248	CN60	Thailand
144	V3170AG	Iran	179	V3738AG	Iran	214	V3792BBR	Iran	249	CN72	Thailand
145	V3171AG	Iran	180	V3739AG	Iran	215	V3794ABLM	Iran	250	PSU1	Thailand
146	V3178AG	Iran	181	V3740AG	Iran	216	V3795AG	Iran			
147	V3179AG	Iran	182	V3741AG	Iran	217	V4287AG	India			
148	V3215BG	Afghanistan	183	V3743BG	Iran	218	V4451AG	India			
149	V3218AG	Afghanistan	184	V3748AG	Iran	219	V4685BG	India			
150	V3220AG	Afghanistan	185	V3748BG	Iran	220	V4793BG	India			
151	V3221AG	Afghanistan	186	V3749AG	Iran	221	V4908ABLM	Iraq			
152	V3222BBR	Afghanistan	187	V3751ABR	Iran	222	V4909ABLM	Iraq			
153	V3227AG	Afghanistan	188	V3754BG	Iran	223	V4956BG	Iran			
154	V3235ABR	Afghanistan	189	V3755BBR	Iran	224	V5197BG	India			
155	V3238ABR	Afghanistan	190	V3756BBR	Iran	225	V5461BBR	Iran			
156	V3242AG	Afghanistan	191	V3757AG	Iran	226	V5926BG	Philippines			
157	V3243AG	Afghanistan	192	V3757BG	Iran	227	V6011AG	Philippines			
158	V3248BG	Afghanistan	193	V3758BBR	Iran	228	V6015AG	Philippines			
159	V3249BBR	Afghanistan	194	V3759BG	Iran	229	V6017ADY	Philippines			
160	V3250BG	Afghanistan	195	V3760BG	Iran	230	V6083AG	USA			
161	V3251ABLM	Afghanistan	196	V3761ABR	Iran	231	NM10-12-1	Thailand			
162	V3253ABLM	Afghanistan	197	V3762BG	Iran	232	NM15-11	Thailand			
163	V3258AG	Afghanistan	198	V3763BG	Iran	233	NM20-11	Thailand			
164	V3262AG	Afghanistan	199	V3764AG	Iran	234	NM49-7	Thailand			
165	V3264BG	Afghanistan	200	V3766ABR	Iran	235	NM92	Thailand			
166	V3384BG	Nigeria	201	V3768AG	Iran	236	NM98	Thailand			
167	V3387AG	USA	202	V3769AG	Iran	237	NM3960A-89	Thailand			
168	V3404AG	Thailand	203	V3771BG	Iran	238	NM3960-88	Thailand			
169	V3476AG	Philippines	204	V3772BG	Iran	239	NM46-7-2	Thailand			
170	V3484AG	Pakistan	205	V1725ABR	Iran	240	NM63-15-8	Thailand			
171	V3726BG	India	206	V3780BG	Iran	241	NM45-24-1	Thailand			
172	V3731AG	Iran	207	V3781AGR	Iran	242	V1135AG	India			
173	V3732AG	Iran	208	V3783BG	Iran	243	V1270AG	India			
174	V3733AG	Iran	209	V3784AG	Iran	244	V2688BG	India			
175	V3734AG	Iran	210	V3787ABR	Iran	245	V3490AG	Indonesia			

¹Acc No. = Accession number

ที่มา : David *et al.* (1995)

1. การปลูกถั่วเขียวและการเก็บเกี่ยวผลผลิต

เตรียมแปลงโดยไถ พรวน และยกร่องขนาด 1 x 5 เมตร ปลูกโดยหยอดเมล็ดถั่วเขียวเป็นหลุม หลุมละ 2-3 เมล็ด ด้วยระยะปลูก 12.5 x 75.0 ซม. ในการปลูกถั่วเขียวทั้ง 250 พันธุ์ จะปลูกพันธุ์ละแถว ส่วนการปลูกพ่อแม่เพื่อผสมพันธุ์จะปลูกเป็น 2 ช่วง (planting date) ห่างกัน 1 สัปดาห์ เพื่อให้มีการออกดอกตรงกัน ให้น้ำตามร่อง พูนโคน ถากหญ้าและใส่ปุ๋ยรองพื้นสูตร 15-15-15 และสูตร 12-24-12 อัตราส่วน 20 กก./ไร่ ให้สม่ำเสมอทั่วทั้งแปลง บันทึกอายุวันออกดอกเมื่อถั่วเขียวมีจำนวนต้นที่ออกดอกประมาณ 50 % ของจำนวนต้นทั้งหมด บันทึกอายุเก็บเกี่ยวเมื่อถั่วเขียวมีจำนวนต้นที่มีฝักแก่ประมาณ 70 % ของจำนวนต้นทั้งหมดในแถว จากนั้นทยอยเก็บฝักแก่แยกต้นใส่ถุงกระดาษหรือถุงในลอน นำไปผึ่งแดดต่อให้แห้งสนิท บันทึกลักษณะจำนวนฝักต่อต้นและเมล็ดต่อฝัก จากนั้นแกะเมล็ดออกจากฝักใส่ถุงพลาสติกปากซิปลง บันทึกลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด และสีเปลือกหุ้มเมล็ด เก็บเมล็ดในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

2. การผสมพันธุ์ลูกผสม

ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์เพื่อตอนเกสรตัวผู้บนต้นแม่ออกในตอนเย็น โดยเลือกดอกที่คาดว่าจะบานในตอนเช้าของวันรุ่งขึ้น ซึ่งจะมีขนาดใหญ่พอประมาณ เติ่ง และเกสรตัวผู้ไม่ฟุ้งกระจายแล้วใช้ปากคีบแหวกกีบดอกจนสามารถดึงเกสรตัวผู้ออกได้ เช้าวันรุ่งขึ้นเก็บดอกตัวผู้ใส่ภาชนะแล้วใช้ปากคีบดึงเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียออกมาทั้งหมดพร้อมกันจากดอกตัวผู้ ป้ายเกสรตัวผู้บนยอดเกสรตัวเมียของดอกที่เตรียมไว้ ติดป้ายโดยใช้ดินสอเขียนชื่อพันธุ์ คู่ผสม และวันที่ผสมไว้ที่ก้านดอกอย่างหลวม ๆ หลังจากผสมแล้ว 1 - 2 วัน ถั่วเขียวจะเริ่มติดฝัก แต่ถ้าผสมไม่ติดดอกจะร่วงไป ถ้าติดฝักต้องมาขยับป้ายชื่อให้พอดีกับฝักเพื่อป้องกันการหล่นหาย และเด็ดฝักที่ไม่มีป้ายชื่อในข้อเดียวกันทิ้งไป แต่ละช่อดอกไม่ควรผสมเกิน 3 ดอก

3. การเตรียมตัวอย่างเมล็ดเพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟอสฟอรัส

อบฝักถั่วเขียวที่อุณหภูมิ 35 - 45 °C ประมาณ 48 ชม. เพื่อลดความชื้นในฝัก จากนั้น แกะเมล็ดที่อบแล้วมาบดด้วยเครื่องปั่นขนาด 30,000 รอบต่อนาที 3 นาที จนละเอียดเป็นผง ร่อนด้วยตะแกรง เก็บตัวอย่างบดละเอียดในถุงพลาสติกปากซิปลงใน desiccator แล้วเก็บไว้ในห้องเย็น 4 °C

4. การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด

ดัดแปลงจากทัศนีย์และคณะ (2532) ดังนี้

4.1 การสกัด

ชั่งตัวอย่างบดละเอียดประมาณ 1 ก. บันทึกรน้ำหนักอย่างละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) คลุกเคล้ากับผงแคลเซียมออกไซด์ 1 ก. ในถ้วยกระเบื้อง เเปที่ 550⁰ซ 5 ชม. เติม 2 N HCl 5 มล. ลงในถ้วยกระเบื้องที่มีเถ้า กรองด้วยกระดาษกรอง ปริมาตรด้วยน้ำอุ่นประมาณ 60-70⁰ซ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ทำ 3 ซ้ำ

4.2 การวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 25 ไมโครลิตร และ 2 N HCl, 5% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ 0.25% NH_4VO_3 อย่างละ 50 ไมโครลิตร แสดงไว้ในตารางที่ 4 เขย่าแล้วทิ้งไว้ 30 นาที ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วย ELISA reader การทำกราฟมาตรฐานฟอสฟอรัส ทำโดยผันแปรปริมาตรของฟอสฟอรัสมาตรฐาน (40 ppm Std.P) ระหว่าง 25 ถึง 150 ไมโครลิตร และผันแปรน้ำกลั่นระหว่าง 0 ถึง 125 ไมโครลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสและ reagent ต่าง ๆ ลงสู่ microplate ดังตารางที่ 4 จะได้ความเข้มข้น 0, 3.33, 6.67, 10.0, 13.33, 16.67 และ 20. 0 ppm P ตามลำดับ เขย่าแล้วทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วย ELISA reader จำนวนปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดต่อน้ำหนักของเมล็ด ดังนี้

$$\text{TP} = \frac{CV_f V_e}{10^3 WV_s}$$

เมื่อ TP = ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด (มก./ก.)

C = ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (ppm)

V_f = ปริมาตรสุดท้ายของสารตัวอย่างและสารที่ใช้เกิดปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)

V_e = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่สกัดได้ (มล.)

ตารางที่ 4 ปริมาตรสารตัวอย่างและสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)						ตัวอย่าง
	สารมาตรฐาน						
ตัวอย่าง	0	0	0	0	0	0	25
40 ppm Std.P	25	50	75	100	125	150	0
น้ำกลั่น	125	100	75	50	25	0	125
2 N HCl	50	50	50	50	50	50	50
5% (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	50	50	50	50	50	50	50
0.25% NH ₄ VO ₃	50	50	50	50	50	50	50
รวม	300	300	300	300	300	300	300

W = น้ำหนักตัวอย่าง (ก.)

V_s = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ในปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)

5. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์

ตามวิธีของ Pons and Guthrie (1946) ทำได้ดังนี้

5.1 การสกัด

โดยชั่งตัวอย่างบดละเอียดประมาณ 0.5 ก. ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ บันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) จากนั้น เติม 0.75 N กรดไตรคลอโรอะซิติก 25 มล. ลงไปในขวดรูปชมพู่ดังกล่าว แล้วเขย่า 200 รอบต่อนาทีที่ 25-30°C เป็นเวลา 1 ชม. ด้วย incubator shaker นำมากรองผ่านกระดาษกรองลงขวดที่มีฝาปิดขนาด 50 มล. ทำ 3 ซ้ำ

5.2 การวิเคราะห์

ปิเปตสารสกัดที่ได้ 2 มล. ลงสู่กรวยแยกขนาด 125 มล. จากนั้น เติม molybdate - sulfuric reagent 5 มล. (ประกอบด้วย 12.5 ก. ของแอมโมเนียมโมลิบเดตใน 10 N กรดกำมะถัน 100 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มล. ด้วยน้ำกลั่น) ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มล. ด้วยน้ำกลั่น เติม ไอโซบิวทานอล 10 มล. เขย่า 2 นาที ทั้งชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นน้ำ เติม 1 N กรดกำมะถัน 10 มล. เขย่า 2 นาที ทั้งชั้นล่าง เติม dil. stannous chloride 15 มล. (เตรียมโดยใช้ 1.34 M stannous chloride 1 มล. ผสมกับ 1 N กรดกำมะถัน 200 มล.) เขย่า 1 นาที ทั้งชั้นล่าง ถ่ายของเหลวในกรวยแยก (ชั้นไอโซบิวทานอล) ลงขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ล้างกรวยแยกและปรับปริมาตรด้วย 99.5% เอทานอล วัดค่าการดูดกลืนของสารละลายสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัสอินทรีย์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสอินทรีย์ โพแทสเซียมอโรฟอสเฟตเข้มข้น 1 มก. ฟอสฟอรัสต่อมล. แทนการใช้สารสกัดจากตัวอย่าง เพื่อทำปฏิกิริยาการเกิดสารละลายสีน้ำเงินดังกล่าว ที่ความเข้มข้น 0 0.02 0.03 และ 0.05 มก. ฟอสฟอรัสต่อ 25 มล. ตามลำดับ คำนวณปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ต่อน้ำหนักของเมล็ดดังนี้

$$IP = \frac{CV_e}{WV_s}$$

เมื่อ IP = ปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ด (มก./ก.)

C = ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสอินทรีย์ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (มก./25มล.)

V_e = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่สกัดได้ (มล.)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (ก.)

V_s = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ในปฏิกิริยา (มล.)

6. การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟอสฟอริก

ดัดแปลงจาก Sandberg and Ahderinne (1986) ดังนี้

6.1 การสกัดตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างบดละเอียดประมาณ 0.25 ก. บันทึกน้ำหนักร้อยละเอียดย (เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. จากนั้น เติม 0.5 N กรดเกลือ 15 มล. เขย่า 200 รอบต่อนาทีที่ 25-30 °C เป็นเวลา 2 ชม. ด้วย incubator shaker แล้วปั่นที่ 2,000g เป็นเวลา 10 นาที แช่วั่งส่วนน้ำใสในหลอดปั่นด้วยตู้เย็น -20°C ข้ามคืน (ประมาณ 15 ชม.) จากนั้น นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนน้ำแข็งละลายเป็นของเหลว กรองผ่านกระดาษกรองลงสู่ขวดที่มีฝาปิดขนาด 50 มล. (บันทึกปริมาตร) ระเหยแห้งของเหลวที่กรองได้ด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C ความดัน 57 มิลลิบาร์ ความเร็ว 200-250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที โดยความดันที่ใช้คำนวณได้จากสูตร

$$\log P = 3.006 - \frac{T_s - T_p}{bT_p}$$

เมื่อ P = ความดันที่ใช้

T_s = จุดเดือดที่ความดันบรรยากาศ (1,013 มิลลิบาร์)

T_p = อุณหภูมิของไอระเหยของสาร ซึ่งเท่ากับจุดเดือดของสารที่ความดัน P ในที่นี้คือ 40°C

b = ค่าคงที่เท่ากับ 0.159

จากนั้น ละลายส่วนที่เหลือด้วย 0.025 N กรดเกลือ 20 มล. กรองผ่านกระดาษกรอง บีบเปิดของเหลวที่ได้ลงสู่ preperation column ที่เตรียมโดยใช้ 0.025 N กรดเกลือ 15 มล. ไหลผ่านด้วยอัตราการไหล 0.4 มล. ต่อนาที สะลั่งสารอื่นที่ไม่ได้จับกับเรซินในคอลัมน์ด้วย 0.025 N กรดเกลือ 15 มล. จากนั้น สะกดไฟติกออกจากคอลัมน์ด้วย 2 N กรดเกลือ 10 มล. เก็บส่วนที่ชะได้ไว้ 25 มล. ด้วยกระบอกตวงขนาด 25 มล. แล้วเทลงสู่ขวดที่มีฝาปิดขนาด 50 มล. ล้างคอลัมน์ด้วย 0.025 N กรดเกลือ 15 มล. ระเหยแห้งส่วนที่ชะได้ด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น ละลายส่วนที่เหลือด้วยน้ำความบริสุทธิ์สูง 2 มล. กรองผ่าน millipore filter 0.45 ไมโครเมตร ลงสู่ vial ขนาด 2 มล. เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ทำ 3 ซ้ำ

6.2 การวิเคราะห์ด้วย RP-HPLC

เตรียมเฟสเคลื่อนที่ คือ 0.05 N กรดฟอร์มิก:เมทานอล ในอัตราส่วน 40:60 แล้วกรองผ่าน millipore filter 0.45 ไมโครเมตร ด้วยชุดกรองและปั๊ม จากนั้น เตรียมพร้อม analytical column ด้วยการใช้เฟสเคลื่อนที่ให้ไหลผ่านเป็นเวลา 1 ชม. ตั้งค่าเครื่อง ELSD ที่ drift tube temperature 98.5^oC อัตราการไหลของไนโตรเจน 2.2 ลิตรต่อนาที โดยอุณหภูมิและอัตราการไหลที่ใช้คำนวณได้จากสูตร

$$T_x = \sum rT_i$$

$$F_x = \sum rF_i$$

เมื่อ r = อัตราส่วนของสารนั้นในเฟสเคลื่อนที่

T_x = drift tube temperature ที่เหมาะที่จะใช้กับเฟสเคลื่อนที่

T_i = drift tube temperature ที่เหมาะที่จะใช้กับของเหลวองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่

F_x = gas flowrate ที่เหมาะที่จะใช้กับของเหลวองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่

F_i = gas flowrate ที่เหมาะที่จะใช้กับเฟสเคลื่อนที่

จากนั้น วาง vial ของสารสกัดในถาดของ autosampler โดยตั้งค่าเครื่อง autosampler ให้ฉีดตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร เมื่อเปลี่ยน vial ล้างเข็มฉีดทุกครั้งด้วยไอโซโพรพานอล 200 ไมโครลิตร และด้วยตัวอย่างเอง 10 ไมโครลิตร เดินเครื่องด้วยอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.3 มล. ต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที สร้างกราฟมาตรฐานของกรดไฟติกด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฟติก 10,000 ppm P ที่เตรียมจากโซเดียมไฟเตท ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ppm P คำนวณปริมาณไฟเตทฟอสฟอรัสและกรดไฟติกต่อน้ำหนักของเมล็ดดังนี้

$$\text{InsP} = \frac{CV_f}{10^3 W}$$

$$\text{PA} = 3.552 \text{InsP}$$

เมื่อ InsP = ปริมาณฟอสเฟตฟอสฟอรัส (มก./ก.)

PA = ปริมาณกรดฟอสฟอริก (มก./ก.)

C = ความเข้มข้นของฟอสเฟตฟอสฟอรัสที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (ppm)

V_f = ปริมาตรสุดท้ายของสารตัวอย่าง (มล.)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (ก.)

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

7.1 การแจกแจงความถี่

เป็นการจัดเรียงลำดับข้อมูลโดยจัดให้เป็นพวกหรือหมวดหมู่ ซึ่งจะถูกจำแนกออกเป็นชั้น ๆ ตามลำดับค่าของข้อมูล (กานดา, 2530) ทำให้ได้โดยค้นหาจำนวนชั้น จำนวนข้อมูลที่จะจัดเข้าสู่ชั้น จำนวนข้อมูลในแต่ละชั้น (อันตรภาค) เขียนขีดจำกัดบนและล่างของแต่ละชั้น แล้วพิจารณาแต่ละจำนวนว่าอยู่ในชั้นใด โดยทำรอยขีดของแต่ละชั้น แล้วนับจำนวนรอยขีดซึ่งจะเป็นจำนวนความถี่ของข้อมูลในชั้นนั้น ๆ (Leclercg *et al.*, 1966)

$$\text{จำนวนชั้น} = 2.5(\text{จำนวนตัวอย่าง})^{1/4}$$

$$\text{ค่าพิสัย} = \text{ค่าสูงสุด} - \text{ค่าต่ำสุด}$$

$$\text{จำนวนข้อมูลที่จะจัดเข้าสู่ชั้น} = \text{ค่าพิสัย} + 1$$

$$\text{อันตรภาค} = \frac{\text{ค่าพิสัย}}{\text{จำนวนชั้น}}$$

7.2 การทดสอบการแจกแจงปกติ

การแจกแจงปกติมีลักษณะเป็นโค้งระฆังคว่ำ สมมาตร ข้อมูลส่วนใหญ่มีค่าปานกลาง ข้อมูลที่มีค่าต่ำและสูงมากมีจำนวนน้อย และความสูงของส่วนโค้งขึ้นกับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การทดสอบสมมติฐานว่าข้อมูลมีการแจกแจงเป็นปกติใช้โปรแกรม SAS ด้วยชุดคำสั่ง proc univariate และคำสั่ง normal plot (ประเสริฐและคณะ, 2546)

7.3 การคำนวณทางสถิติ

ค่าทางสถิติที่ต้องคำนวณ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ความแปรปรวน (variance) ความเบ้ (skewness) ความโด่ง (kurtosis) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ซึ่งสามารถคำนวณได้โดยโปรแกรม SAS ด้วยชุดคำสั่ง proc univariate

7.4 การคำนวณสหสัมพันธ์

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย โดยคำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยโปรแกรม SAS ด้วยชุดคำสั่ง proc corr แล้วตรวจสอบลักษณะสองลักษณะที่ศึกษาที่มีความสัมพันธ์กัน

7.5 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย 2 กลุ่ม (group comparison)

ทำได้โดยคำนวณค่าสถิติที (t-test) ดังนี้

$$t = \frac{\bar{X}_A - \bar{X}_B}{S \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B}}}$$

$$S \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B}} = \sqrt{\frac{2 \text{ pool } S^2}{n}}$$

$$\text{pool } S^2 = \frac{SS_A + SS_B}{df_A + df_B}$$

ถ้ากลุ่ม 2 กลุ่มมีความแปรปรวนไม่เท่ากันแล้ว (ตรวจสอบได้จากการทดสอบสมมติฐาน

โดยใช้ค่าสถิติ F ; $F = \frac{S_A^2}{S_B^2}$) ให้ใช้ $df_{\text{effective}}$ ดังนี้

$$df_{\text{effective}} = \frac{\left(\frac{S_A^2}{n_A} + \frac{S_B^2}{n_B} \right)^2}{\frac{\left(\frac{S_A^2}{n_A} \right)^2}{n_A - 1} + \frac{\left(\frac{S_B^2}{n_B} \right)^2}{n_B - 1}}$$

$$S_{\bar{X}_A - \bar{X}_B} = \sqrt{\frac{S_A^2}{n_A} + \frac{S_B^2}{n_B}}$$

7.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance)

โดยคำนวณหาค่า sum of squares, mean square และค่าสถิติ F เพื่อทดสอบสมมติฐานว่าค่าเฉลี่ยของทริทเมนต์มีความแตกต่างกัน โดยใช้โปรแกรม SAS ชุดคำสั่ง proc anova หรือแบบ orthogonal comparison in CRD ด้วยชุดคำสั่ง proc glm

7.7 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทริทเมนต์

เมื่อทดสอบสมมติฐานแล้วพบว่า ค่าเฉลี่ยของทริทเมนต์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแล้ว แสดงว่า มีอย่างน้อย 2 ทริทเมนต์ที่มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ต้องทดสอบต่อไป เพื่อสรุปว่า ค่าเฉลี่ยทริทเมนต์คู่ใดบ้างที่แตกต่างกัน และค่าเฉลี่ยทริทเมนต์คู่ใดบ้างที่ไม่แตกต่างกัน (พิสมัย, 2547) โดยใช้วิธีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทริทเมนต์แบบ lsd แบบซ้ำไม่เท่า ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$lsd_{\alpha} = t_{\frac{\alpha}{2}, v} \sqrt{MS_E \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

เมื่อ α = ระดับนัยสำคัญซึ่งใช้ที่ระดับ 0.01

v = องศาอิสระของความคลาดเคลื่อน

MS_E = mean square error

n_i และ n_j = จำนวนข้อมูลของทรีทเมนต์ที่กำลังเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

7.8 การคำนวณหาอัตราพันธุกรรม

คำนวณหาอัตราพันธุกรรมอย่างกว้าง โดยการใช้ความแปรปรวนของประชากรที่มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมเหมือนกันได้จากสูตร

$$h^2 = \frac{V_G}{V_P}$$

โดยที่ $V_P = V_{F_2}$

$$V_E = \frac{V_{P_1} + V_{P_2} + V_{F_1}}{3}$$

$$= \frac{SSP_1 + SSP_2 + SSF_1}{(n_{P_1} - 1) + (n_{P_2} - 1) + (n_{F_1} - 1)}$$

$$V_G = V_P - V_E$$

เมื่อ V_G = ความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรม

V_P = ความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ

V_A = ความแปรปรวนเนื่องจากยีนแบบพลบวก

V_E = ความแปรปรวนเนื่องจากสภาพแวดล้อม

SS = sum square

n = จำนวนข้อมูลในแต่ละซ้ำ

7.9 การทดสอบอัตราส่วนด้วย Chi-square (χ^2) (Goodness-of-fit test)

