บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

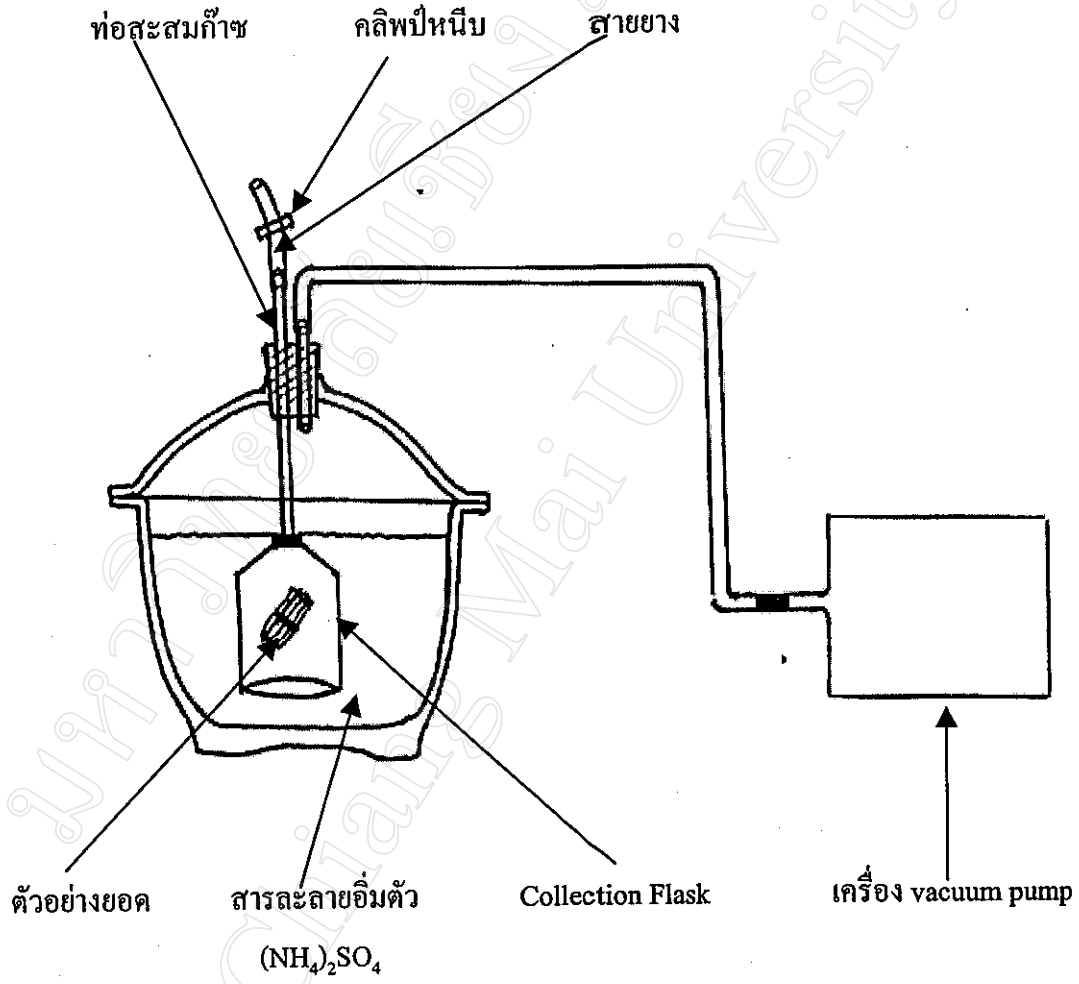
การทดลองที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทธิลีนและการพัฒนาในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลำไยพันธุ์ดอ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ ทำ 10 ซ้ำ โดยวิธีการ คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก 8, 6, 4, และ 2 สัปดาห์ โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ยอดลำไยยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักสดรวมประมาณ 10 กรัม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเก็บตัวอย่าง** เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 6 ธันวาคม 2541 และเก็บทุกๆ 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 17 มกราคม 2542 โดยตัดยอดลำไยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอดเป็นหนึ่งหน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติก แช่ในกระติกน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการทันทีเพื่อทำการดูดก๊าซออกจากยอดลำไย

2. **การเตรียมตัวอย่างและการดูดก๊าซออกจากยอดลำไย** นำยอดลำไยมาตัดให้มีความยาว 10 เซนติเมตร แต่ละหน่วยการทดลองใช้จำนวน 10 ยอด แต่ละหน่วยการทดลองใช้ยางมัดรวมกันและนำไปดูดก๊าซออกจากยอดตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Saltveit (1982) ดังภาพที่ 4. ซึ่งมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้



ภาพที่ 4. อุปกรณ์และวิธีดูดก๊าซออกจากตัวอย่างพืช (Saltveit, 1982)

