หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

3.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 ถั่วแปบช้าง (Afgekia sericea Craib)

3.1.2 กันภัย (Afgekia mahidolae Burtt & Chermsirivathana)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

ก. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างพืชจากถิ่นอาศัยธรรมชาติเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

1. ถุงพลาสติกขนาดใหญ่
2. กรรไกรตัดกิ่งไม้
3. กรรไกรชัก

ข. อุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษาสัณฐานวิทยาของเรณู

1. ตัวอย่างเรณู
2. potassium hydroxide (KOH) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
3. น้ำกลั่น
4. glacial acetic acid
5. concentrated sulfuric acid
6. acetic acid anhydride
7. ethyl alcohol 70, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์
8. เครื่องเหวี่ยง (centrifuge)
9. หลอดทดลองชนิดก้นแหลม
10. ผ้ากรองหรือตะแกรงลวดทองแดงที่มีขนาด 100 ไมครอน หรือประมาณ 48 ตาต่อตารางมิลลิเมตร หรือถ้วยกรองที่มีรูขนาด 100 ไมครอน (Gooch Crucible)
11. บีกเกอร์

12. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแคน (SEM) ชนิด JSM-35 cf. และ JSM-200 cx.

13. กล้องถ่ายรูป Vanox-T

14. ฟิล์ม Kodak Panatomic-X Ektachrome-100

15. ฟิล์มขาวดำสำหรับถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแคน (SEM)

3.3 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์

3.3.1 ตัวอย่างช่อดอกตูมถั่วแปบช้าง เก็บจากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา และกันภัย เก็บจากอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี

3.3.2 ตัวอย่างรากของพืชทั้งสองชนิดได้จากการเพาะเมล็ดที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งเดียวกันกับข้อ 3.3.1

3.3.3 น้ำยา fixative ใช้ Carnoy s solution (glacial acetic acid : Chloroform : absolute ethyl alcohol 1 : 3 : 6)

3.3.4 ferric chloride เข้มข้น

3.3.5 ethyl alcohol 70, 90 เปอร์เซ็นต์

3.3.6 Propionocarmine เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

3.3.7 ขวดเก็บตัวอย่าง

3.3.8 สารละลายอิ่มตัวของ alphabromonaphthalene

3.3.9 acetic acid 90 เปอร์เซ็นต์

3.3.10 normal hydrochloric acid

3.3.11 Schiff's reagent

3.3.12 ปากคีบ

3.3.13 เข็มเขี่ย

3.3.14 สไลด์ และแผ่นแก้วปิด

3.3.15 ตะเกียงอัลกอฮอล์

3.3.16 แท่งเคาะโครโมโซม

3.3.17 กระดาษซับ

3.3.18 กล้องจุลทรรศน์

3.3.19 กล้องถ่ายรูป Vanox - T

3.3.20 ฟิล์ม Kodak Panatomic-X Ektachrome-100 และ Kodak gold 100

3.3.21 อ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase isozyme) และเอสเทอเรส (Esterase isozyme)

3.4.1 ตัวอย่างใบประกอบตำแหน่งที่ 5 นับจากปลายยอดของต้นถั่วแปบช้างและกันภัย

3.4.2 เครื่องอิเลคโตรโฟรีซิสชนิดแผ่นแบบตั้ง

3.4.3 ตู้เย็น และตู้แช่เย็น

3.4.4 เครื่อง refrigerated centrifuge

3.4.5 เครื่อง homoginize

3.4.6 dialyse tube

3.4.7 magnetic stirrer

3.4.8 เครื่องชั่งชนิดละเอียด

3.4.9 โกร่งบดตัวอย่างพืช

3.4.10 Degasser

3.4.11 vial ขนาด 5-50 ไมโครลิตร

3.4.13 กล่องพลาสติกขนาดต่าง ๆ

3.4.14 ขวดใส่สารเคมีขนาด 100 มล. 500 มล. และ 1000 มล.

3.4.15 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น beaker, pipette และ cylinder เป็นต้น

3.4.16 pasteur pipette

3.4.17 จุกยางขนาดเล็ก

3.5 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู

3.5.1 proionocarmine 2 เปอร์เซ็นต์

3.5.2 สไลด์, สไลด์หลุม, แผ่นแก้วปิด

3.5.3 3(4, 5 dimethylthiazolyl-2) 2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)

3.5.4 น้ำตาลซูโครส

3.5.5 tween 20 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.5.6 bactoagar

3.5.7 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.5.8 boric acid

3.6 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางนิเวศสรีรวิทยา

ก. อุปกรณ์ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม

1. ตัวอย่างเมล็ดถั่วแปบช้าง และกันภัย

2. ดิน เก็บตัวอย่างมาจาก 2 แห่ง คือ สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช จังหวัดนครราชสีมา และอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี

3. ถุงเก็บตัวอย่างดินที่จะใช้ปลูกพืช

4. ถุงพลาสติกเก็บตัวอย่างดิน (Sampling bag)