เพื่อตรวจสอบหาความสอดคล้องกันระหว่างจำนวนสังเกต (O_i) กับจำนวนคาดหวัง (E_i) ในลูกซ้ำที่ 2 โดยใช้สัดส่วนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่กำหนดให้

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

7.10 การทดสอบอิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้ (xenia effect) บนต้นแม่

การทดสอบอัตราส่วนด้วย Chi-square ทำให้ทราบถึงการทำงานของยีนและปฏิกิริยาของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณกรดไฟติกในเมล็ด ซึ่งสามารถนำมาประเมินอิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้บนต้นแม่ได้ ดังตารางที่ 5 โดยที่หากมี xenia effect ควบคุมปริมาณกรดไฟติกแล้ว ไม่ว่ากรดไฟติกจะควบคุมด้วยยีนเด่นหรือด้อยก็ตาม เมล็ดซ้ำที่ 1 ทั้งผสมตรงและผสมกลับ จะต้องมีความปริมาณกรดไฟติกเหมือนลักษณะเด่นนั้น กล่าวคือ ถ้าลักษณะกรดไฟติกสูงเป็นลักษณะเด่น เมล็ดซ้ำที่ 1 ต้องมีกรดไฟติกสูงทั้งคู่ผสมตรงและผสมกลับ ในทางกลับกัน ถ้าลักษณะกรดไฟติกต่ำเป็นลักษณะเด่นแล้ว เมล็ดซ้ำที่ 1 ทั้งสองการผสมจะต้องมีกรดไฟติกต่ำตามไปด้วย แต่ถ้าลักษณะปริมาณกรดไฟติกไม่มี xenia effect เมล็ดซ้ำที่ 1 จะมีปริมาณกรดไฟติกไม่แตกต่างจากต้นแม่ในทั้งสองกรณี (possibility) ดังแสดงในตารางที่ 5

สถานที่ทำการทดลอง

1. แปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ.นครปฐม
2. ห้องปฏิบัติการวิจัย Plant Physio - Molecular Biology (PMB Lab) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ.นครปฐม

ตารางที่ 5 การแสดงอิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้ (xenia effect) บนต้นแม่

			Xenia effect in F ₁ seed	
Possibility		Cross ¹	No	Yes
I	High PA content controlled by dominant gene			
	Direct	Low x High	Low	High
	Reciprocal	High x Low	High	High
II	Low PA content controlled by dominant gene			
	Direct	Low x High	Low	Low
	Reciprocal	High x Low	High	Low

¹PA = phytic acid content

3. ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ.นครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

ระหว่างเดือน มิถุนายน 2547 ถึงเดือนเมษายน 2549

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การตรวจหาพันธุ์ถั่วเขียวที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดสูงและต่ำ

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว 250 พันธุ์ สามารถแจกแจงความถี่ออกได้เป็น 9 อันตรภาคชั้น ดังตารางที่ 6 โดยพบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดอยู่ในช่วง 2.34 ถึง 5.75 มก./ก. โดยพันธุ์ที่มีปริมาณสูงสุดคือ V1724AG ซึ่งมากกว่าพันธุ์ที่มีปริมาณต่ำสุด คือ V1137BG ถึง 59% สามารถเขียนกราฟการกระจายตัวของปริมาณดังกล่าวได้ดังภาพที่ 10 ซึ่งแสดงการกระจายตัวแบบปกติ มีความเบ้ซ้ายเล็กน้อย (ความเบ้เท่ากับ - 0.18) ข้อมูลมีความโด่งปกติ (มีความโด่งเท่ากับ 2.55) มีค่าเฉลี่ยเป็น 3.82 มก./ก. สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเป็น 11.96% การที่สายพันธุ์ชุดนี้แสดงความแตกต่างกันในปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดค่อนข้างสูง เพราะนำเข้ามาจาก 18 ประเทศทั่วโลก และทุกประเทศไม่มีการคัดเลือกเพื่อเพิ่มหรือลดปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด ค่าที่ได้จึงเป็นค่าสุ่มที่เป็นจริงในประชากรถั่วเขียว และไม่จำเป็นต้องมีการกระจายตัวแบบปกติ อย่างไรก็ตาม ความแปรปรวนของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดอาจเปลี่ยนแปลงไปได้เล็กน้อยขึ้นอยู่กับ สภาพะดิน การใส่ปุ๋ย ความชื้นในดิน และสภาพภูมิอากาศ (Raboy and Dickinson, 1993) ทั้งนี้เพราะ ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมมีผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่พืชจะดูดซึมจากดิน ในขณะที่ปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นตัวจำกัดระดับความสามารถในการดูดซึมฟอสฟอรัสที่มีในดินไปใช้

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดถั่วเขียว

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด ทำให้สามารถแบ่งเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดสูงสุด 5 พันธุ์ และกลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดต่ำสุด 5 พันธุ์ ดังตารางที่ 7 จากนั้น นำเมล็ดถั่วเขียวทั้ง 10 พันธุ์ มาวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสอนินทรีย์ ไฟเตทฟอสฟอรัส และกรดไฟติก รวมถึงคำนวณหา เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอนินทรีย์สัมพัทธ์ เปอร์เซ็นต์ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์ และค่าทางสถิติต่าง ๆ (ตารางที่ 7) พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสอนินทรีย์อยู่ในช่วง 0.34 - 0.59 มก./ก. พันธุ์ที่มีปริมาณต่ำสุดและสูงสุด คือ V1141BG และ V1724AG ตามลำดับ ปริมาณไฟเตทฟอสฟอรัสและกรดไฟติกอยู่ในช่วง 1.67 - 5.03 มก./ก. และ 5.94 - 17.87 มก./ก. ตามลำดับ โดยพันธุ์ที่มีปริมาณทั้งสองต่ำสุดและสูงสุด ได้แก่ V1658BBR และ V1724AG เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอนินทรีย์สัมพัทธ์อยู่

ในช่วง 6.3 - 19.1% โดยพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวต่ำสุดและสูงสุด ได้แก่ V1141BG และ V3251ABLM ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 70.3 - 98.0% โดยพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวต่ำสุดและสูงสุด ได้แก่ V1658BBR และ V1687ABLM ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสฟอรัสต่าง ๆ ในเมล็ดระหว่าง 2 กลุ่ม ได้ผลดังตารางที่ 8 พบว่า ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ไฟเตทฟอสฟอรัส กรดไฟติก และเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอนินทรีย์สัมพัทธ์แตกต่างกัน แต่ปริมาณฟอสฟอรัสอนินทรีย์และเปอร์เซ็นต์ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นเพราะปริมาณฟอสฟอรัสอนินทรีย์ในเมล็ดถั่วเขียวที่เจริญเต็มที่ มีปริมาณไม่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะมีความฟอสฟอรัสทั้งหมดสูงหรือต่ำ Raboy (2003) รายงานว่า ปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียวที่เจริญเต็มที่เพิ่มขึ้นจาก $75.0 \pm 10\%$ เป็นมากกว่า 90% ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด ในขณะที่สารประกอบฟอสฟอรัสอนินทรีย์ในเมล็ด มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึม เพื่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการ (Schachtman *et al.*, 1998) เมื่อเมล็ดพัฒนาเต็มที่ ฟอสฟอรัสจึงถูกเก็บสะสมในรูปของกรดไฟติก และจะถูกย่อยเป็นฟอสฟอรัสอนินทรีย์อีกครั้งในกระบวนการงอก เมล็ดที่เจริญเต็มที่ซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัสอนินทรีย์ที่ค่อนข้างคงที่ด้วยระบบการรักษาสมดุล (homeostasis) โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของการขนส่งระหว่างเยื่อเซลล์ (membrane transport) และการเปลี่ยนรูปของสารประกอบฟอสฟอรัสในเซลล์ (phosphorus intracellular pools) ซึ่งฟอสฟอรัสจะอยู่ในรูปใดขึ้นอยู่กับที่อยู่ เช่น ในไซโตพลาสซึมมี H_3PO_4 แวกัวโอลและอะโพพลาสซึมมีทั้ง $H_2PO_4^-$ และ HPO_4^{2-} เป็นต้น ส่วนปัจจัยอื่น ๆ ที่กำหนดรูปของฟอสฟอรัสอนินทรีย์ คือ pH ชนิดของเนื้อเยื่อ อายุ และปริมาณฟอสฟอรัสที่ได้รับจากดิน นอกจากนี้ ยังพบสารประกอบฟอสฟอรัสอนินทรีย์ในรูปเกลือของแร่ธาตุต่าง ๆ อีกประมาณ 170 ชนิด (Schachtman *et al.*, 1998)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณไฟเตทฟอสฟอรัสและกรดไฟติกด้วย RP-HPLC พบว่า โครมาโทแกรมของถั่วเขียวทั้ง 10 พันธุ์ มี 2 พีก (ภาพที่ 11) เหมือนกับสารมาตรฐานไซเดียมไฟเตท แสดงว่า inositol phosphate ที่นำมาวิเคราะห์ดังกล่าวมีอย่างน้อย 2 form ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการที่กรดไฟติกถูกย่อยสลายเป็น myo - inositol phosphate (InsP) ที่มีจำนวนหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่า 6 หมู่ หรือเปลี่ยน isoform ไป เช่น cis-, epi-, muco-, chiro-, allo-, neo- หรือ scyllo - inositol phosphate ดังภาพที่ 6 หรือเปลี่ยน conformation ดังภาพที่ 7 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสภาวะที่สกัดซึ่งมี pH ต่ำ (ประมาณ 2 - 3) และอุณหภูมิสูงขณะระเหยแห้ง (40°C) และขณะที่ผ่าน detector (98.5°C) นอกจากนี้ InsP ในเมล็ดถั่วเขียวอาจมีมากกว่า 1 รูป เช่นเดียวกับรายงานของ Ockenden *et al.* (2004) ที่พบ 4 รูป ได้แก่ InsP_3 , InsP_4 , InsP_5 และ InsP_6 ในข้าวบาเลย์พันธุ์กลายที่มีปริมาณ

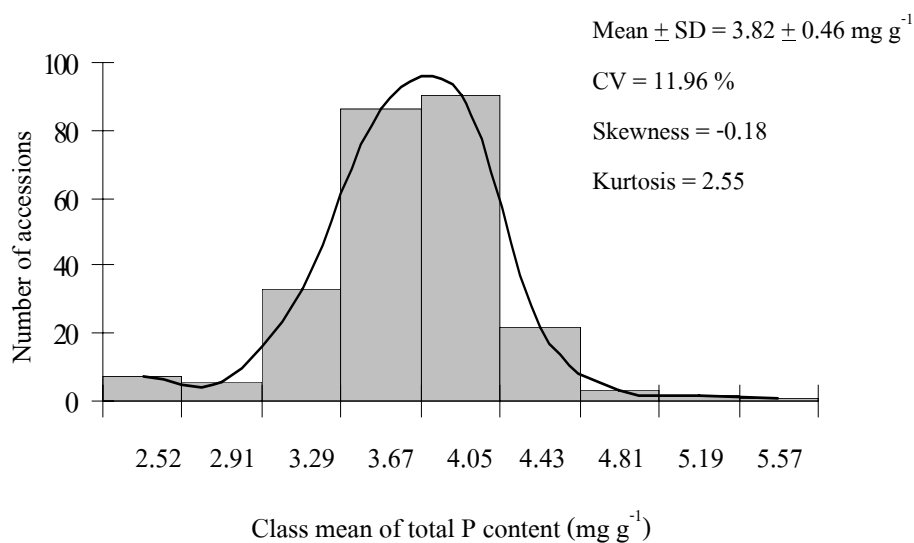
กรดฟอสฟอริก นอกจากนี้ Dorsch *et al.* (2003) และ Raboy *et al.* (2000) ยังพบ InsP ในข้าวบาเลย์ และข้าวโพดมากกว่า 1 รูป และได้ตรวจสอบหาโครงสร้างของ InsP ด้วย NMR (nuclear magnetic resonance) ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงรวมพื้นที่ได้ฟอสฟอรัสทั้ง 2 ฟอสเฟต มาคำนวณเป็นปริมาณ InsP รวม และ ประเมินเป็นปริมาณฟอสเฟตฟอสฟอรัส เพื่อคำนวณเป็นปริมาณกรดฟอสฟอริกต่อไป