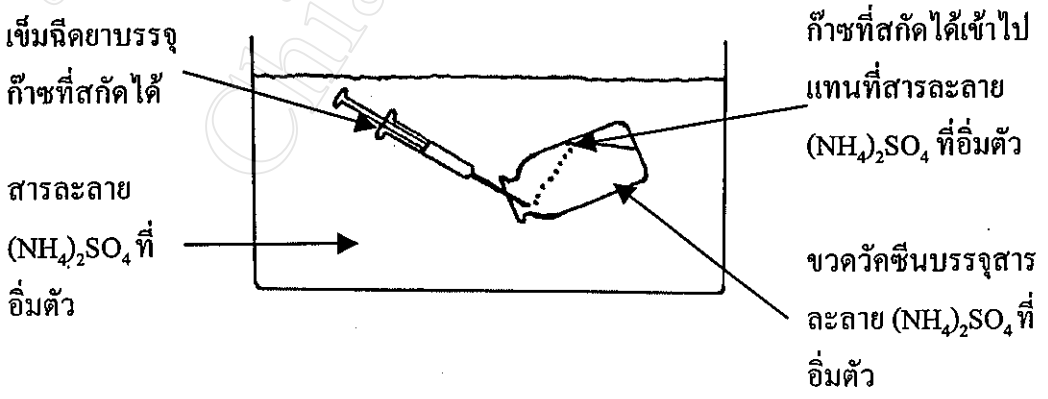
2.1 ใช้ desiccator ขนาด 10 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น collection flask ที่มีท่อต่อติดกับฝาของ desiccator ท่อนี้จะมีสายยางต่ออยู่ด้านบน เพื่อใช้สำหรับเป็นที่ดูดก๊าซที่สกัดได้จากยอดเพื่อจะนำไปฉีดเข้าเครื่อง gas chromatograph (GC)

2.2 เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่อิ่มตัว (ซึ่งเป็นสารละลายที่ดูดซับเอทธิลีนน้อยมาก) โดยให้ห่างจากขอบ desiccator ลงไปประมาณ 1 นิ้ว (โดยสารละลายจะท่วม collection flask)

2.3 ใช้สายยางต่อเข้ากับท่อที่ดูดอากาศออกจาก desiccator ไปยังเครื่อง vacuum

2.4 ก่อนทำการดูดก๊าซออกจากตัวอย่าง ต้องใส่ตัวอย่างพืชลงไปใน collection flask และค่อยๆ ปิดฝา desiccator และใช้ลูกยางดูดสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตให้ไหลขึ้นมาตามท่อสะสมก๊าซจนเต็มเพื่อไล่อากาศออกให้หมด แล้วใช้คลิพปิ๊หนีบบริเวณสายยางที่ต่อกับท่อสะสมก๊าซด้านบนให้แน่น

2.5 เริ่มดูดก๊าซออกจากยอดโดยเปิดเครื่อง vacuum โดยใช้แรงดูดประมาณ 600 มิลลิเมตรปรอท ก๊าซภายในยอดจะออกมาเป็นฟองและลอยขึ้นไปสะสมอยู่บริเวณด้านบนของท่อสะสมก๊าซ จับเวลาประมาณ 2 นาที ก็ปิดเครื่อง vacuum จากนั้นใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ปักลงตรงสายยางที่ต่อกับท่อสะสมก๊าซ แล้วดูดเอาก๊าซที่ได้ทั้งหมดนำไปฉีดเก็บไว้ในขวดวัคซีนขนาด 3 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีการแทนที่สารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ดังภาพที่ 5.



ภาพที่ 5.วิธีการเก็บก๊าซที่สกัดได้จากตัวอย่างโดยการแทนที่สารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ที่อิ่มตัว

จากนั้นปิดฝาขวดวัคซีนด้วยจุกยางและผนึกรอบจุกยางกับปากขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26 ± 2 °ซ) โดยคว่ำขวดวัคซีนลงเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทธิลีนต่อไป

3. การวิเคราะห์เอทธิลีน

3.1 การทำกราฟมาตรฐาน โดยการเตรียมก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ส่วนต่อล้าน โดยเตรียมจาก stock ที่มีความเข้มข้น 200 ส่วนต่อล้าน ซึ่งเตรียมจากก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน 99.5 % ใน Aerosol Containers , Filling Pressure 8 kg/cm^3 , Content 5 L (บริษัท เอส ที อี จำกัด, กรุงเทพ, ประเทศไทย) มีวิธีการเตรียมดังนี้

3.1.1 นำขวดที่ตัดก้นออกและมีฝาจุกยางปิดปากขวดวางลงในอ่างน้ำ ตะแคงให้น้ำเข้าไปภายในขวดจนเต็ม ไม่มีอากาศเหลือภายในขวด (ภาพที่ 6.)

3.1.2 นำขวดก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานที่สวม syringe adapter (ตำแหน่งที่ 1) เพื่อใช้สำหรับถ่ายก๊าซเอทธิลีนจากกระป๋องไปยังขวดที่เตรียม เมื่อสอดส่วนปลายของ syringe adapter ตรงตำแหน่งก้นขวดที่ตัดปลายออกแล้ว (ตำแหน่งที่2) จากนั้นกดด้านบนของกระป๋อง (ตำแหน่งที่3) ก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานจากกระป๋องจะออกมาแทนที่น้ำและเข้าไปอยู่ภายในขวดและลอยขึ้นไปสะสมอยู่บริเวณใต้จุกยาง (ภาพที่ 7.)