5. ป้ายปักชื่อต้นไม้

6. พลั่ว จอบ เสียม

7. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 1 ตำแหน่ง และชนิดละเอียด

8. ตู้อบ

9. ขวดแก้วใส่ตัวอย่างใบ

10. ไม้บรรทัด

11. บัวรดน้ำ

12. ทราย

13. กระถางพลาสติก

14. ตะกร้าพลาสติก

15. ห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ช่วงแสง 12 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์

ข. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

1. หลอดทดลองชนิดก้นแหลม
2. acetone เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์
3. เครื่องเหวี่ยง
4. หลอดทดลองที่ใช้กับเครื่อง spectrophotometer
5. spectrophotometer

ค. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ศึกษาการวัดปริมาณ soluble protein

1. หลอดทดลองชนิดก้นแหลม
2. กระติกน้ำแข็ง
3. เครื่องเหวี่ยง
4. ไมโครปิเปต
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส
6. Bovine Serum Albulmin
7. สารเคมีต่าง ๆ ได้แก่

- M Tris (Hydroxymethyl) methylomine
- 1 M Magnesium sulphate - 0.0125 M EDTA (EThylene Diamine Tetra-Acetic acid)
- Trichloroacetic acid 5, 10 เปอร์เซ็นต์
- N Sodium hydroxide
- Copper sulphate reagent (copper sulphate 1 เปอร์เซ็นต์, sodium potassium tartrate 2 เปอร์เซ็นต์ , sodium carbonate 2 เปอร์เซ็นต์)
- Folin cioculteuis phenol reagents

8. spectrophotometer

วิธีดำเนินการศึกษา

การศึกษานิเวศพันธุศาสตร์ของพืชสกุลถั่วแปบช้างในประเทศไทยนั้นจะศึกษาสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้คือ

1. ลักษณะสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ของใบ ดอก ผล และเมล็ด รวม 20 ลักษณะ และสัณฐานวิทยาของเรณู

2. ลักษณะทางพันธุศาสตร์ ศึกษาจำนวนโครโมโซมการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกัน ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์จากเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เปอร์ออกซิเดส และเอสเทอเรส และศึกษาความมีชีวิตและการงอกหลอดละอองเรณู

3. ลักษณะทางนิเวศสรีรวิทยา (Eco-Physiology) ศึกษาการเจริญเติบโตในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม ปริมาณคลอโรฟิลล์ และ Soluble โปรตีน

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดจะนำไปใช้ในการอภิปรายผลถึงความสัมพันธ์ทางด้านวิวัฒนาการของพืชสกุลนี้ การศึกษาแต่ละวิธีมีขั้นตอนและรายละเอียดต่าง ๆ ดังนี้

1. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ ผล เมล็ด และสัณฐานวิทยาของเรณู

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาต่าง ๆ เหล่านี้จะเก็บตัวอย่างของถั่วแปบช้าง และกันภัยจากถิ่นอาศัยธรรมชาติซึ่งมีวิธีการเก็บตัวอย่างและวิธีการศึกษา ดังนี้

1.1 การเก็บตัวอย่างใบ และลักษณะสัณฐานวิทยาที่ศึกษา

ตัวอย่างใบจะเก็บในระหว่างเดือนมิถุนายน - พฤศจิกายน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่พืชทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตภายหลังจากที่ได้รับน้ำฝน ในช่วงเวลาดังกล่าว เก็บตัวอย่างใบทุก ๆ จุดที่พืชขึ้นอยู่ โดยเก็บใบประกอบใบที่ 5 นับจากยอดลงมาจำนวน 100 ตัวอย่าง นำมาวัดความกว้าง ความยาวของใบย่อยใบสุดท้าย (terminal pinna) มีหน่วยวัดเป็นเซนติเมตร และนับจำนวนคู่ของใบย่อยในใบประกอบแต่ละใบ

1.2 การเก็บตัวอย่างดอก และลักษณะสัณฐานวิทยาที่ศึกษา

การเก็บตัวอย่างดอก จะเก็บตัวอย่างพร้อม ๆ กันกับการเก็บตัวอย่างใบ ใช้หลักการเดียวกันคือ เก็บตัวอย่างให้ครอบคลุมทุก ๆ จุด ใช้กรรไกรตัดกิ่งไม้ตัดทั้งช่องดอกใส่ถุงพลาสติก นำมาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ วัดความกว้างความยาวของ standard wing ความยาว pistil จำนวน wing appendage การมีขนไม่มีขนที่บริเวณปลายของ style

ความยาวก้านช่อดอกและสีของ wing เปรียบเทียบกับสีมาตรฐานของ Kornerup และ Wanscher (1978) และบันทึกข้อมูลตามแบบของ DeHond และ Campbell (1989)