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ ในเมล็ด กับลักษณะทางพืชไร่ บางประการในถั่วเขียวทั้ง 10 พันธุ์ ได้ผลดังตารางที่ 9 แต่เนื่องจากปริมาณกรดฟอสฟอริกได้จากการ คำนวณด้วยปริมาณฟอสเฟตฟอสฟอรัสโดยตรง การทดลองครั้งนี้จึงใช้ปริมาณกรดฟอสฟอริก แต่ไม่ใช่ ปริมาณฟอสเฟตฟอสฟอรัสในการคำนวณสหสัมพันธ์ ซึ่งพบว่า ปริมาณกรดฟอสฟอริกมีสหสัมพันธ์ใน ทางบวกกับปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด ($r = 0.98$) ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Raboy *et al.* (2000) และ Raboy *et al.* (2001) รายงานไว้ว่า ในพืชไร่ทั่วไปมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.95 และ 0.90 ตามลำดับ นอกจากนี้ ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดและกรดฟอสฟอริก ยังสัมพันธ์ในทางลบกับ เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพันธ์ ($r = -0.90$ และ -0.93 ตามลำดับ) ส่วนฟอสฟอรัสอินทรีย์ มีความสัมพันธ์กับอายุเก็บเกี่ยว ($r = 0.87$) เพียงลักษณะเดียว ความสัมพันธ์ดังกล่าว สามารถแสดง ให้เห็นได้ดังภาพที่ 12

ตารางที่ 6 การจัดอันดับภาคส่วนของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดของถั่วเขียว 250 พันธุ์ ที่ รวบรวมจาก 18 ประเทศ

Class no.	Class range (mg P g ⁻¹)	Class mean (mg P g ⁻¹)	Frequency
1	2.34-2.71	2.52	7
2	2.72-3.09	2.91	6
3	3.10-3.47	3.29	33
4	3.48-3.85	3.67	86
5	3.86 - 4.23	4.05	90
6	4.24 - 4.61	4.43	22
7	4.62 - 4.99	4.81	3
8	5.00 - 5.37	5.19	2
9	5.38 - 5.75	5.57	1
sum			250

ภาพที่ 10 ความแปรปรวนของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดถั่วเขียว 250 พันธุ์



ตารางที่ 7 ปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดถั่วเขียวกลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดต่ำสุด (ลำดับที่ 1 - 5) และกลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดสูงสุด (ลำดับที่ 6 -10)

No.	Accession number	Content ¹ (mg g ⁻¹)				%	
		TP	IP	InsP	PA	IP/TP	InsP/TP
Accessions with low P-compounds							
1	V1158AG	2.34	0.37	1.69	6.01	15.7	72.3
2	V1658BBR	2.38	0.40	1.67	5.94	16.7	70.3
3	V1137BG	2.39	0.38	1.98	8.20	15.8	96.6
4	V3251ABLM	2.43	0.46	1.95	7.25	19.1	84.0
5	V1687ABLM	2.44	0.35	2.09	8.49	14.4	98.0
Accessions with high P-compounds							
6	V1725BG	4.71	0.59	3.63	12.91	12.5	77.2
7	V3092AG	4.92	0.43	4.12	14.65	8.7	83.8
8	V1722BG	5.03	0.44	4.53	16.11	8.6	90.2
9	V1141BG	5.32	0.34	4.97	17.66	6.3	93.5
10	V1724AG	5.75	0.59	5.03	17.87	10.3	87.5
	Mean±SD	3.77±1.47	0.44±0.09	3.17±1.42	11.51±4.84	12.8±4.24	85.3±9.83
	CV (%)	39.10	20.77	44.88	42.05	33.10	11.53

¹TP = total P content, IP = inorganic P content, InsP = phytate P content, PA = phytic acid content

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างถั่วเขียว 2 กลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดสูงและต่ำ

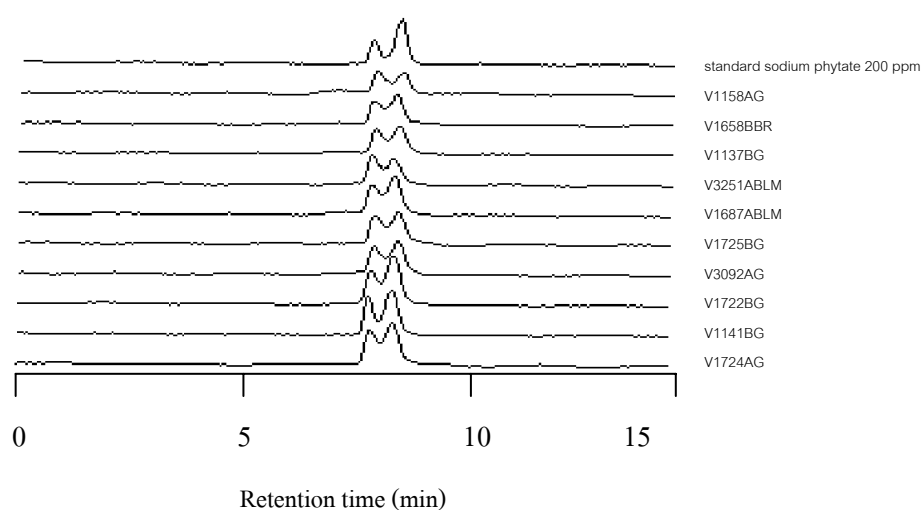
Content ¹	t - test
TP	15.19**
IP	1.66
Ins P	9.31**
PA	8.26**
%IP/TP	5.47**
%InsP/TP	0.34

¹TP = total P content, IP = inorganic P content, InsP = phytate P content, PA = phytic acid content

** Significantly different at 0.01 probability level

ภาพที่ 11 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียวด้วย

RP-HPLC-ELSD



ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดกับลักษณะทางพืชไร่ของถั่วเขียว 10 พันธุ์

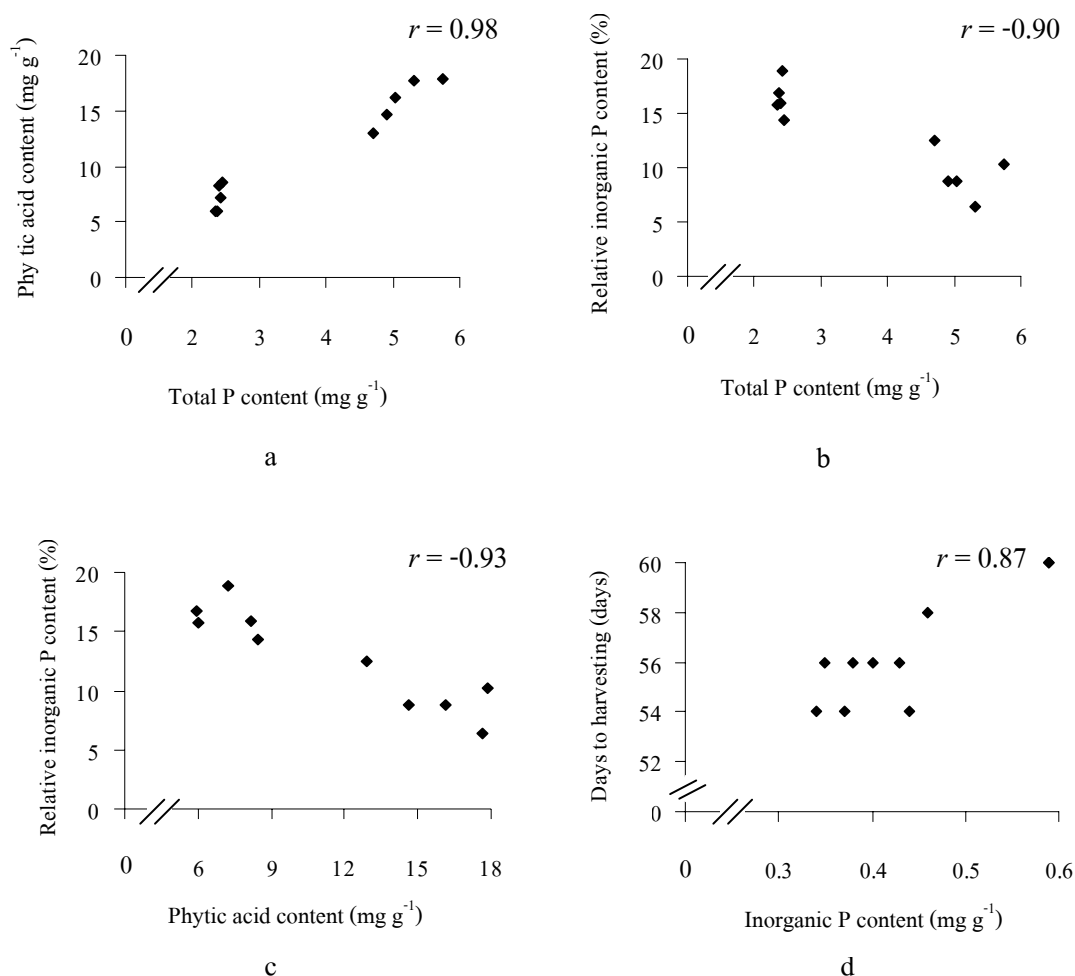
Trait ¹	TP	IP	InsP	PA	%IP/TP	%InsP/TP
IP	0.50					
InsP	0.99**	0.40				
PA	0.98**	0.38	1.00**			
%IP/TP	-0.90**	-0.11	-0.93**	-0.93**		
%InsP/TP	0.18	-0.24	0.29	0.37	-0.34	
Pd/Plt	0.16	-0.35	0.22	0.27	-0.37	0.62
Sd/Pd	0.16	-0.07	0.20	0.19	-0.15	0.06
HSW	0.03	0.14	-0.04	-0.10	0.03	-0.68
DAF	-0.33	0.11	-0.16	-0.32	0.31	0.23
DAH	0.21	0.87**	0.12	0.12	0.15	-0.12

¹TP = total P content, IP = inorganic P content, InsP = phytate P content, PA = phytic acid content, Pd/Plt = number of pods/plant, Sd/Pd = number of seeds/pod, HSW = 100-seed weight, DAF = days to flowering, DAH = days to harvesting

** Significant at 0.01 probability level

3. การศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ด

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและค่าเฉลี่ยของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ฟอสฟอรัสอินทรีย์ ไฟเตทฟอสฟอรัส กรดไฟติก เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพัทธ์ และเปอร์เซ็นต์ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์ในเมล็ดพ่อแม่ ลูกชั่วที่ 1, 2 และ 3 ได้ผลดังตารางที่ 10 และ 11 พบว่าค่าเฉลี่ยของทุกลักษณะแตกต่างกันในระหว่างพ่อแม่ แต่ไม่แตกต่างกันระหว่างลูกแต่ละชั่ว ยกเว้นเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพัทธ์และเปอร์เซ็นต์ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์ ที่มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้งในระหว่างพ่อแม่และลูกแต่ละชั่ว



ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดกับปริมาณกรดไฟติก (a), ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดกับเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพัทธ์ (b), ปริมาณกรดไฟติกกับเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพัทธ์ (c), และปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์กับอายุเก็บเกี่ยว (d) ของถั่วเขียวที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดสูง 5 สายพันธุ์ และปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดต่ำ 5 สายพันธุ์