3.1.3 นำเข็มฉีดยามาเสียบผ่านจุกยางปิดปากขวดและดึงก้านเข็มฉีดยาเพื่อดูดก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานออกจากขวด (ดูดมา 1 มล) (ภาพที่ 8.)

3.1.4 นำเข็มฉีดยาจากข้อ 3.1.3 มาเสียบผ่านจุกยางที่ปิดปากขวดของ volumetric flask ที่ใช้สำหรับเป็นขวด stock ซึ่งรู้ปริมาตรแล้ว (ปริมาตรของ volumetric flask ขนาด 250 มล ; 261.81 มล) (ภาพที่ 9.)

ความเข้มข้นของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานที่ใช้เตรียมเป็น stock ที่เตรียมจากก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน 99.5% สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$n_1 v_1 = n_2 v_2$$

$$995{,}000 \text{ สตล (1 มล)} = n_2 (261.81 \text{ มล})$$

$$n_2 = 3800 \text{ สตล}$$

โดยที่ n_1 คือ ความเข้มข้นของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน 99.5 % ซึ่งมีความเข้มข้น 995,000 สตล

n_2 คือ ความเข้มข้นของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานที่ใช้เตรียมเป็น stock

v_1 คือ ปริมาตรของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานที่ดูดจากก๊าซเอทธิลีน มาตรฐาน 99.5%

v_2 คือ ปริมาตรของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานที่ใช้เตรียมเป็น stock (ปริมาตร ของ volumetric flask ขนาด 250 มล = 261.81 มล)

3.1.5 ทำการลดความเข้มข้นของ stock โดยนำเข็มฉีดยาดูดเอาก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานจากข้อ 3.1.4 ซึ่งมีความเข้มข้น 3800 สตล มาฉีดตรงบริเวณจุกยางของ volumetric flask อีกขวดหนึ่งที่รู้ปริมาตรแล้ว (ปริมาตรของ volumetric flask ขนาด 100 มล = 109.981 มล) (ภาพที่ 10.)

ปริมาตรของก๊าซเอทธิลีนที่ต้องดูดมาจาก stock ความเข้มข้น 3800 สตล สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$n_1v_1 = n_2v_2$$

$$3800 \text{ สตล } (v_1) = 200 \text{ (109.981 มล)}$$

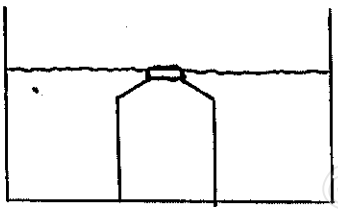
$$v_1 = 5.79 \text{ มล}$$

โดยที่ n_1 คือ ความเข้มข้นของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน

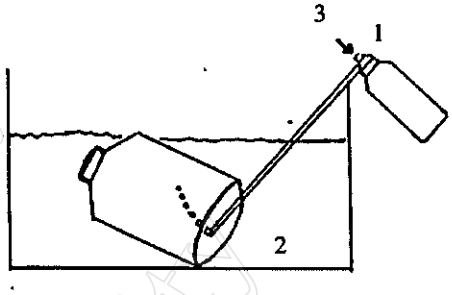
n_2 คือ ความเข้มข้นของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานที่ใช้เตรียมเป็น stock

v_1 คือ ปริมาตรของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานที่ดูดจาก stock ก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน

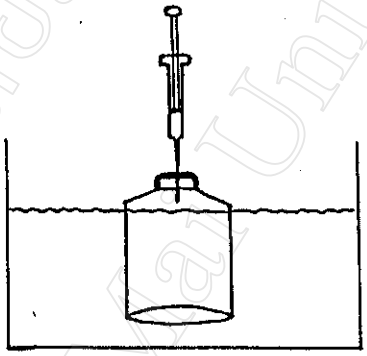
v_2 คือ ปริมาตรของก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานที่ใช้เตรียมเป็น stock (ปริมาตร ของvolumetric flask ขนาด 100 มล = 109.981 มล)



ภาพที่ 6. การนำขวดก้นตัดแช่ในน้ำ



ภาพที่ 7. การถ่ายก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานจากกระป๋องโดยการแทนที่น้ำ



ภาพที่ 8. การเก็บตัวอย่างก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน

ภาพที่ 9. การเตรียมก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 3800 สตล

ภาพที่ 10. การเตรียมก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 200 สตล

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

เมื่อเตรียม stock แล้วก็นำมาเตรียมก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 สตล ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร $n_1v_1 = n_2v_2$ เช่นกัน โดยจะต้องดูดก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานมาจาก stock ความเข้มข้น 200 สตล มา 5.79 มล และฉีดใส่ลงใน erlenmayer flask ที่มีจุกยางปิดปากขวดอยู่ ขนาด 50 มล ปริมาตร 58.404 มล (ดังภาพที่ 11.)