1.3 การเก็บตัวอย่างฝัก เมล็ด และลักษณะสัณฐานวิทยาที่ศึกษา

การเก็บตัวอย่างฝักถั่วแปบช้าง จะเก็บในระหว่างเดือน กุมภาพันธ์-มีนาคม กันภัยจะเก็บตัวอย่างในระหว่างเดือน กุมภาพันธ์-ธันวาคม ฝักจะติดอยู่กับก้านช่อดอก สำรวจและเก็บตัวอย่างทุก ๆ จุด บันทึกจำนวนฝักที่พบบนก้านช่อดอก และตัดก้านช่อดอกที่บันทึกจำนวนฝักแล้วใส่ถุงพลาสติก การเก็บตัวอย่างฝักจะเลือกเก็บเฉพาะฝักที่แก่เต็มที่โดยสังเกตจากสีฝักที่มีสีน้ำตาลก้านช่อดอกจะแห้งมีสีน้ำตาล ซึ่งฝักที่ยังไม่แก่เต็มที่จะมีสีเขียว ใช้กรรไกรตัดกิ่งไม้ตัดฝักจากก้านช่อดอกนำฝักมารวมกัน สุ่มเลือกฝัก จำนวน 100 ฝัก เพื่อนำมาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ วัดความกว้าง ความยาวของฝัก หลังจากนั้นกะเทาะเมล็ดออกจากฝัก บันทึกจำนวนเมล็ดในแต่ละฝัก นำเมล็ดมารวมกันสุ่มเลือกมา 100 เมล็ด เพื่อวัดความกว้าง ความยาวของเมล็ด ชั่งน้ำหนักของเมล็ดแต่ละเมล็ด และเปรียบเทียบสีเมล็ดกับสีมาตรฐานของ Kornerup และ Wanscher (1978) และบันทึกข้อมูลตามแบบของ DeHond และ Campbell (1989)

ข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยาที่ศึกษาทั้งหมด รวม 20 ลักษณะ ข้อมูลที่ได้นี้จะนำไปวิเคราะห์ตามวิธีการการวิเคราะห์ตัวแปรพหุคูณ (Multivariated Analysis) โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบการจัดจำแนกประเภท(Discriminant Analysis) แบบมีขั้นตอน(stepwise) ของ Wilks' โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC^{+} (Statistical Package for the Social Sciences Personal Computer plus) วิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาที่สามารถใช้ในการจำแนกพืชสกุลถั่วแปบช้างลักษณะสัณฐานวิทยาแต่ละลักษณะ หมายถึงตัวแปร 1 ตัวแปร และได้กำหนดตัวแปรทั้งหมด 20 ตัวแปร ดังนี้ (ภาพที่ 3)

LTP = length of terminal pinna

BTP = breadth of terminal pinna

NLT = number of leaflets

NFI = number of floret/ inflorescence

LIF = length of inflorescence

LST = length of standard

LWG = length of wing

LKL = length of keel

LPT = length of pistil

CWG = colour of wing

NWA = number of wing appendage

IST = indumentum of style

NPI = number of pod / inflorescence

BPD = breadth of pod

LPD = length of pod

BS = breadth of seed

LS = length of seed

NSP = number seed / pod

WTS = weight of seed

CLS = colour of seed

สมการการจัดจำแนกประเภทที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นดังนี้

$$PC = f(X_1 \ldots X_{20})$$

โดยที่ PC คือ อำนาจในการจำแนกระหว่างถั่วแปบช้างและกันภัย

X คือค่าของลักษณะสัณฐานวิทยาแต่ละลักษณะ

1.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเรณู

1.2.1 การเตรียมเรณูเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ใช้วิธีการเตรียมเรณูแบบ acetolysis method ตามวิธีของ โกสุม พีระมาส (2528) ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Erdtman (1952) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างเรณูของพืชใส่ลงในบีกเกอร์

2. เติม KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปอุ่นบน water bath 3-5 นาที

3. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

4. ถ่ายเรณูใส่หลอด centrifuge และเติม glacial acetic acid 10 มล. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว4,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และเทของเหลวทิ้ง

5. เติม acetolysis mixture ลงไป นำหลอดไปอุ่นในน้ำเดือด 70-100 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ centrifuge อีก 1 นาที เทของเหลวทิ้ง

6. เติม acetic acid และ centrifuge นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยา 20 ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์จำแนกความแตกต่างระหว่างประชากร
(Discriminant Analysis) และที่ใช้ในการจำแนกชนิดพันธุ์ของถั่วแปบ(Afgekia Craib)

NLT LTP BTP

LST

LPT IST

NWA

LKL

LWG CWG BWG

LIF

BPD LPD NPI NSP

CLS BS

LS WS

7. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง

8. เติม ethyl alcohol 70, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ centrifuge นาน 1 นาที และเทของเหลวทิ้งทุกครั้ง ครั้งสุดท้ายล้างด้วย alcohol เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ คว่ำหลอดลงบนกระดาษซับเพื่อทำให้หลอดแห้ง จะได้ acetolysis grain นำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และถ่ายรูปด้วยกล้อง Vanox-T