Oltman *et al.* (2004) รายงานว่า ไม่มีอิทธิพลทางพันธุกรรมจากไซโตพลาสซึมของแม่ต่อปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเหลือง (ไม่มี maternal effect) ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาเฉพาะอิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้บนต้นแม่ (xenia effect) ที่มีต่อปริมาณฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดถั่วเขียว ด้วยการวิเคราะห์ในลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งผสมตรง (V1658BBR x V1141BG) และผสมกลับ (V1141BG x V1658BBR) พบว่า ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ไฟเตทฟอสฟอรัส และกรดไฟติกในเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งสองการผสมไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากพ่อและแม่

(ตารางที่ 12) ยกเว้นปริมาณฟอสฟอรัสอนินทรีย์ที่ต่างกันระหว่างกลุ่ม และต่างจากพ่อแม่ นอกจากนี้ ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นคู่ ๆ (ตารางที่ 13) พบว่า เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ของการผสมตรงและผสมกลับมีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด ไฟเตทฟอสฟอรัส และกรดไฟติกไม่ต่างจาก V1141BG ซึ่งมีปริมาณกรดไฟติกสูง จึงสรุปได้ว่า มีอิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้บนต้นแม่ เพราะผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นคู่ ๆ ดังกล่าว พบว่า สอดคล้องกับการมีอิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้ ในกรณีที่ลักษณะปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสทั้งสามชนิดที่มากเป็นลักษณะเด่น (ตารางที่ 5) โดยเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งสองกลุ่มผสมมีปริมาณกรดไฟติกสูง ตามลักษณะที่ยีนเด่นควบคุม

ค่าเฉลี่ยและค่าทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ด F_3 จากต้น F_2 เป็นดังตารางที่ 14 ซึ่งพบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ฟอสฟอรัสอนินทรีย์ ไฟเตทฟอสฟอรัส กรดไฟติก เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอนินทรีย์สัมพัทธ์ และเปอร์เซ็นต์ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์ มีค่าอยู่ในช่วง 2.42 - 6.11 มก./ก., 0.25 - 0.73 มก./ก., 1.77 - 5.79 มก./ก., 6.29 - 20.57 มก./ก. 5.17 - 21.00% และ 64.6 - 96.2% ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดของต้นชั่วที่ 2 (12.58 มก./ก. จากตารางที่ 14) เทียบกับค่าเฉลี่ยปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดทุกชั่ว (12.36 มก./ก. จากตารางที่ 11) รวมถึงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดไฟติกในเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว 10 พันธุ์ (11.51 มก./ก. จากตารางที่ 7) ใกล้เคียงกับที่ Chitra *et al.* (1995) ได้รายงานไว้ว่า เมล็ดถั่วเขียวมีปริมาณกรดไฟติกเฉลี่ย 12.0 มก./ก. นอกจากนี้ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอนินทรีย์สัมพัทธ์ในเมล็ดของต้นชั่วที่ 2 และทุกชั่ว (9.30% จากตารางที่ 14 และ 9.33% จากตารางที่ 11) ก็ใกล้เคียงกับที่ Larson *et al.* (2000) รายงานไว้ว่า มี $5 \pm 3\%$ ในเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์กลาย

ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ฟอสฟอรัสอนินทรีย์ ไฟเตทฟอสฟอรัส และกรดไฟติก ในเมล็ดถั่วเขียวจากต้นชั่วที่ 2 สามารถนำมาแจกแจงความถี่และจัดได้ 10, 7, 9 และ 9 ชั้นตามลำดับ ดังตารางที่ 15, 16, 17 และ 18 ตามลำดับ และเขียนกราฟการกระจายตัวได้ดังภาพที่ 13, 14, 15 และ 16 ตามลำดับ ซึ่งทุกลักษณะไม่พบการกระจายตัวแบบปกติ ($P = 0.0075, 0.0001, 0.0333$ และ 0.0329 ตามลำดับ) โดยปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ไฟเตทฟอสฟอรัส และกรดไฟติก แสดงการกระจายตัวแบบ transgressive ในทางบวกและทางลบที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 มีความเบ้ขวาเล็กน้อยเท่ากับ 0.56 0.44 และ 0.44 ตามลำดับ และมีความโด่งต่ำกว่าปกติ โดยมีค่าเท่ากับ 0.54 ในขณะที่ปริมาณฟอสฟอรัสอนินทรีย์มีการกระจายแบบ transgressive ในทางลบที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 ความเบ้ขวาเป็น 2.13 และความโด่งเกินปกติเท่ากับ 7.75 คาดว่า การกระจายตัวแบบ transgressive ในปริมาณ

สารประกอบฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดจากต้นข้าวที่ 2 นั้น อาจเป็นผลทั้งจากพันธุกรรม (การที่พ่อแม่อาจมีพันธุกรรมไม่บริสุทธิ์) และสภาพแวดล้อม เพราะเมื่อทดสอบโดยใช้ค่าเฉลี่ยของพ่อแม่จากฤดูก่อนหน้าไม่พบการกระจายแบบ transgressive อีก และเมื่อแบ่งปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดไฟเตทฟอสฟอรัส และกรดไฟติก โดยใช้ค่ากึ่งกลางของค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งเมื่อทดสอบ Chi-square (χ^2) ดังตารางที่ 19 พบว่า ลักษณะทั้งสามมีอัตราส่วนของปริมาณที่มากและน้อยสอดคล้องกับอัตราส่วน 9 : 7 ซึ่งเป็นอัตราส่วนของปฏิกิริยาของยีน 2 คู่แบบ duplicated recessive epistasis โดยลักษณะปริมาณน้อยถูกควบคุมด้วยยีนด้อยที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง หรือทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำให้จีโนไทป์ aaB_, A_bb และ aabb มีปริมาณกรดไฟติกต่ำ ในขณะที่จีโนไทป์ A_B_ มีปริมาณกรดไฟติกสูง ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Oltman *et al.* (2004) ที่ศึกษาการกระจายตัวของลูกรุ่นที่ 2 ที่เกิดจากการผสมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์กลายที่มีปริมาณกรดไฟติกต่ำกับถั่วเหลืองปกติ พบว่า ลักษณะปริมาณกรดไฟติกต่ำถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่คือ *pha1* และ *pha2* แต่ต่างกันที่มีปฏิกิริยาระหว่างยีนแบบ duplicated dominant epistasis (15:1) เช่นเดียวกับรายงานของ Walker *et al.* (2006) ที่พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์กลายที่มีปริมาณกรดไฟติกต่ำ (CX1834-1-2) ควบคุมด้วยยีน 2 ตำแหน่งที่มีปฏิกิริยาต่อกัน (epistasis) ในข้าวบาเลย์และข้าวโพดก็พบยีน 2 ตำแหน่งที่ควบคุมปริมาณกรดไฟติกต่ำ ได้แก่ *lpa1-1* และ *lpa2-1* โดยเชื่อว่า *lpa1-1* เกิดจากการกลายพันธุ์ที่มีส่วนสำคัญในช่วงแรกของกระบวนการสังเคราะห์กรดไฟติก เช่น การถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์เอนไซม์ MIPs (D-myoinositol 3-phosphate synthase) ที่เปลี่ยน glucose 6-phosphate เป็น myo-inositol 3-phosphate ดังภาพที่ 5 และ *lpa2-1* คือ การกลายพันธุ์ในส่วน of inositol phosphate kinase gene (Pilu *et al.*, 2003) ในข้าวโพด Raboy *et al.* (2000) เชื่อว่า *lpa1-1* และ *lpa2-1* เป็นยีนด้อย และ Larson *et al.* (2000) ศึกษาในข้าวก็พบว่า *lpa1* น่าจะ encode ให้ MIPs Pilu *et al.* (2005) พบว่า การกลายพันธุ์ของข้าวโพดที่มีปริมาณกรดไฟติกต่ำ (LR33 mutant) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบส 1 ตัวในรหัส codon ที่กำหนดกรดอะมิโนตัวที่ 396 ของเอนไซม์ MIPs และยังพบอีกว่า ข้าวโพดพันธุ์กลายอีกพันธุ์ (*lpa241* mutant) มีปริมาณกรดไฟติกต่ำเนื่องจาก epigenetic mutation คือ ไม่ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการหลังถอดรหัส (post-transcription) โดยเกิดการเติมหมู่เมทิล (methylation) บนเบส ทำให้โครงสร้างของโครมาตินบริเวณของ MIPs gene เปลี่ยนไป

ผลการประเมินอัตราพันธุกรรมของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ไฟเตทฟอสฟอรัส และกรดไฟติกมีค่าใกล้เคียงกันคือ 80.8 80.7 และ 80.7% ตามลำดับ (ตารางที่ 20) ส่วนอัตราพันธุกรรมของปริมาณฟอสฟอรัสอนินทรีย์เป็น 78.6% เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอนินทรีย์สัมพัทธ์ และ

เปอร์เซ็นต์ ไฟเตฟอสฟอรัสสัมพัทธ์เป็น 68.1 และ 66.0% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่ Coelho *et al.* (2002) ได้รายงานไว้ในถั่วเหลืองที่ปลูกที่ประเทศบราซิลว่า ปริมาณกรดไฟติกมีอัตราพันธุกรรม 81% อัตราพันธุกรรมทั้งหมดจัดว่าสูง แสดงว่าลักษณะปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ กระทบกระเทือนน้อยจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อม สามารถจัดเป็นลักษณะคุณภาพที่ถูกควบคุมด้วยยีนน้อยคู่หรือมียีนหลัก (major gene) ทำให้สามารถจัดแยกกลุ่มการกระจายตัวในลูกชั่วที่ 2 ได้

ผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า มียีนหลักควบคุมปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดไฟเตฟอสฟอรัส กรดไฟติก และฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ดถั่วเขียวอยู่เพียงไม่กี่คู่ และมีความสามารถในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูง อย่างไรก็ตาม จากการพบการกระจายตัวแบบปกติของฟอสฟอรัสทั้งหมดในเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว 250 พันธุ์ แสดงว่ามีกลุ่มยีนรองหรือยีนที่มีอิทธิพลน้อย (minor genes, modifying genes หรือ modifiers) ควบคุมลักษณะนี้อยู่ด้วย ซึ่งสามารถอธิบายขั้นตอนการสังเคราะห์กรดไฟติกได้ว่า มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนต่าง ๆ อยู่หลายเอนไซม์ โดยมียีน 2 ตำแหน่งควบคุมเอนไซม์สำคัญ (rate limiting enzyme) ได้แก่ MIPs (Larson *et al.*, 2000) เป็นต้น ซึ่งสามารถควบคุมการสร้างกรดไฟติกได้มากกว่าเอนไซม์อื่น ๆ ที่อาจควบคุมด้วยยีนที่มีอิทธิพลน้อย นักปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวจึงสามารถคัดเลือกเพื่อเพิ่มหรือลดปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ดได้ โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์ที่ใช้กับพืชผสมตัวเองทั่ว ๆ ไป ได้แก่ วิธีคัดเลือกแบบบันทึกประวัติ (pedigree selection) วิธีคัดเลือกแบบเก็บ 1 เมล็ดต่อต้น (single seed descent selection) วิธีคัดเลือกรวม (bulk selection) หรือวิธีทดสอบชั่วต้น ๆ (early generation testing) ก็ได้

จากผลการทดลองที่ผ่านมา สามารถใช้เป็นแนวทางการศึกษาต่อไปได้ โดยศึกษายีนหลักที่ควบคุมปริมาณกรดไฟติก ด้วยการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวในถั่วเขียว ซึ่งอาศัยการหาข้อมูลลำดับดังกล่าวจากพืชอื่น ๆ ที่มีในฐานข้อมูลได้แก่ Arabidopsis ข้าว และถั่วเหลือง เป็นต้น นอกจากนี้ ยังอาจศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมบางส่วน (partial genetic map) โดยจัดเครื่องหมายโมเลกุลที่มีเข้าสู่ linkage group สั้น ๆ ที่มีพื้นที่บนโครโมโซมครอบคลุมยีนหลักทั้ง 2 ตำแหน่ง ซึ่งแผนที่ดังกล่าวจะถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์หา QTL (quantitative trait loci) อันจะนำมาสู่การใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้มีปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 10 ความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ดถั่วเขียวหัวพ่อแม่ และเมล็ดชั่วที่ 1, 2 และ 3