ก. ข.

ขวด stock ความเข้มข้น 200 สตล (volumetric flask 100 มล ปริมาตร 109.981 มล)

ก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 สตล (erlenmeyer flask 50 มล ปริมาตร 58.404 มล)

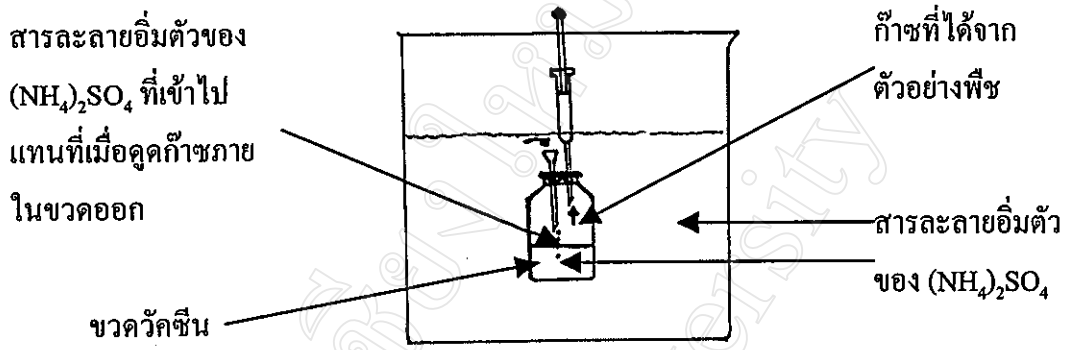
ภาพที่ 11. การเตรียมก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 สตล จากขวด stock

ก. ดูดก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานมา 5.79 มล จากขวด stock ความเข้มข้น 200 สตล

ข. ถ่ายก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานจาก ก. ลงใน erlenmeyer flask

สำหรับความเข้มข้นอื่นๆ ก็เตรียมเช่นเดียวกัน โดยที่ความเข้มข้น 1 สตล จะดูดมาจากก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 สตล มา 5.88 มล ฉีดใส่ลงใน erlenmeyer flask (ปริมาตร 58.806 มล) ความเข้มข้น 0.1 สตล จะดูดมาจากก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 1 สตล มา 5.91 มล ฉีดใส่ลงใน erlenmeyer flask (ปริมาตร 59.095 มล)

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทธิลีนในตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างก๊าซจากข้อ 2.5 มาดูดเอาก๊าซออกโดยวิธีการแทนที่สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวดังรูปที่ 12.



ภาพที่ 12. วิธีการดูดก๊าซออกจากขวดโดยการแทนที่สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว

1. คว่ำขวดวัดซีนลงในบิกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวและหงายด้านที่มีฝาจุกยางขึ้น โดยจะต้องไม่ให้ขวดวัดซีนโผล่พ้นสารละลาย
2. ใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ปักลงบนจุกยางแล้วใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 20 ปักลงบนจุกยางสำหรับใช้เป็นทางให้สารละลายจากนอกขวดไหลเข้าไปแทนที่ก๊าซที่ดูดออกไป จากนั้นใช้ syringe ดูดเอาก๊าซออกมาจากขวดวัดซีนปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ฉีดตัวอย่างก๊าซเข้าเครื่อง gas chromatograph (GC) โดยฉีดเข้าไปตรง injector port unit ของเครื่อง GC ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่นGC-9A (SHIMADZU, Japan) ซึ่งตรวจวัดเอทธิลีนโดยใช้ H2-flame ionization detector และใช้ column stainless steel ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 1.5 เมตร ซึ่งบรรจุ activated alumina 80/100 โดยใช้อุณหภูมิ injector , detector และ column 90, 90, และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4. **การทำ microtome section** (ดัดแปลงจาก มนัส, 2525)

4.1 การเก็บและการตัดตัวอย่าง นำส่วนปลายยอดลำไยมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ยาวประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร โดยตัดเอาเฉพาะส่วน apical meristem และ leaf primordia ประมาณ 1-2 ใบ เพื่อนำไปทำในขั้นตอนต่อไป

4.2 การฆ่าและคงสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing) นำชิ้นส่วนในข้อ 4.1 ที่ตัดหรือแยกแล้วไปแช่ในน้ำยาฆ่าและคงสภาพเซลล์ คือ FAA (formalin : acetic acid : alcohol) 70% โดยใช้ formalin (lab grade) : glacial acetic acid (lab grade) : ethyl alcohol 70% (lab grade) อัตรา 1:1:18 ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว (vial) โดยใส่น้ำยาให้ท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

4.3 การดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ นำชิ้นส่วนที่แช่อยู่ใน FAA 70% เข้าเครื่องดูดอากาศ (vacuum pump) เพื่อดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ และช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปได้ทั่วถึง โดยใช้ vacuum ที่ 600 mm.Hg นาน 1 ชั่วโมง จนกว่าฟองอากาศจะออกหมด โดยสังเกตได้จากการที่เนื้อเยื่อจมลงก้นขวดและไม่มีฟองอากาศผุดขึ้นมา จากนั้นทิ้งไว้ในสภาพสูญญากาศ 24 ชั่วโมง