1.2.2 การเตรียมเรณูเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำเรณูให้แห้งปราศจากน้ำแล้วหยดลงบน stub

2. นำ stub เข้าเครื่องเคลือบผิวเรณูด้วยทองผสมพาลาเดียม (Au-Pd coating)

3. นำไปศึกษารูปร่างลักษณะของเรณูโดยใช้กล้อง SEM ชนิด MSM - 35 cf. หรือ JSM-200 cx. และถ่ายรูป

2. <u>ศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์</u>

การศึกษาลักษณะทางพันธุศาสตร์จะศึกษาถึงจำนวนโครโมโซม แบบแผนของไอโซโซม์ 2 ระบบ และความมีชีวิตของละอองเรณูและการงอกของหลอดละอองเรณู ซึ่งแต่ละวิธีมีรายละเอียดและขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

2.1 การศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจับคู่กันของโครโมโซมที่เหมือนกันใน microsporocyte โดยวิธี propiono carmine smear (กันธารัตน์ ไชยสุด, 2532) มีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 เก็บตัวอย่างดอกถั่วแปบช้างและกันภัยจากถิ่นอาศัยในธรรมชาติ

2.1.2 แช่ใน fixative คือ Carnoy's solution นาน 24 ชั่วโมง

2.1.3 ล้างด้วย ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง

2.1.4 เก็บใน ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์

2.1.5 เตรียมสไลด์โดยนำอับเรณูวางบนสไลด์และแบ่งอับเรณูเป็น 2 ส่วน หยด propionocarmine 2 หยด

2.1.6 นำไปลนไฟพอร้อนปิดด้วย cover glass และนำไปตรวจดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสแรก นับจำนวนโครโมโซม โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x 100 และถ่ายรูปด้วยกล้อง Vanox-T ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100

2.2 การศึกษาจำนวนโครโมโซมในโซมาติกเซลล์ (Somatic cell) ของปลายรากโดยวิธี Feulgen squash ที่ดัดแปลงโดย Dartington และLa Cour (กันยารัตน์ ไชยสุด, 2532) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 เพาะเมล็ดในกระถางพลาสติก 5 เมล็ด จนกระทั่งเกิดราก ยาวประมาณ 0.5 ซม.

2.2.2 ตัดรากที่ได้ในข้อ 2.2.1 และแช่ในสารละลายอิ่มตัวของ alphabromonaphthalene ที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส นาน 28 ชั่วโมง

2.2.3 เท alphabromonaphthalene ทิ้ง ใส่ acetic acid เข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

2.2.4 ล้างรากด้วย ethyl alcohol เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง

2.2.5 ล้างรากให้หมด alcohol ด้วยน้ำธรรมดา 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ขณะล้างราก เอา N.HCl ใส่หลอดไวแอล (vial) ไปอุ่นให้ร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จนมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.2.6 นำรากที่ล้างสะอาดใส่ลงใน N.HCl ที่อุ่นจนร้อนนั้นทิ้งไว้ 10 นาที

2.2.7 เท N.HCl ทิ้ง ใส่ Schiff's reagent ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง

2.2.8 นำรากไปเตรียมสไลด์ สไลด์ละ 1 ราก โดยย้ายรากจาก Schiff's reagent ใส่ลงในน้ำกลั่น แล้วตัดเฉพาะบริเวณปลายรากที่ติดสีม่วง แดงเข้มวางบนสไลด์ หยด propionocarmine 1 หยด ตรงตำแหน่งของปลายราก

2.2.9 ปิดบริเวณที่มีปลายรากด้วยแผ่นแก้วปิด แล้วใช้ปลายดินสอเรียบ ๆ หรือแท่งเคาะโครโมโซม ค่อย ๆ เคาะชิ้นเล็ก ๆ ของเนื้อเยื่อ ให้เซลล์กระจายแยกออกจากกันแล้วเคาะแรงขึ้น เพื่อให้โครโมโซมกระจาย

2.2.10 นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100 เลือกเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส ที่มีโครโมโซมกระจายไม่ซ้อนกัน นับจำนวนโครโมโซม และถ่ายรูปด้วยกล้อง Vanox-T ใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100

2.3 การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ : เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และเอสเทอเรส (Esterase)

การศึกษาไอโซไซม์ จะใช้วิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิสแบบตั้ง (vertical-slab gel electrophoresis) ชนิด polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ตามวิธีของ

Akroyd (1967) และ Davis (1964) (อ้างถึงในสุจิตรา จางตระกูล และคณะ, 2530) วิธีของ Akroyd (1967) และ Davis (1964) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. Set กระจกสำหรับเตรียม polyacrylamide gel

2. <u>เตรียม running gel หรือ seperating gel</u>

2.1 ผสมสารละลาย A กับ B (วิธีเตรียม ในภาคผนวก) อัตราส่วน 1 : 1

2.2 เตรียมสารละลาย C (วิธีเตรียม ในภาคผนวก)