Source	df	Mean square ¹					
		TP	IP	InsP	PA	%IP/TP	%InsP/TP
Generations	4	2.5684**	0.0140*	2.0828**	26.2047**	4.20	1.55
Error	187	0.4802	0.0037	0.5248	6.6291	4.93	21.87
Total	191						

¹TP = total P content, IP = inorganic P content, InsP = phytate P content, PA = phytic acid content

** Significantly different at 0.01 probability level

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ดถั่วเขียวหัวพ่อแม่ และเมล็ดชั่วที่ 1, 2 และ 3

Generations	Mean ¹ (mg g ⁻¹)					
	TP	IP	InsP	PA	%IP/TP	%InsP/TP
P ₁ (V1658BBR)	3.09b	0.30b	2.77b	9.82b	9.7	89.6
P ₂ (V1141BG)	4.10a	0.38a	3.65a	12.96a	9.3	88.9
F ₁	3.78ab	0.28b	3.42ab	12.14ab	7.6	90.2
F ₂	3.31b	0.34ab	2.94b	10.46b	10.3	89.0
F ₃	3.95a	0.36a	3.54a	12.58a	9.3	89.1
Mean±SD	3.89±0.59	0.35±0.04	3.48±0.64	12.36±2.26	9.33±1.97	89.16±3.97
CV(%)	15.29	11.48	18.29	18.31	21.12	4.46

¹Means in a column followed by the same letter are not different at $P \leq 0.05$ by Fisher's least significant difference (lsd).

TP = total P content, IP = inorganic P content, InsP = phytate P content, PA = phytic acid content

ตารางที่ 12 ความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ดของพ่อแม่ (V1658BBR x V1141BG) กับลูกผสมชั่วที่ 1 (แยกผสมตรงกับผสมสลัป)

Source	df	Mean square ¹					
		TP	IP	InsP	PA	%IP/TP	%InsP/TP
Generations	3	1.8054**	0.0139**	1.4145**	17.7807**	3.63	2.22
Between parents	1	5.1005**	0.0336**	3.9072**	49.1097**	0.45	1.80
Between F ₁	1	0.0228	0.0042*	0.0170	0.2090	1.40	0.08
Parents vs F ₁	1	0.2930	0.0038*	0.3192	4.0233	9.05	4.77
Error	22	0.1362	0.0008	0.1444	1.8354	1.15	6.36
Total	25						

¹TP = total P content, IP = inorganic P content, InsP = phytate P content, PA = phytic acid content

** Significantly different at 0.01 probability level

* Significantly different at 0.05 probability level

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ดของพ่อแม่และลูกผสมชั่วที่ 1 (แยกผสมตรงกับผสมสลัป)

Generations	Mean ¹ (mg g ⁻¹)					
	TP	IP	InsP	PA	%IP/TP	%InsP/TP
P ₁ (V1658BBR)	3.09b	0.30c	2.77b	9.82b	9.7	89.6
P ₂ (V1141BG)	4.10a	0.38a	3.65a	12.96a	9.3	88.9
F ₁ (V1658BBRxV1141BG)	3.78a	0.28c	3.42a	12.14a	7.6	90.2
F ₁ (V1141BGxV1658BBR)	3.91a	0.34b	3.52a	12.51a	8.6	90.1
t-test of the difference between F ₁	0.23 ^{ns}	0.48 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.35 ^{ns}	1.54 ^{ns}	0.09 ^{ns}

¹Means in a column followed by the same letter are not different at $P \leq 0.05$ by Fisher's least significant difference (lsd). TP = total P content, IP = inorganic P content, PA = phytic acid content

^{ns}Non - significant different

ตารางที่ 14 ค่าทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสต่าง ๆ ในเมล็ดถั่วเขียวที่ติดบนต้นข้าวที่ 2 (เมล็ดข้าวที่ 3)

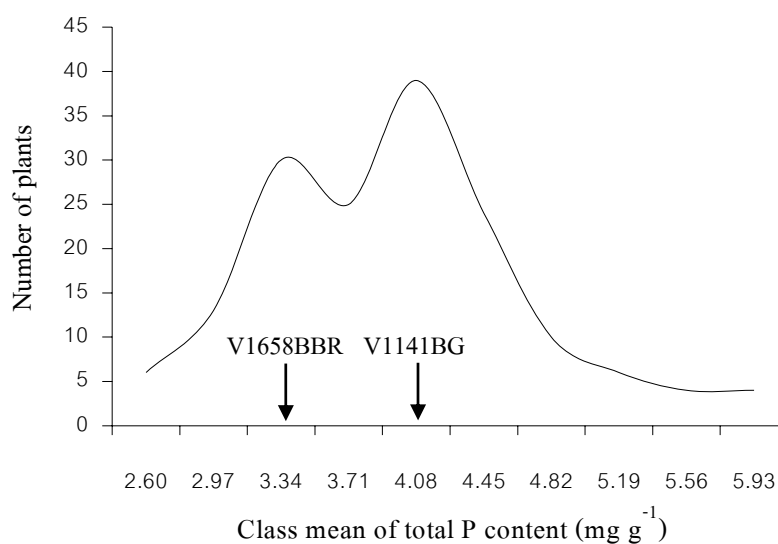
Content ¹	Mean±SD (mg g ⁻¹)	Variance	CV (%)	Skewness	Kurtosis
TP	3.95±0.74	0.54	18.60	0.56	0.54
IP	0.36±0.06	0.00	18.22	2.13	7.75
InsP	3.54±0.77	0.59	21.72	0.44	0.54
PA	12.58±2.73	7.47	21.73	0.44	0.54
%IP/TP	9.30±2.32	5.39	25.01	1.19	3.42
%InsP/TP	89.13±4.96	24.64	5.57	-2.36	6.87

¹TP = total P content, IP = inorganic P content, InsP = phytate P content, PA = phytic acid content

ตารางที่ 15 การจัดอันดับภาคชั้นของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดถั่วเขียวจากต้นข้าวที่ 2

Class no.	Class range (mg P g ⁻¹)	Class mean (mg P g ⁻¹)	Frequency
1	2.42-2.78	2.6	6
2	2.79-3.15	2.97	13
3	3.16-3.52	3.34	30
4	3.53-3.89	3.71	25
5	3.90-4.26	4.08	39
6	4.27-4.63	4.45	24
7	4.64-5.00	4.82	10
8	5.01-5.37	5.19	6
9	5.38-5.74	5.56	4
10	5.75-6.11	5.93	4
sum			161

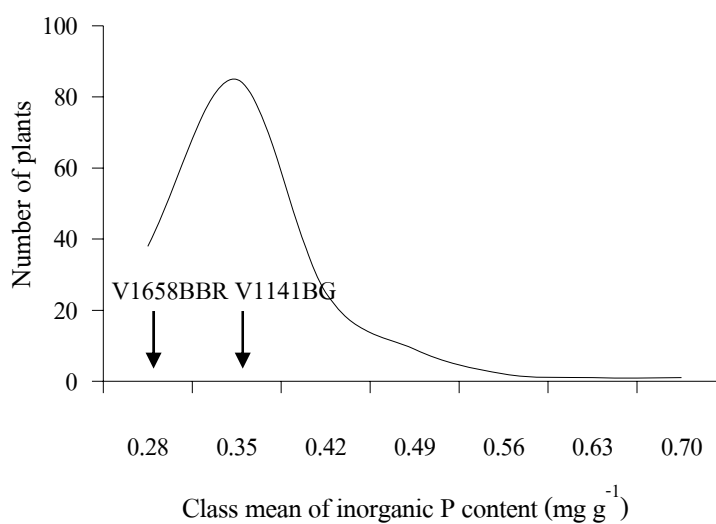
ภาพที่ 13 การกระจายตัวของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดถั่วเขียวจากต้นข้าวที่ 2



ตารางที่ 16 การจัดอันดับการกระจายของปริมาณฟอสฟอรัสในเมล็ดถั่วเขียวจากต้นข้าวที่ 2

Class no.	Class range (mg P g ⁻¹)	Class mean (mg P g ⁻¹)	Frequency
1	0.25-0.31	0.28	38
2	0.32-0.38	0.35	85
3	0.39-0.45	0.42	25
4	0.46-0.52	0.49	9
5	0.53-0.59	0.56	2
6	0.60-0.66	0.63	1
7	0.67-0.73	0.7	1
sum			161

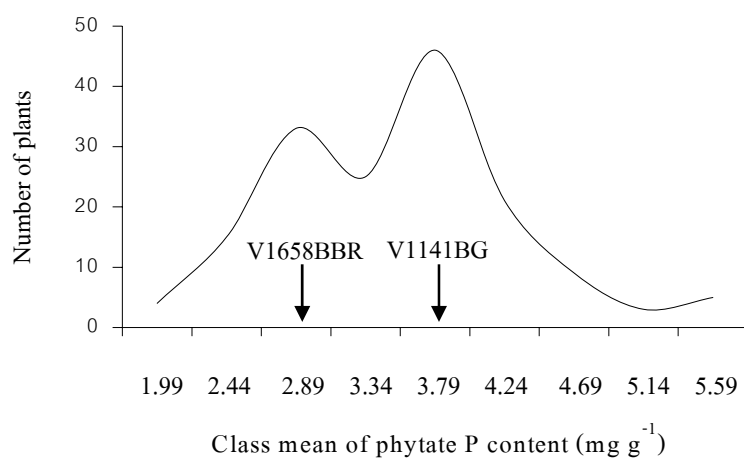
ภาพที่ 14 การกระจายตัวของปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ดถั่วเขียวจากต้นข้าวที่ 2



ตารางที่ 17 การจัดอันดับค่าของปริมาณฟอสฟอรัสในเมล็ดถั่วเขียวจากต้นข้าวที่ 2

Class no.	Class range (mg P g ⁻¹)	Class mean (mg P g ⁻¹)	Frequency
1	1.77-2.21	1.99	4
2	2.22-2.66	2.44	16
3	2.67-3.11	2.89	32
4	3.12-3.56	3.34	26
5	3.57-4.01	3.79	46
6	4.02-4.46	4.24	21
7	4.47-4.91	4.69	8
8	4.92-5.36	5.14	3
9	5.37-5.81	5.59	5
sum			161

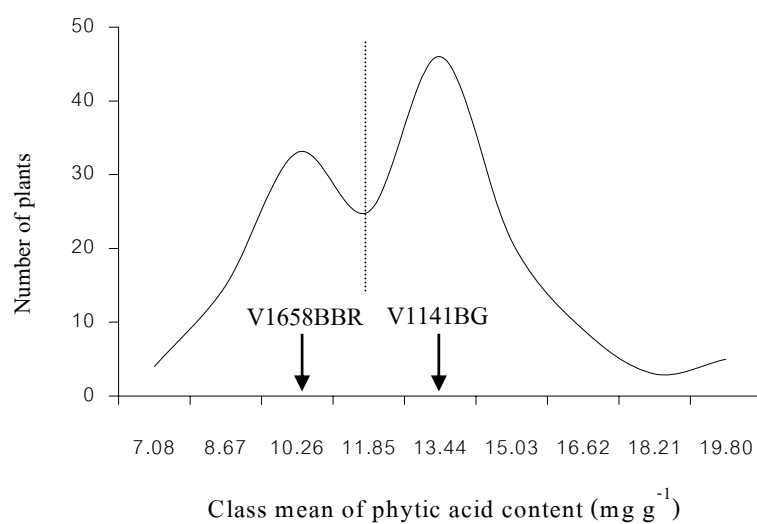
ภาพที่ 15 การกระจายตัวของปริมาณไฟเตทฟอสฟอรัสในเมล็ดถั่วเขียวจากต้นข้าวที่ 2