4.4 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) นำชิ้นส่วนพืชแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) และ ethyl alcohol ที่มีระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 5 ระดับ คือ 50, 70, 85, 95, และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3.) แต่ละระดับใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ผสมสี erythrosin ลงไปเล็กน้อย เพื่อให้ชิ้นส่วนติดสีมองเห็นได้ชัดเจน

ตารางที่ 3. ระดับความเข้มข้นของส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ

Composition	Approximate total percentage of alcohol (%)				
	50	70	85	95	100
Distilled water (ml)	50	30	15	-	-
95% ethyl alcohol (ml)	40	50	50	45	-
Tertiary butyl alcohol (ml)	10	20	85	55	75
100% ethyl alcohol (ml)	-	-	-	-	25

4.5 การแทนที่แอลกอฮอล์ (infiltration) แช่ชิ้นส่วนที่ดึงน้ำออกแล้วใน TBA 100% 3 ครั้ง ๆ ละ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในส่วนผสมของ TBA 100% กับ paraffin oil ในอัตราส่วน 1:1 นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายชิ้นส่วนของพืชลงในขวดแก้ว (vial) ที่มี paraffin oil เพียงอย่างเดียว นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอา paraplast แข็ง เข้าตู้อบอุณหภูมิ 60 ^{0}ซ ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่งโมง จะได้เป็น paraplast เหลว แล้วนำเนื้อเยื่อใส่ลงไปในขวดแก้วที่มี paraplast เหลว จากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้อบ ณ อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

4.6 การฝังเนื้อเยื่อ (embedding) ใน paraplast ใช้กระดาษแข็งหน้ามันพับเป็นกระทงประมาณ 3 x 4 เซนติเมตร เท paraplast ที่หลอมไว้แล้วที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มาแล้วไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง ลงไปให้เกือบเต็มกระทง รอให้ส่วนล่างของ paraplast เย็นตัว จึงใช้เข็มปลายแหลมที่ลนไฟจนร้อนจัดปาดผิวหน้าของ paraplast ให้เหลวตลอดเวลา จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการ

infiltrate แล้วในตู้อบ เทใส่กระทง 1 ชิ้น พร้อมกับใช้เข็มปลายแหลมที่ร้อนจัดเรียงชิ้นส่วนพืชให้อยู่แนวที่ต้องการและเป็นการไล่ฟองอากาศออกจาก paraplast ด้วย แล้วรีบนำ paraplast ไปตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าตามลักษณะของเนื้อเยื่อพืชเพื่อรอการฝังบนแท่นไม้และรอการตัดต่อไป

4.7 การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome [Leitz Wetzlar, Scicrope Instrument Co., IA, U.S.A.] นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraplast มาแต่งเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปติดบนแท่งไม้โดยใช้ paraplast เป็นตัวเชื่อม แล้วนำไปตัดด้วย rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 15-20 ไมครอน จะได้แถบ paraplast ribbon ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่ ถ้าเป็นชิ้นส่วนพืชที่แข็งให้ตัดผิวหน้าของ paraplast จนถึงเนื้อเยื่อพืช แล้วนำไปแช่น้ำยาที่ทำให้เนื้อเยื่อนิ่ม (softening) ด้วยกรด hydrofluoric (AR grade) 50% ประมาณ 3-4 สัปดาห์ เพื่อให้น้ำยาซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อจนอ่อนตัวก่อนตัดนำเนื้อเยื่อไปล้างด้วยน้ำไหลอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

4.8 การนำแถบ paraplast ติดบนกระจกสไลด์ (affixation) ใช้ Hapt's adhesive 2% (โดยเตรียมจากไข่ขาว 2 มล ต่อน้ำกลั่น 98 มล ในปริมาตร 100 มล) โดยหยดน้ำยา 1-2 หยด ทาบนกระจกสไลด์โดยใช้พู่กันเขี่ยบริเวณที่จะติดเนื้อเยื่อ นำแถบ paraplast ribbon ที่ตัดไว้บนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ปล่อยให้แห้งวางทิ้งไว้ 3-4 วัน ก่อนทำการปิดสไลด์

4.9 ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้ Canada Balsam หรือ permount เป็น mounting media ไล่ฟองอากาศโดยใช้ปลายมีดผ่าตัด ทิ้งไว้ 4-5 วัน

4.10 นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยกล้อง photomicroscope [Olympus รุ่น PM-30, Olympus optical CO. Ltd., Tokyo, Japan] ใช้ฟิล์มขนาด 35 มิลลิเมตร ขนาดกำลังขยาย 47 เท่า ในการถ่ายภาพแล้วนำภาพที่ได้มาเทียบกับขนาดมาตราส่วนของ stage micrometer ที่ถ่ายด้วยกำลังขยายขนาดเดียว

5. การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกพื้นที่ใต้กราฟที่อ่านได้จากเครื่อง gas chromatograph และนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณความเข้มข้นของเอทธิลีนมีหน่วยเป็นส่วนต่อล้าน

ตัวอย่างการคำนวณ

สมมุติอ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟได้เท่ากับ 8725 ตารางมิลลิเมตร

กราฟมาตรฐานมีเส้นตรง คือ Y = -0.37824 + 0.0001702(X)

โดย Y คือ ความเข้มข้นของเอทธิลีน

X คือ พื้นที่ใต้กราฟที่อ่านได้จากเครื่อง gas chromatograph (ตารางมิลลิเมตร)

แทนค่า Y = -0.37824 + 0.0001702(8725)

Y = 1.1068 สตล

แสดงว่าตัวอย่างก๊าซเอทธิลีนมีความเข้มข้น 1.1068 สตล

2. วิเคราะห์ผลการทดลองโดยการวิเคราะห์ test of AOV assumption, AOV, LSD, C.V., linear regression และ correlation

3. ตรวจสอบ flower initiation โดยการทำ microtome section

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทธิลีนและการพัฒนาในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ ทำ 10 ซ้ำ โดยวิธีการ คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก 8, 6, 4, และ 2 สัปดาห์ โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ยอดลิ้นจี่ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักสดรวมประมาณ 10 กรัม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเก็บตัวอย่าง** เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 30 พฤศจิกายน 2542 และเก็บทุกๆ 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 11 มกราคม 2543 โดยตัดยอดลิ้นจี่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.2-0.3 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอดเป็นหนึ่งหน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติก แช่ในกระติกน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการทันทีเพื่อทำการดูดก๊าซออกจากยอดลิ้นจี่

2.**การเตรียมตัวอย่าง** การดูดก๊าซออกจากยอดลิ้นจี่ การวิเคราะห์เอทธิลีน การทำ microtome section และการบันทึกผลการทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 2-5

การทดลองที่ 3. การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทธิลีนและการพัฒนาในช่วงก่อนการออกดอกของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ ทำ 9 ซ้ำ โดยวิธีการ คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก 8, 6, 4, และ 2 สัปดาห์ โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ยอดมะปรางยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักสดรวมประมาณ 10 กรัม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเก็บตัวอย่าง** เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 26 กันยายน 2541 และเก็บทุกๆ 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 7 พฤศจิกายน 2541 โดยตัดยอดมะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอดเป็นหนึ่งหน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติก แช่ในกระติกน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการทันทีเพื่อทำการดูดก๊าซออกจากยอดมะปราง

2. **การเตรียมตัวอย่าง** การดูดก๊าซออกจากยอดมะปราง การวิเคราะห์เอทธิลีน การทำ microtome section และการบันทึกผลการทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 2-5

การทดลองที่ 4. การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลำไยพันธุ์ดอ

การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ ทำ 15 ซ้ำ โดยวิธีการ คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก 8, 6, 4, และ 2 สัปดาห์ โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ยอดลำไยยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักสดรวมประมาณ 10 กรัม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเก็บตัวอย่าง** ตัดยอดลำไย ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.5 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด เป็นหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้เวลาเก็บตัวอย่างเหมือนการทดลองที่ 1

2. **การเตรียมตัวอย่าง** ตัดยอดลำไยให้มีความยาวเหลือ 10 เซนติเมตร ล้างด้วยน้ำกลั่นและผึ่งให้แห้ง นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปบดด้วยเครื่อง Wiley intermediate mill ผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh ใส่ลงในถุงกระดาษ เก็บไว้ที่แห้งและเย็นเพื่อนำไปสกัดต่อไป (Chaitrakulsup, 1981)

3. **การหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง** ตามแบบของ AOAC (1984) โดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงใน moisture dish (ที่รู้น้ำหนักแล้ว) เปิดฝา moisture dish และอบที่อุณหภูมิ 135 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วปิดฝานำออกจากตู้อบแล้วย้ายออกมาเก็บไว้ให้เย็นในโถ

desiccator ทิ้งไว้อย่างน้อย 12 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก แล้วคำนวณหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างจากสูตร

$$\% \text{ ความชื้นในตัวอย่าง} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งและ moisture dish (ก่อนอบ – หลังอบป)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งและ moisture dish ก่อนอบ}} \times 100$$

ตัวอย่าง การหาความชื้นในตัวอย่างหนัก 1.0016 กรัม และน้ำหนักของ moisture dish พร้อมฝาหนัก 30.5798 กรัม ดังนั้นน้ำหนักของตัวอย่างและน้ำหนักของ moisture dish เท่ากับ 31.5814 กรัม หลังจากที่อบแล้วน้ำหนักตัวอย่างและน้ำหนักของ moisture dish เท่ากับ 31.4967 กรัม ดังนั้นสามารถคำนวณความชื้นในตัวอย่างดังนี้

$$\% \text{ ความชื้นในตัวอย่าง} = \frac{(31.5814 - 31.4967)}{31.5814} \times 100 = 0.2682\ \%$$