2.3 ดูดอากาศออกจากสารละลายข้อ 2.1 และสารละลายข้อ 2.2 ด้วยเครื่อง Vacuum pump นานประมาณ 3 นาที

2.4 ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบ magnetic stirrer เบา ๆ นาน 1 นาที ระวังการเกิดฟองอากาศ

2.5 ค่อย ๆ เทสารละลายที่ได้ลงในช่องว่างระหว่างกระจก ให้สารละลายอยู่ในระดับที่กำหนดไว้ ถ้าสารละลายอยู่สูงกว่าระดับที่กำหนดไว้ให้ใช้ suction ดูดสารละลายส่วนเกินออกไป

2.6 เติมน้ำกลั่นเหนือสารละลาย (over lay) ด้วยไมโครปิเปตต์ ปริมาตร 1 มล. ปล่อยทิ้งไว้นานประมาณ 1 ชั่วโมง เจล(gel) จะแข็งตัวเนื่องจากเกิดการ polymerization

2.7 เอียง slab เพื่อดูดน้ำที่อยู่เหนือเจลออกให้หมดด้วย suction

3. <u>การเตรียม spacing gel</u>

3.1 ผสมสารละลาย D : E : F ในอัตราส่วน 10 มล. ต่อ 2 slab และดูดอากาศออกด้วย suction

3.2 เติมสารละลาย spacing gel หรือ running gel เกือบเต็มจะเหลือที่จากขอบกระจกประมาณ 0.5-1.0 ซม.

3.3 นำเอา wel comb มาเสียบระหว่างกระจก โดยค่อย ๆ เอียงจากซ้ายไปขวาระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

3.4 ดูดสารละลาย spacing gel ที่ล้นออกมาด้วย suction

3.5 นำไปวางในที่ที่มีแสงจากหลอดไฟหรือจากแสงอาทิตย์ เพื่อให้เกิด polymerization

3.6 เมื่อสังเกตเห็นว่า spacing gel มีสีขาวขุ่นแสดงว่าเกิด polymerization spacing gel จะแข็งตัว หลังจากนั้นจะทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วดึง

wel comb จะเห็นมีช่องว่าง wel slot ใน spacing gel

3.7 ล้างช่องว่างที่เกิดบน spacing gel ด้วยสารละลาย electrode buffer (dil.R.B.) อย่างน้อยสองครั้งและดูดออกด้วย suction

4. การเตรียม Electrode Buffer หรือ Reservior Buffer

4.1 เตรียม dilute Reservior Buffer ปริมาตร 500 มล. (วิธีการเตรียมในภาคผนวก)

4.2 เปิดระบบควบคุมความเย็น(cooling system)เพื่อให้ electrode buffer มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ก่อนที่จะใส่สารละลายที่สกัดได้จากพืชตัวอย่างที่นำมาศึกษา) นานประมาณ 2 ชั่วโมง

5. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้สกัดเอนไซม์จากตัวอย่างพืช (Extract enzyme solution)

5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้สกัดเอนไซม์นั้น จะเตรียมจากสารละลาย extract buffer ที่เตรียมเป็น stock solution ไว้แล้ว ได้แก่สารละลาย G, H, I, J (วิธีการเตรียมในภาคผนวก)

6. การเตรียมตัวอย่างพืช

6.1 เพาะเมล็ดถั่วแปบช้างและกันภัยอย่างละ 10 เมล็ดใช้เวลาประมาณ 3 วัน และย้ายมาปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร กระถางละ 1 ต้น กระถางพลาสติกบรรจุดินธรรมดา : ปุ๋ยอินทรีย์ กทม-1 อัตราส่วน 1:1 นำไปไว้ที่ห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นานประมาณ 2 เดือน จึงเก็บตัวอย่างใบนำไปศึกษาไอโซไซม์

6.2 เก็บตัวอย่างใบของถั่วแปบช้างและกันภัย จากถิ่นอาศัยในธรรมชาติโดยเก็บใบประกอบใบที่ 5 นับจากยอดลงมาเป็นเกณฑ์ในการเก็บตัวอย่าง รวม 20 ตัวอย่าง แยกเป็นใบถั่วแปบช้าง และกันภัย อย่างละ 10 ตัวอย่าง ใช้กรรไกรตัดกิ่งไม้ ตัดใบใส่ในถุงพลาสติกเก็บไว้ในกระติกน้ำแข็งนำกลับมายังห้องทดลอง

6.3 ชั่งน้ำหนักใบประมาณ 100 มก. และเติมสาร PVP (polyvinyl pyrrolidone) ประมาณ 50 มก. เพื่อลด oxidation เติมสารละลาย extract buffer สูตร C ปริมาตร 1 มล. สำหรับสกัดไอโซไซม์ peroxidase จากใบของถั่วแปบช้างและกันภัย และสกัดไอไซโซม์เอสเทอเรส โดยใช้สารละลายสูตร B และสูตร A ตามลำดับ (ดูส่วนประกอบของสารละลายแต่ละสูตรในภาคผนวก)

6.4 บดส่วนประกอบที่จะสกัดไอโซไซม์แต่ละระบบและแต่ละชนิดของพืชด้วยโกร่งที่สะอาด และผ่านการแช่เย็นมาแล้ว ขณะบดต้องแช่อยู่บนน้ำแข็งเพื่อรักษา activity ของเอนไซม์ บดจนกระทั่งส่วนประกอบทั้งหมดเป็นเนื้อเดียวกัน

6.5 ถ่ายส่วนประกอบที่บดละเอียดแล้วใส่ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1 มล.