ตารางที่ 18 การจัดอันดับการกระจายของปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียวจากต้นข้าวที่ 2

Class no.	Class range (mg g ⁻¹)	Class mean (mg g ⁻¹)	Frequency
1	6.29-7.87	7.08	4
2	7.88-9.46	8.67	16
3	9.47-11.05	10.26	32
4	11.06-12.64	11.85	26
5	12.65-14.23	13.44	46
6	14.24-15.82	15.03	21
7	15.83-17.41	16.62	8
8	17.42-19.00	18.21	3
9	19.01-20.59	19.8	5
sum			161

ภาพที่ 16 การกระจายตัวของปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียวจากต้นข้าวที่ 2



ตารางที่ 19 ค่า Chi-square (χ^2) ในการทดสอบอัตราส่วน 9:7 ของปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดจากต้นข้าวที่ 2

Trait ¹	O _i	E _i	χ^2
High PA	106	90.6	5.99 ^{ns}
Low PA	55	70.4	
Total	161	161	

¹PA = phytic acid content, O_i = observed value, E_i = expected value

^{ns}Non - significant at 0.01 probability level

ตารางที่ 20 อัตราพันธุกรรมของลักษณะปริมาณฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ ในเมล็ด

Trait ¹	Generation variance ²				V _P	V _E	V _G	h ²
	P ₁	P ₂	F ₁	F ₂				
TP	0.070	0.147	0.059	0.541	0.541	0.104	0.437	80.8
IP	0.001	0.001	0.001	0.004	0.004	0.001	0.003	78.6
InsP	0.060	0.180	0.062	0.592	0.592	0.114	0.478	80.7
PA	0.760	2.269	0.784	7.474	7.474	1.442	6.032	80.7
%IP/TP	1.107	1.803	3.849	5.311	5.311	1.694	3.617	68.1
%InsP/TP	2.199	11.096	23.396	24.489	24.489	8.323	16.166	66.0

¹TP = total P content, IP = inorganic P content, InsP = phytate P content, PA = phytic acid content

²P₁ = V1658BBR, P₂ = V1141BG

สรุป

1. ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ดเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว มีมากพอที่จะใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้มีปริมาณสูงหรือต่ำตามที่ต้องการได้
2. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดมีสหสัมพันธ์ในทางบวกกับปริมาณกรดไฟติกในเมล็ด ($r = 0.98$) จึงสามารถนำลักษณะปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด มาใช้คัดเลือกแทนปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดซึ่งมีการวิเคราะห์ที่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูงกว่า
3. ลักษณะปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ไฟเตทฟอสฟอรัสและกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียวมีอัตราพันธุกรรมสูง สภาพแวดล้อมมีอิทธิพลน้อย สามารถปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มหรือลดลักษณะดังกล่าวได้ง่ายโดยใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์ที่ใช้กับพืชผสมตัวเอง โดยคาดว่าจะมีความก้าวหน้าและการตอบสนองต่อการคัดเลือก (response to selection) สูง
4. ลักษณะปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียวถูกควบคุมด้วยยีนหลัก 2 คู่ มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนเป็นแบบ duplicated recessive epistasis และมียีนรองซึ่งมีปฏิสัมพันธ์เหมือนกลุ่มยีนควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci) อีกด้วย
5. ลักษณะปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ไฟเตทฟอสฟอรัส และกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียวมีการแสดงอิทธิพลของละอองเกสรเพศผู้ (xenia effect) บนต้นแม่

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กานดา พุนลาภทวี. 2530. สถิติเพื่อการวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ฟิสิกส์เซ็นเตอร์. กรุงเทพฯ.
- จันทนา บุรณโอสถ. 2542. ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิวิดโครมาโทกราฟี. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- จำเริญ อ่อนทอง. 2545. คู่มือการวิเคราะห์ดินและพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ อัดตะนันท์, จงรักษ์ จันท์เจริญสุข และสุรเดช จินตกานนท์. 2532. แบบฝึกหัดและคู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ประเสริฐ นัตถวชิระวงษ์, กิตติมา รักโสภา และอนุชา วงศ์ปราณีกุล. 2546. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการหลักสูตรการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ (สาขาเกษตร) เรื่อง การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS. 58.
- พิสมัย หาญมงคลพิพัฒน์. 2547. สถิติและการวางแผนการทดลองทางการเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และเจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ . 2529. การปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจของประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กลุ่มหนังสือเกษตร, กรุงเทพฯ.
- เพิ่มพูน ศักดิ์เกษม. 2531. ถั่วเขียว. ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพเกษตร, กรุงเทพฯ.
- วัชร ชาติกิตติคุณวงศ์. 2544. โครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

สมชัย จันทส์สว้าง และ พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2546. พันธุศาสตร์ประชากร. พิมพ์ครั้งที่ 1.
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรุณธรรม อรรถธรรม. 2543. การเปรียบเทียบปริมาณกรดไฟติก โปรตีน เหล็ก และแคลเซียมใน
เมล็ด และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองพันธุ์ KUSL 20004 และจักรพันธุ์ 1. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ahn, H.J., J.H. Kim, C. Jo, M.J. Kim and M.W. Byun. 2004. **Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity.** Food Chem. 88: 173-178.

Anon. 2004a. Phosphorous. http://www.ikisan.com/links/ap_chilliMajorandMicroNutrients.html. April 17, 2004.

_____. 2004b. Wet ashing. <http://agisci.ubc.ca/fnn/courses/food302/ash/pashl02.htm>.
November 1, 2003.

_____. 2004c. Determination of phosphorous. <http://www.Fao.org/docrep/field.html>.
November 18, 2004.

_____. 2004d. Evaporative light scattering detector. <http://www.sainc.com/products/HPLC/optical/esa.html>. July 20, 2004

Bohn, T., L. Davidson, T. Walczyk and R.F. Hurrell. 2004. **Phytic acid added to white-wheat bread inhibits fractional apparent magnesium absorption in humans.** Am. J. Clin. Nutr. 79: 418-423.

Bryant, R.J., J.A. Dorsch, K.L. Peterson, J.N. Rutger and V. Raboy. 2005. **Phosphorus and mineral concentrations in whole grain and milled low phytic acid (*lpa*) 1-1 rice.** Cereal Chem. 82(5): 517-522.

- Camire, A.L. and F.M. Clydesdale. 1982. **Analysis of phytic acid in foods by HPLC**. J. Food Sci. 47: 575-578.
- Carneiro, J.M.T., E.A.G. Zagatto, J.L.M. Santos and J.L.F.C.Lima. 2002. **Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system**. Anal. Chimica. Acta. 474: 161-166.
- Chen, P.S., T.Y. Toribara and H. Warner. 1956. **Microdetermination of phosphorus**. Anal Chem. 28: 1756-1758.
- Chen, Q.C. and B.W. Li. 2003. **Seperation of phytic acid and other related inositol phosphates by high performance ion chromatography and its application**. J. Chro. A. 1018: 41-52.
- Chitra, U., V. Vimala, U. Singh and P. Geervani. 1995. **Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes**. Plant Foods Hum. Nutr. 47(2): 163-172.
- Coelho, C.M.M., J.C.P. Santos, S.M. Tsai and V.A. Vitorello. 2002. **Seed phytate content and phosphorous uptake and distribution in dry bean genotypes**. Braz. J. Plant Physiol. 14 (1): 677-682.
- David, C.S., Y.K. Huang and Y.L. Chen. 1995. **Germplasm catalog of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and other *Vigna* species**. Asian vegetable research and development center.
- Dorsch, J.A., A. Cook, K.A. Young, J.M. Anderson, A.T. Bauman, C.J. Volkmann, P.P.N. Murthy and V. Raboy. 2003. **Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley *low phytic acid* genotypes**. Phytochem. 62: 691-706.

- Dost, K. and O. Tokul. 2006. **Determination of phytic acid in wheat and wheat product by reverse phase high performance liquid chromatography.** Anal. Chimica Acta. 558: 22-27.
- Ellis, R. and E.R. Moris. 1983. **Improved ion-exchange phytate method.** Cereal Chem. 60(2): 121-124.
- Ertl, D.S., K.A. Young, and V. Raboy. 1998. **Plant genetic approaches to phosphorus management in agricultural production.** J. Environ. Qual. 27: 299-304.
- Fables, C.I., A. Arias, A. Hardisson, C.R. Alvarez and A. Sierra. 2000. **Phytic acid level in edible grain derivatives in canary island.** Eur. Food Res. Technol. 210: 346-348.
- Fiske, C.H. and Y. Subbarow. 1925. **The colorimetric determination of phosphorus.** J. Biol. Chem. 66: 375-379.
- Graf, E. and F.R. Dintzis. 1982. **Determination of phytic acid in food by high-performance liquid chromatography.** J. Agric. Food. 30: 1094-1097.
- Grases, F., J. Perello, B. Isern and R.M. Prieto. 2004. **Determination of *myo*-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.** Anal. Chimica. Acta. 510: 41-43.
- Guttieri, M., D. Borven, J.A. Dorch, V. Raboy and E. Souza. 2004. **Identification and characterization of a low phytic acid wheat.** Crop Sci. 44: 418-424.
- Harland, B.F. and D. Oberleas. 1977. **A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure : application to textured vegetable proteins.** Cereal Chen. 54 (4): 827-832.

-
- _____. 1986. **Anion-exchange method for determination of phytate in food.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69 (4): 667-670.
- Hatzack, F., F. Hubee, W. Zhang, P.E. Hanzen and S.K. Rasmussen. 2001. **Inositol phosphates from barley low-phytate grain mutants analyzed by metal-dye detection HPLC and NMR.** Biochem. J. 354: 473-480.
- Haug, W. and H.I. Lantzsch. 1983. **Sensitive method for rapid determination of phytate in cereals and cereal products.** J. Sci. Food Agric. 34: 1423-1426.
- Hegeman, C.E. and E.A. Grabau. 2001. **A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatase is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings.** Plant Physiol. 126: 1598-1608.
- Huhurez , G., E. Brailoiu, S. Slatineanu, C.M. Filipeanu, M. Costuleanu and D.D. Branisteanu. 1995. **TLC characterization of liposomes containing D - myo - inositol derivatives.** Biomed. Chromatogr. 9(4): 175-178.
- Israel, D.W., P. Kwanyuen and J.W. Burton. 2006. **Genetic variability for phytic acid phosphorus and inorganic phosphorus in seeds of soybean in maturity group V, VI and VII.** Crop Sci. 46: 67-71.
- Jackson, J.F., R.K. Kamboj and H.F. Linskens. 1983. **Localization of phytic acid in the floral structure of *Petunia hybrida* and relation to the incompatibility genes.** Theor. Appl. Genet. 34(3): 259-262.
- Karner, U., T. Peterbauer, V. Raboy, D.A. Jones, C.L. Hedley and A. Richter. 2004. **myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds.** J. Exp. Bot. 55(405): 1981-1987.

- Kerovuo, J., J. Rouvinen and F. Hatzack. 2000. **Analysis of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism.** Biochem J. 352: 623-628.
- Kleyn, R. 2006. Phytase and layer diets. <http://www.spesfeed.co.za/winter99.htm>. September 17, 2006.
- Latta, M. and M. Eskin. 1980. **A simple and rapid colorimetric method for phytate determination.** J. Agric. Food Chem. 28: 1313-1315.
- Larson, S.R., J.N. Rutger, K.A. Young and V. Raboy. 2000. **Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) *low phytic acid 1* mutation.** Crop Sci. 40: 1397-1405.
- Leclerg, E.L., W.H. Leonard and A.G. Clark. 1966. **Field plot technique.** 2nd ed. Burgess publishing company. USA.
- Leucena, C.F. and L. Prat. 1957. **A new reagent for the colorimetric and spectrophotometric determination of phosphorus.** Anal. Chem. Acta. 16: 473-475.
- Li, J., C.E. Hegeman, R.W. Hanlon, G.H. Lacy, D.M. Denbow and E.A. Grabau. 1997. **Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures.** Plant Physiol. 114: 1103-1111.
- Lin, L., I. Okenden and J.N.A. Lott. 2005. **The concentration and distribution of phytic acid-phosphorus and other mineral nutrients in wild-type and *low phytic acid 1-1 (lpa1-1)* corn (*Zea mays* L.) grains and grain parts.** Can. J. Bot. 83: 131-141.
- Liu, Z.H., F.M. Cheng, W.D. Cheng and G.P. Zhang. 2005. **Positional variation in phytic acid and protein content within a panicle of japonica rice.** J. Cereal Sci. 41: 297-303.