ถ้าใช้ตัวอย่างในการสกัด 100 กรัม จะมี % ความชื้น = 0.2682

ใช้ตัวอย่าง 0.3233 กรัม จะมี % ความชื้น $= \frac{0.2682 \times 0.3233}{100} = 0.0008671$

ดังนั้นตัวอย่างจะมีน้ำหนักแห้ง = 0.3233 – 0.0008671= 0.3224 กรัม

4. **การสกัดตัวอย่าง** ตามแบบของ Chaitrakulsup (1981) โดยชั่งตัวอย่าง 0.3 กรัม ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 0.2 N 40 มิลลิลิตร และปิดฝาด้วย aluminum foil อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH 6 N โดยกระดาษลิตมัสจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 นำส่วนที่กรองได้ประมาณ 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดพลาสติกขนาด 60 มล. และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปวิเคราะห์ต่อไป

5. **การวิเคราะห์ปริมาณ reducing sugar (RS)** ใช้ Shaffer – Somogyi Copper Iodometric (AOAC, 1984)

5.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ RS

5.1.1 สารละลาย Shaffer – Somogyi carbonate 50 reagent , 5 กรัม KI

ละลาย sodium carbonate และ potassium sodium tartrate อย่างละ 25 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ในบิกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ (ความเข้มข้น 100 กรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร) 75 มิลลิลิตรผ่านกรวย โดยให้ปลายกรวยอยู่ใต้ผิวของสารละลาย เติม $NaHCO_3$ 20 กรัม ทำให้ละลาย และเติม KI 5 กรัม เทสารละลายทั้งหมดลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติม 0.1 N KIO_3 (ความเข้มข้น 3.567 กรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร) 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บไว้หนึ่งคืนก่อนนำไปใช้

5.1.2 สารละลาย iodide – oxalate

ละลาย KI และ $K_2C_2O_4$ อย่างละ 2.5 กรัมในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกสัปดาห์)

5.1.3 สารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate

เตรียมสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.005 N (เตรียมทุกวัน) จาก stock solution 0.1 N sodium thiosulfate

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.1 N

ละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 25 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ค่อยๆ ต้มให้เดือดนาน 5 นาที และเทใส่ขวดขณะที่ยังร้อน ขวดที่ใส่ต้องล้างด้วยน้ำร้อนที่ต้มเดือดแล้ว เก็บสารละลายไว้ในที่มืดและเย็น ไม่ควรนำสารละลายที่ใช้แล้วเทกลับคืนลงขวด ถ้าต้องการใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.1 N ต้องเตรียมทุกวันโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ต้มแล้ว (สารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำจะสลายตัว ควรเตรียมเฉพาะที่จะใช้งาน)

5.2 การ standardization สารละลาย sodium thiosulfate

อบ $K_2Cr_2O_7$ ที่อุณหภูมิ 100 ^{0}ซ นาน 2 ชั่วโมงแล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งมา 0.20-0.23 กรัมโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด และใส่ในขวดสีชาหรือขวดหุ้ม aluminum foil (g-sl flask) เติมสารละลาย KI (ความเข้มข้น 2 กรัมในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร) เติม 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1N HCL 20 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเก็บในที่มืดนาน 10 นาที ไตเตรตกับสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่เตรียมไว้ด้วยเครื่องไตเตรตอัตโนมัติ (automatic titration) (Schott Gerate T90 TR15, Schott Gerate, Germany)

คำนวณ Normality ของสารละลาย sodium thiosulfate จากสูตร

Normality = g$K_2Cr_2O_7$ x 1000/ml $Na_2S_2O_3$ x 49.032

6. **การทำกราฟมาตรฐาน** ทำกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25-2.00 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 2.75 มิลลิกรัม/5 มิลลิลิตร เป็น stock solution และคำนวณความเข้มข้นออกมาเป็นส่วนต่อล้าน (สตล) โดย

สารละลาย 5 มิลลิลิตร 2.75 มิลลิกรัม

สารละลาย 1,000 มิลลิลิตร จะมีกลูโคส $\frac{2.75 \times 1000}{5} = 550$ มิลลิกรัม

ซึ่งสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 550 มิลลิกรัม/1,000 มิลลิลิตร คือ ความเข้มข้น 550 ส่วนต่อล้าน

ดังนั้นสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, และ 2.00 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ก็สามารถคำนวณความเข้มข้นออกมาเป็นส่วนต่อล้าน โดยวิธีการเดียวกันได้ดังนี้

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 50 สตล
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.50 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 100 สตล
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 150 สตล
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.00 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 200 สตล
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 250 สตล
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.50 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 300 สตล
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 350 สตล
สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 2.00 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 400 สตล

เตรียม stock ของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (กลูโคส 2.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร) โดยจะเตรียม 1,000 มิลลิลิตร ชั่งน้ำตาลกลูโคสมา 550 มิลลิกรัม (0.5500 กรัม) ด้วยเครื่องชั่งละเอียด นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

จากนั้นเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25-2.00 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร โดยทุกความเข้มข้นจะเตรียม 100 มิลลิลิตร จาก stock solution การคำนวณปริมาณของสารละลาย stock ของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ต้องการ คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

โดย C_1 = ความเข้มข้นของ stock สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่จะเตรียม

V_1 = ปริมาณของ stock สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่จะเตรียม

ดังนั้น เมื่อต้องการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 2.00 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 400 ส่วนต่อล้าน) โดยเตรียม 100 มิลลิลิตร จะต้องดูดจากสารละลาย stock มา

$$550 \text{ สตล} \times V_1 = 400 \text{ สตล} \times 100 \text{ มล}$$

$$V_1 = \frac{400 \times 100}{550}$$

$$V_1 = 72.7 \text{ มล}$$

จะต้องดูด stock สารละลายกลูโคสมาตรฐานมา 72.7 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นอื่นๆ ก็คำนวณเช่นเดียวกัน โดยเมื่อเตรียมสารละลาย 100 มิลลิลิตร จะต้องดูดมาจาก stock สารละลายกลูโคสมาตรฐานดังนี้

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 63.6 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.50 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 54.5 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 45.4 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.00 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 36.4 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 27.3 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.50 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 18.2 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 9.1 มิลลิลิตร

ทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ทำ 5 ซ้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์ linear regression และ correlation

6. **การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล** ตามแบบของ AOAC (1984) โดยดูดสารละลายตัวอย่างที่คาดว่าจะมี reducing property เท่ากับกลูโคส 0.25-2.00 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอด test tube ขนาด 25x200 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Shaffer-Somogy carbonate 50 reagent 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน เตรียม blankโดยใช้น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใส่ reagent 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองด้วย aluminum foil และนำไปต้มให้เดือดนาน 15 นาที ค่อยๆ ยกออกมาไม่ให้

กระเทือน นำไปวางในน้ำเย็นที่ 0 องศาเซลเซียส ที่ไหลเวียนนาน 4 นาที เปิด aluminum foil เท สารละลาย iodide oxalate ลงข้าง ๆ หลอดอย่างช้าๆ หลอดละ 2 มิลลิลิตร เติม H_2SO_4 2 N หลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้ CuO_2 ละลาย และนำไปแช่ในน้ำเย็น 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เขย่า 2 ครั้ง ในขณะที่ทำให้เย็น จากนั้นนำไปไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ 0.005 N นำปริมาตรที่ได้จากการไตเตรตไปลบกับ blank แล้วคำนวณหาปริมาณกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

8. **การบันทึกผลการทดลอง**

1. บันทึกปริมาณ sodium thiosulfate ที่ใช้ในการไตเตรต กับสารละลายตัวอย่าง มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร แล้วเทียบหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหาปริมาณ TNC มีหน่วยเป็น mg glucose equivalent / gram dry weight
2. วิเคราะห์ผลการทดลองโดยการวิเคราะห์ test of AOV assumption, AOV, LSD, C.V., polynomial contrast, linear regression และ correlation

การทดลองที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ ทำ 15 ซ้ำ โดยวิธีการ คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก 8, 6, 4, และ 2 สัปดาห์ โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ยอดลิ้นจี่ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักสดรวมประมาณ 10 กรัม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเก็บตัวอย่าง** ตัดยอดลิ้นจี่ ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.3 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด เป็นหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้เวลาที่เก็บตัวอย่างเหมือนการทดลองที่ 2

2. **การเตรียมตัวอย่าง** การหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง การสกัดตัวอย่าง การทำกราฟมาตรฐาน การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล การบันทึกผล และการวิเคราะห์ผลการทดลอง เหมือนการทดลองที่ 4 ข้อ 2- 8

การทดลองที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างในช่วงก่อนการออกดอกในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า

การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 วิธีการ ทำ 11 ซ้ำ โดยวิธีการคือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก 8, 6, 4, และ 2 สัปดาห์ โดยมี 1 หน่วยการทดลองคือ ยอดมะปรางยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักสดรวมประมาณ 10 กรัม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง ตัดยอดมะปราง ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.5 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด เป็นหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้เวลาที่เก็บตัวอย่างเหมือนการทดลองที่ 3

3. การเตรียมตัวอย่าง การหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง การสกัดตัวอย่างการทำกราฟมาตรฐาน การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล การบันทึกผล และการวิเคราะห์ผลการทดลองเหมือนการทดลองที่ 4 ข้อ 2- 8

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1. สวนวังน้ำค้าง อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่
2. สวนลำไยของสถาบันวิจัยและฟื้นฟูสภาพแมคเคน อ.เมือง จ.เชียงใหม่
3. สวนสองแสน สถานีวิจัยดอยปุยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ระหว่างเดือน ตุลาคม 2541 ถึงเดือน เมษายน 2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University