6.6 นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นานประมาณ 40 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

6.7 ถ่าย supernatant ใส่ลงในหลอด eppendorf อันใหม่เพื่อนำไปใส่ลงในช่อง wel slot ที่อยู่ใน spacing gel

7. <u>การเติมสารละลายที่มีเอนไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างพืช ลงบนแผ่น polyacrylamide gel</u>

7.1 ใช้ไมโครปิเปตต์ ขนาด 100 ไมโครลิตร ดูดสารละลายที่เป็น supernatantปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในช่อง wel slot ที่อยู่บน polyacrylamide gel ที่แช่อยู่ในสารละลาย electrode buffer ทั้งหมดจะอยู่ภายใน buffer chamber ที่ต่อกับเครื่องควบคุมระบบความเย็น

7.2 เมื่อเติมสารละลายตัวอย่าง (apply sample) เสร็จแล้วจะหยดสารละลาย BPB-Tris-Glycine ซึ่งเป็น dye marker ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบน upper tank electrophoresis

8. <u>การปฏิบัติการทางเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิส (running electrophoresis)</u>

8.1 เปิดเครื่อง power supply โดยตั้งระบบควบคุมกระแสไฟฟ้ากระแสตรงที่ระดับ 50 mA/cm^2 ในกรณีที่ใช้ 2 แผ่น

8.2 หลังจาก running electrophoresis นานประมาณ 3 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นเส้นสีน้ำเงิน (blue line) ที่เกิดจาก dye marker อยู่ห่างจากขอบกระจกด้านล่างประมาณ 0.5 นิ้ว จึงปิดสวิทช์ power supply

9. <u>การย้อมสีไอโซไซม์เพื่อศึกษารูปแบบต่าง ๆ ของแถบเอนไซม์ที่ปรากฏบนแผ่นเจล</u>

9.1 นำแผ่นเจลที่ผ่านการแยกเอนไซม์ด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิสมาย้อมด้วยสีที่จำเพาะต่อไอโซไซม์ ที่ศึกษาคือ เปอร์ออกซิเดส และเอสเทอเรส (ดูวิธีการในภาคผนวก)

9.2 เมื่อแผ่นเจลที่ผ่านการย้อมสีและดากทิ้งไว้ให้แห้งสนิทดีแล้วจะให้แผ่นเจลที่มีแถบของเอนไซม์แบบต่าง ๆ หลังจากนั้นจะถ่ายรูป และเขียนเป็น Zymogram ของไอโซไซม์แต่ละระบบ โดยใช้ค่า Rf ที่คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$Rf = \frac{\text{distance protein has migrated from origin}}{\text{distance from origin to tracking dye}}$$

9.3 เปรียบเทียบรูปแบบต่าง ๆ ของแถบที่ปรากฏบนแผ่นเจล และเปรียบเทียบ zymogram ของไอโซไซม์แต่ละระบบระหว่างถั่วแปบช้างและกันภัย

2.4 ศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณูและการงอกหลอดละอองเรณู

2.4.1 การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู

การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณูจะใช้ 2 วิธีคือ propionocarmine test ตามวิธีของ Elliott (1958) และ[3 (4, 5 dimethylthiazolyl-s) 2, 5 - diphenyltetrazolium bromide] test (MTT - test) ตามวิธีของ Norton (1966) ทดสอบกับละอองเรณูของถั่วแปบช้างและกันภัย อย่างละ 10 ช่อดอก ช่อดอกละ 5 ดอกย่อย มีวิธีการดังนี้

1. Propionocarmine test

เขี่ยละอองเรณู ลงบนสไลด์ หยด propionocarmine 1-2 หยด ปิดด้วยกระจกปิด ทิ้งไว้นาน 5 นาที แล้วนำไปตรวจลักษณะของละอองเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x 10 ละอองเรณูที่มีชีวิตจะติดสีแดงเต็มเซลล์ ส่วนที่ติดสีจางหรือไม่ติดสีหรือละอองเรณูที่เหี่ยวย่นเป็นละอองเรณูที่ไม่มีชีวิต คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของละอองเรณูของถั่วแปบช้างและกันภัย