- Loewus, F.A. and P.P.N. Murphy. 2000. **myo - Inositol metabolism in plants**. Plant Sci. 150: 1-19.
- Lott, J.N.A., I. Ockenden, V. Raboy and G.D. Batten. 2000. **A global estimate of phytic acid and phosphorus in crop grains**. Seed Sci. Res. 10: 11-33.
- Luo, Q. and J.D. Andrade. 2000. **Phytic acid as an efficient low-molecular-mass displacer for anion-exchange displacement chromatography of proteins**. J. Chro. B. 741: 23-29.
- Mak, W.C., Y.M. Ng, C. Chan, W.K. Kwong. and R. Renneberg. 2004. **Novel biosensors for quantitative phytic acid and phytase measurement**. Biosens. Bioelectron. 19: 1029-1035.
- Makower, R.U. 1970. **Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus vulgaris*)**. Cereal Chem. 47: 288-295.
- March, J.G., B.M. Simonet and F. Grases. 2001. **Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectroscopy: application to biological samples**. J. Chro. B. 757: 247-255.
- Mayr, G.W. 1988. **A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens**. Biochem. J. 254: 585-591.
- Mohamed, A.I., P.A.J. Perera and Y.S Hafez. 1986. **New chromophore for phytic acid determination**. Cereal Chem. 63(6): 475-478.
- Oberleas, D. and B.F. Harland. 1981. **Phytate content of foods: effect on dietary zinc bioavailability**. J. Am. Diet. Assoc. 79: 433-436.

- _____ and A.S. Prasad. 1969. **Growth as affected by zinc and protein nutrition.** Am. J. Cli. Nutr. 22(10): 1304-1314.
- Ockenden, I., J.A. Dorsch, M.M. Reid, L. Lin, L.K. Grant, V. Raboy and J.N.A. Lott. 2004. **Characterization of the storage of phosphorus, inositol phosphate and cation in grain tissue of four barley (*Hordeum vulgare* L.) low phytic acid genotypes.** Plant Sci. 167: 1131-1142.
- Oltmans, S.E., W.R. Fehr, G.A. Weike and S.R. Cienzio. 2004. **Inheritance of low phytate phosphorus in soybean.** Crop Sci. 44(2): 433-435.
- _____, V. Raboy, and K.L. Peterson. 2005. **Agronomic and seed traits of soybean lines with low-phytate phosphorus.** Crop Sci. 45: 593-598.
- Ozaki, S. and Y. Watanabe. 1990. Synthesis of inositol polyphosphates and their derivatives, pp. 43-65. In A.B. Reitz, eds. **ACS symposium series 'inositol phosphates and derivatives: synthesis, biochemistry and therapeutic potential'**. American Chemical Society, Washington, DC.
- Park, H. R., H.J. Ahn, S.H. Kim, C.H. Lee, M.W. Byun, and G.W. Lee. 2006. **Determination of phytic acid levels in infant foods using different analytical methods.** Food Con. 17(9): 727-732.
- Parthasarathy, R. and F. Einsenberg. 1990. Biochemistry, stereochemistry and nomenclature of inositol phosphate, pp. 1-19. In A.B. Reitz, eds. **ACS symposium series 'inositol phosphates and derivatives: synthesis, biochemistry and therapeutic potential'**. American Chemical Society, Washington, DC.
- Pederson, H.B., L.D. Sorensen and P.B. Holm. 2002. **Engineering crop plants: Getting a handle on phosphate.** Trend in Plant Science. 7(3): 118-125.

- Pilu, R., M. Landoni, E. Cassani, E. Doria and E. Nielsen. 2005. **The maize *lpa241* mutation causes a remarkable variability of expression and some pleiotropic effects.** Crop Sci. 45: 2096-2105.
- _____, D. Panzeri, G. Gavazzi, S.K. Rasmussen, G. Consonni and E. Nielsen. 2003. **Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (*lpa241*).** Thero. Appl. Genet. 107: 980-987.
- Pittet, D., W. Schlegel, D.P. Lew, A. Monod and G.W. Mayr. 1989. **Mass changes in inositol tetrakis- and pentakisphosphate isomers induced by chemotactic peptide stimulate in HL-60 cells.** Am. Biol. Chem. 264(31): 18489-18493.
- Plaami, S. and J. Kumpulainen. 1991. **Determination of phytic acid in cereal using ICP-AES to determine phosphorus.** J. Assoc. Off Anal. Chem. 74(1): 32-36.
- Pons, W.A.Jr. and J.D. Guthrie. 1946. **Determination of inorganic phosphorus in plant materials.** J. Ind. Eng. Chem. 18(1): 184-186.
- Raboy, V. 1998. **Low-phytic-acid corn gets first license.** Agri. Res. 46: 23.
- _____. 2001. **Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution.** Trends in Plant Sci. 6(10): 458-462.
- _____. 2002. **Progress in breeding low phytate crops.** J. Nutr. 132(3): 503-505.
- _____. 2003. **Molecules of interest : *myo* - inositol - 1, 2, 3, 4, 5, 6 - hexakisphosphate.** Phytochem. 64: 1033-1043.

- _____ and D.B. Dickinson. 1993. **Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status.** Crop Sci. 33: 1300-1305.
- _____, P.F. Gerbasi, K.A. Young, S.D. Stoneberg, S.G. Pickett, A.T. Bauman, P.P.N. Murphy, W.F. Sheridan and D.S. Ertl. 2000. **Origin and seed phenotype of maize *low phytic acid 1-1* and *low phytic acid 2-1*.** Plant Physiol. 124: 355-368.
- _____, K.A. Young, J.A. Dorsch and A. Cook. 2001. **Genetic and breeding of seed phosphorus and phytic acid.** J. Plant Physiol. 158: 489-497.
- Reddy, N.R., C.V. Balakrishnan and D.K. Salunkhe. 1978. **Phytate phosphorus and mineral changes during germination and cooking of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds.** J. Food. Sci. 43: 540-543.
- Sandberg, A.S. and R. Ahderinne. 1986. **HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates in foods and intestinal contents.** J. Food. Sci. 51(3): 547-550.
- Schachtman, D.P., R.I. Reid and S.M. Ayling. 1998. **Phosphorus uptake by plants: from soil to cell.** Plant Physiol. 116: 447-453.
- Shamsuddin, A.M. 1999. **Metabolism and cellular function of IP₆.** Anticancer Res. 19(5): 3733-3736.
- Shayman, J.A. and M. BeMent. 1998. **The separation of *myo* - inositol phosphates by ion - pair chromatography.** Biochem. Res. Com. 151(1): 114-122.
- Stock, R. and C.B.F. Rice. 1974. **Chromatographic method.** 3rd ed. Chapman and Hall, London.

- Sugiura, S.H., V. Raboy, K.A. Young, F.M. Dong and R.W. Hardy. 1999. **Availability of phosphorus and trace elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. Aquaculture 170: 285-296.
- Talamond, P., S. Doubeau, I. Rochette, J.P. Guyot and S. Treche. 2000. **Anion-exchange high performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food**. J. Chromatogr. A. 871: 7-12.
- Thomson, D.B. and J.W. Erdman. 1982. **Phytic acid determination in soybeans**. J. Food Sci. 47: 513-517.
- Vasilios, M.E.A., S.B. Smith and J.D. Ross. 2005. **Phytic acid mobilization is an early response to chilling of the embryonic axes from dormant oilseed of hazel (*Corylus avellana*)**. J. Exp. Bot. 56(412): 537-545.
- Veum, T.L., D.R. Ledoux, D.W. Bollinger, V. Raboy and A. Cook. 2002. **Low-phytic acid barley improves calcium and phosphorus utilization and growth performance in growing pigs**. J. Anim. Sci. 80:2663-2670.
- Walker, D.R., A.M. Scaboo, V.R. Pantalone, J.R. Wilcox and H.R. Boerma. 2006. **Genetic mapping of loci associated with seed phytic acid content in CX1834-1-2 soybean**. Crop Sci. 46: 390-397.
- Wilcox, J.R., S.P. Gnanasiri, K.A. Young, and V. Raboy. 2000. **Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants**. Crop Sci. 40: 1601-1605.
- Xizhang, S. Metabolism of inositol phosphates in *Chlamydomonas reinhardtii*. <http://proquest.umi.com/pqdwebdid=765930011>. Mar 14, 2006.

Xu, Y., X.H. Liu, and G.D. Prestwich. 2005. **Synthesis of phosphatase-resistant analogues of phytic acid (InsP₆)**. Tetrahedron Lett. 46: 8311-8314.

ภาคผนวก

การหาเปอร์เซ็นต์ Recovery

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ Recovery เป็นการตรวจสอบความแม่นยำและประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ โดยทั่วไปแล้ววิธีการที่ดีควรมีค่าดังกล่าวเท่ากับ 100 % แต่ถ้าในตัวอย่างที่มีปริมาณสารต่ำ ๆ และใช้วิธีการวิเคราะห์หลายขั้นตอน ได้แก่ การสกัดตัวอย่าง การถ่ายสารละลาย การกรอง การปั่นเหวี่ยง การระเหยตัวทำละลาย และการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี จะทำให้มีค่าดังกล่าวลดลงได้ ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณสารเท่ากับหรือมากกว่า 100 ไมโครกรัม/กก. กองควบคุมตรวจสอบผลิตภัณฑ์ อนุญาตให้มีค่าเป็น 80-100% (อรุณธรรม, 2543)

ในงานวิจัยครั้งนี้มีการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ ในเมล็ดถั่วเขียว ได้แก่ ฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด ฟอสฟอรัสอินทรีย์ และกรดไฟติก ซึ่งมีปริมาณสารอยู่ในช่วง 0.30-20.00 มก./ก. ซึ่งมากกว่า 100 ไมโครกรัม/กก. ดังนั้น หากวิธีวิเคราะห์ใดมีค่า Recovery อยู่ในช่วง 80-100 % ถือว่ายอมรับได้ แต่ถ้าน้อยกว่าช่วงดังกล่าวจะต้องใช้เปอร์เซ็นต์ดังกล่าวมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสนั้น ๆ

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ Recovery ในงานวิจัยครั้งนี้จะทำไปพร้อมกับตัวอย่างที่วิเคราะห์ทุกครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยดังตารางผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ 1 เปอร์เซ็นต์ Recovery ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสชนิดต่าง ๆ

Content ¹	Recovery (%)
TP	83.1
IP	100.9
PA	46.6

¹ TP = total P content, IP = inorganic P content, PA = phytic acid content

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ : นางสาวอุทุมพร สมพงษ์

เกิด : 21 ธันวาคม พ.ศ. 2523

สถานที่เกิด : เขตบางบอน กรุงเทพฯ

ประวัติการศึกษา : วท.บ. (ชีวเคมี) เกียรตินิยมอันดับ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ทุนการศึกษา

ระดับปริญญาตรี : ทุนอุดหนุนการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ปี พ.ศ. 2542
ทุนมูลนิธิจุฬาภรณ์-พันธุ์ทิพย์ ปี พ.ศ. 2543-2544

ระดับปริญญาโท : ทุนผู้ช่วยวิจัย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ปี พ.ศ. 2547-2548
ทุนผู้ช่วยวิจัย โครงการพันธุศาสตร์และปรับปรุงพันธุ์พืชไร่นา
สำหรับ ประเทศไทย (โครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว.) ปี พ.ศ. 2546
และ 2548-2549