2. [3 (4,5 dimethylthiazolyl-2) 2,5-diphenyltetrazolium bromide] test

เขี่ยละอองเรณูลงบนสไลด์ และหยด [3 (4,5 dimethylthiazolyl-2) 2,5-diphenyltetrazolium bromide] test 1-2 หยด ทิ้งไว้นาน 2-3 นาที แล้วนำไปตรวจลักษณะของละอองเรณู ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x 10 ละอองเรณูที่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงินม่วง ส่วนละอองเรณูที่ไม่มีชีวิตจะเป็นสีเหลือง นับจำนวนละอองเรณูที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของละอองเรณูของพืชทั้งสองชนิด

2. ศึกษาการงอกหลอดละอองเรณู (pollen)หรือ germination test

การศึกษาการงอกหลอดละอองเรณูโดยใช้อาหาร(meduim) 3 สูตร ซึ่งแบ่งย่อยได้อีก 12 สูตร เพื่อหาสูตรอาหาร ที่เหมาะสม ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.1 medium ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสอย่างเดียว โดยเตรียม medium ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสตั้งแต่ 3, 5, 7, 10, 12, และ 15 เปอร์เซ็นต์

2.2 medium ที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นเช่นเดียวกันกับ 2.1 และผงวุ้นอีก 1 กรัม ใส่ลงในแต่ละความเข้มข้น

2.3 medium ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส ผงวุ้น และ boric acid ซึ่งมีสูตรต่าง ๆ ดังนี้

สูตร 1 ประกอบด้วย ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ + ผงวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์

สูตร 2 ประกอบด้วย ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ + boric acid 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์

สูตร 3 ประกอบด้วย ซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ + ผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์

สูตร 4 ประกอบด้วย ซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ + boric acid 0.1 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเตรียม medium ประเภทต่าง ๆ แล้วนำ medium แต่ละสูตร หรือแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในสไลด์หลุมและเชื้อละอองเรณูที่ได้จากดอกที่บานตอนเช้าลงบน medium ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6-24 ชั่วโมง และนับจำนวนละอองเรณูที่งอกหลอดละอองเรณูและละอองเรณูที่ไม่งอกหลอดละอองเรณู คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกหลอดละอองเรณู และตรวจสอบว่า medium สูตรใด ที่มีความเหมาะสมต่อการทดสอบการงอกหลอดละอองเรณูของพืชทั้งสองชนิด

3. <u>ศึกษานิเวศสรีรวิทยา</u>

การศึกษานิเวศสรีรวิทยานั้น จะศึกษาการเจริญเติบโตในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม วัดปริมาณคลอโรฟิลล์และปริมาณ soluble โปรตีน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.1 <u>การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll centents determination)</u>

ตัวอย่างใบที่ใช้ในการศึกษาจะเก็บมาจากถิ่นอาศัยธรรมชาติ โดยใช้ใบประกอบใบที่ 5 นับจากยอดลงมา และตัวอย่างใบประกอบใบที่ 5 เช่นเดียวกับ เก็บตัวอย่างจากพืชทั้งสองชนิด ที่ปลูกในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยปลูกพืชทั้ง 2 ชนิดในกระถางพลาสติก กระถางละ 1 ต้น ชนิดละ 10 ต้น บรรจุดินธรรมดาและใส่ปุ๋ยอินทรีย์ กทม.-1 อัตราส่วน 1:1 และปลูกพืชนาน 1 เดือน และการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์จะใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Arnon (1949) มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17355473

1. ตัดใบจำนวน 4 ชิ้น (3.14 ตร.ซม.) ต่อตัวอย่างโดยใช้ที่เจาะจุกคอร์กและนำมาบดในโกร่งให้ละเอียด

2. เติมสารละลาย Acetone เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มล.

3. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

4. รินน้ำใสส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดทดลองที่ใช้วัดค่า absorbance (A)

5. นำสารละลายไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 663 nm และ 645 nm

6. คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยใช้สูตรของ Arnon (1940) ที่ดัดแปลงโดย Bruinsma (1963)

3.2 <u>การศึกษาปริมาณ Soluble โปรตีน (Soluble protein determination)</u>

การศึกษาบริมาณ Soluble โปรตีน จากตัวอย่างใบประกอบใบที่ 4 จากพืชทั้งสองชนิดที่วางแผนการทดลองชุดเดียวกันกับที่ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยใช้วิธีการของ Lowry (1951) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดใบจำนวน 4 ชิ้น (0.04 กรัม) ต่อตัวอย่างโดยใช้ที่เจาะจุกคอร์ก และนำมาบดในโกร่งให้ละเอียด

2. เติมสารละลาย Extract buffer pH 7.5 ปริมาตร 4 มล.

3. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

4. รินน้ำใสส่วนบน 2 มล. ลงในสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 2 มล.

5. เก็บไว้ที่ ice-bath นาน 30 นาที และนำไป centrifuge ที่ความเร็วเท่าเดิมนาน 10 นาที

6. รินน้ำใสตอนบนทิ้งและเติม TCA เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นำไป centrifuge นาน 10 นาที

7. รินน้ำใสตอนบนทิ้งและเติม 1 N NaOH 1 มล. นำไปวางไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสังเกตเห็นว่าตะกอนละลายหมดแล้ว

8. เติม Copper sulphate reagent 5 มล. ทิ้งไว้ 10 นาที

9. เติมสารละลาย Folin & Cioculteuis Phenol reagent 0.5 มล. ทิ้งไว้ 30 นาที

10. นำสารละลายไปวัดค่า absorbance (A) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm

11. นำค่า A ที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับ Standard curve เพื่อหาค่าปริมาณของ soluble โปรตีน

12. วิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณ soluble โปรตีน

3.3 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของถั่วแปบช้างและกันภัย ที่ปลูกในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อม

การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของพืชทั้งสองชนิด มีวิธีการดังนี้ คือ

1. เพาะเมล็ดในกะบะทราย โดยเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์สังเกตจากลักษณะของเมล็ดที่อวบเต่ง ไม่มีรอยบุ๋ม ตรงกลางเมล็ดเลือกมาชนิดละ 70 เมล็ด แช่น้ำทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 13 ชั่วโมง และนำไปเพาะเมล็ดในกะบะทราย จนกระทั่งได้เป็นต้นกล้า (seedling) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 วัน แล้วจึงย้ายไปปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 ซม. กระถางละ 1 ต้น

2. วางแผนการทดลองแบบ CRD เก็บข้อมูล 5 ต้น จากชุดทดลอง 4 ชุด คือ SS SK MS และ MK ซึ่งแต่ละชุดทดลองเป็นดังนี้

SS = A. sericea ปลูกในกระถางที่บรรจุดินจากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช

SK = A. sericea ปลูกในกระถางที่บรรจุดินจากอำเภอไทรโยค

MS = A. mahidolae ปลูกในกระถางที่บรรจุดินจากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช

MK = A. mahidolae ปลูกในกระถางที่บรรจุดินจากอำเภอไทรโยค

3. นำกระถางต้นไม้ไปไว้ในห้องควบคุมสภาวะแวดล้อมของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาที่พืชได้รับแสง 12 ชั่วโมง (6.00-18.00 น.)

4. การเก็บข้อมูลการทดลองจะเก็บทุก ๆ 4 วัน เก็บ 7 ครั้ง ในช่วงเวลา 8.00-12.00 น. ข้อมูลที่เก็บมีดังนี้

4.1 นับจำนวนใบย่อยที่เจริญเติบโตเต็มที่ สังเกตจากใบจะแผ่กางออกเต็มที่ไม่จีบ

4.2 วัดความยาวลำต้น (stem lenght) ใช้ไม้บรรทัดวัดจากเหนือดินถึงยอดมีหน่วยเป็นเซนติเมตร

4.3 วัดความกว้างและความยาวของใบย่อยที่แก่ทุกใบ มีหน่วยเป็นเซนติเมตรและนำข้อมูลไปหาพื้นที่ใบทั้งหมด โดยใช้วิธีการแทนค่าในสมการถดถอยเชิงเส้น (ดูในภาคผนวก)

4.4 น้ำหนักแห้งของใบโดยตัดใบย่อยทุก ๆ ใบใส่ลงในขวดแก้ว นำไปใส่ตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และย้ายมาที่ตู้อบอุณหภูมิ 80 เซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด

4.5 นำข้อมูล 4.1, 4.2, 4.4 ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนด้านเดียว(One-Way Analysis,ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละชุดทดลอง โดยวิธี DMRT(DUNCAN MULTIPLE RANGE TEST)

4.6 ข้อข้อมูล 4.3 และ 4.4 ไปคำนวณหาค่า Relative Growth Rate(RGR) และ Net Assimilation Rate (NAR) หรือ Unit Leaf Rate (ULR) ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้

ก. Relative Growth Rate (RGR) ใช้สูตรของ Fisher (1921) อ้างถึงใน Hunt (1982)

$$RGR = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{T_2 - T_1}$$

ข. Net Assimilation Rate (NAR) หรือ Unit Leaf Rate (ULR) ใช้สูตรของ William (1949) อ้างถึงใน Hunt (1982)

$$NAR = \frac{W_2 - W_1}{T_2 - T_1} \times \frac{\log_e L_{A2} - \log_e L_{A1}}{L_{A2} - L_{A1}}$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักแห้งใบ (กรัม) ในช่วงเวลาที่ 1

W_2 = น้ำหนักแห้งใบ (กรัม) ในช่วงเวลาที่ 2

L_{A1} = พื้นที่ใบทั้งหมดของพืชในช่วงเวลาที่ 1 (ตร.ซม.)

L_{A2} = พื้นที่ใบทั้งหมดของพืชในช่วงเวลาที่ 2 (ตร.ซม.)

T_1 = เวลาในช่วงที่ 1

T_2 = เวลาในช่วงที่ 2

4.7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย RGR และ ULR ในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บข้อมูลของแต่ละชุดทดลอง โดยวิธี DMRT(Duncan Multiple Range Test)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย