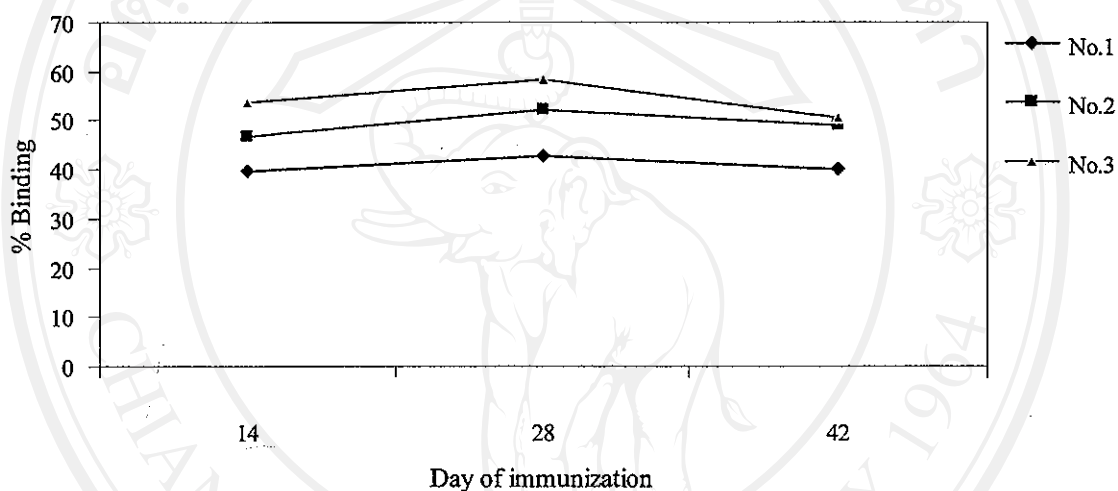


## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง (หนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c)

จากการฉีด ZR-BSA ได้ผิวหนังกระตุ้นหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c จำนวน 3 ตัว ทุกสองสัปดาห์ พบว่า สัตว์ทดลองสามารถสร้างแอนติบอดีต่อฮอว์โมน ZR ได้จึงคัดเลือกหนูที่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อ ZR ได้ดีที่สุดคือ หนู Balb/c No.3 (ดังแสดงในภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 แสดงการจับ (affinity) ระหว่าง ZR-H<sup>3</sup> กับแอนติบอดีจากหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c จำนวน 3 ตัว หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก 14 28 และ 42 ตามลำดับ

#### 4.2 ผลการผลิต Hybridoma cells

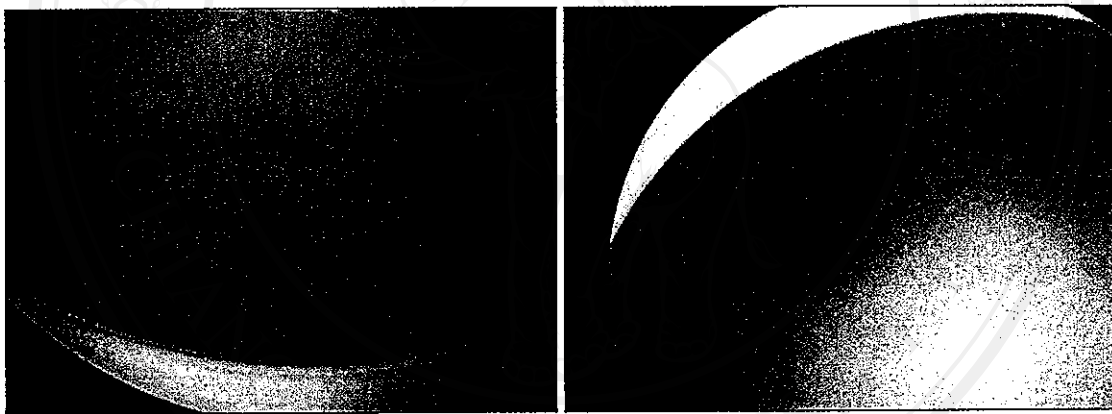
หลังจากคัดเลือกหนูที่สามารถสร้างแอนติบอดีต่อ ZR ได้ นำหนูมาทำการรณขมาตและนำเซลล์ม้ามที่ได้มา fusion กับเซลล์ไมอิโลมาที่เลี้ยงในไมโครเพลทตลอดเชื้อชนิด 96 หลุม ที่มี feeder cell เพื่อเป็นเซลล์พี่เลี้ยงสำหรับเลี้ยงเซลล์ลูกผสม ภายหลังจากการ fusion ทั้ง 2 ชนิด ประมาณ 10-14 วัน เซลล์ไมอิโลมาที่ไม่ได้ fusion กับเซลล์ม้ามจะตายไปเนื่องจากฤทธิ์ของ aminopterin ที่อยู่ใน HAT medium ขณะเดียวกันเซลล์ม้ามที่ไม่ได้ fusion กับเซลล์ไมอิโลมา จะตายไปเองตามอายุขัยของเซลล์ เซลล์ที่รอด ใน HAT medium จะเป็น Hybridoma cells เท่านั้น ซึ่งจะเจริญเติบโตและแบ่งตัวเป็น โคลนต่อไป จากทั้งหมด 352 หลุม เกิดกลุ่มโคลนไฮบริโดมา 25 หลุม คิดเป็น 7.1 %

#### 4.3 ผลการตรวจหา Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR (Screening)

เมื่อนำกลุ่มโคลนที่ได้ทั้ง 25 หลุม มาทำการตรวจหาการผลิตแอนติบอดีต่อ ZR ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า มีกลุ่มโคลนที่สามารถให้ผลเป็นบวกเท่ากับ 2 หลุม (ตารางที่ 3) ที่ผลิตแอนติบอดีต่อ ZR คิดเป็น 8 % จากกลุ่มโคลนทั้งหมด จากนั้นนำกลุ่มโคลนทั้ง 2 หลุม มาทำการแยกเป็นโคลนเดี่ยว โดยวิธี limiting dilution

#### 4.4 ผลการแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี Limiting dilution

ทำการแยกโคลนเดี่ยวได้ประมาณ 10 วัน (ภาพที่ 15) กลุ่มโคลนแรก (1C10) เกิดโคลนเดี่ยว 17 โคลน จากทั้งหมด 576 หลุม คิดเป็น 2.95 % (ตารางที่ 4) กลุ่มโคลนที่สอง (1G9) เกิดโคลนเดี่ยว 17 โคลน จากทั้งหมด 576 หลุม คิดเป็น 2.95 % (ตารางที่ 5)



(A)

(B)

ภาพที่ 15 แสดง Hybridoma cells หลังการทำ limiting dilution ได้ 10 วัน ของโคลน 1C10 (A) และโคลน 1G9 (B) (x 40 เท่า)

ตารางที่ 3 แสดงค่า Optical density (OD) ของ Media ที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนของ Hybridoma cells จากการ fusion ระหว่างเซลล์มีามที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ ZR-BSA และ เซลล์ไมอีโมา

โคลนที่	ตำแหน่งที่เกิดโคลน	ค่าเฉลี่ย O.D วัดที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		ความแตกต่าง ของค่า OD
		หลุมที่เคลือบด้วย ZR-BSA	หลุมที่เคลือบด้วย BSA	
1	1B11	2.431	2.100	0.331
2	1C9	0.101	0.092	0.009
3	1C10	2.395	0.135	2.260
4	1E4	0.094	0.074	0.020
5	1G9	2.382	0.126	2.256
6	1G10	0.076	0.090	-0.014
7	2C10	0.102	0.099	0.003
8	2D6	0.089	0.091	-0.002
9	2E8	0.081	0.090	-0.009
10	2G4	0.084	0.088	-0.004
11	2G7	0.171	0.113	0.058
12	3E5	0.159	0.096	0.063
13	3G7	0.125	0.097	0.028
14	3G8	0.179	0.169	0.010
15	4B4	0.109	0.083	0.026
16	4C2	0.151	0.087	0.064
17	4C8	0.100	0.087	0.013
18	4D3	0.111	0.091	0.02
19	4D5	0.083	0.079	0.004
20	4D8	0.078	0.083	-0.005
21	4D10	0.076	0.074	0.002
22	4E5	0.101	0.088	0.013
23	4E8	0.156	0.087	0.069
24	4E9	0.094	0.072	0.022
25	4G8	0.090	0.079	0.011

ตารางที่ 4 แสดงค่า Optical density (OD) จากการตรวจแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ ZR-BSA และ BSA ของ Media ที่เก็บจากกลุ่มโคลน 1C10 ที่มีโคลนเดียว ภายหลังจากการทำ Limiting dilution

ชื่อ โมนโคลนอล แอนติบอดี	ค่าเฉลี่ย O.D วัดที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		ค่าความแตกต่าง ของค่า O.D
	หลุมที่เคลือบด้วย		
	ZR-BSA	BSA	
1C10-1B4	2.026	0.149	1.877
1C10-1B6	3.300	0.981	2.320
1C10-1C5	3.300	0.098	3.203
1C10-1E3	2.320	0.079	2.241
1C10-1E4	3.300	0.141	3.159
1C10-1E11	3.300	0.838	2.462
1C10-1G7	2.152	0.092	2.060
1C10-2E5	3.300	0.191	3.109
1C10-2E9	1.955	0.170	1.785
1C10-2E10	1.920	0.131	1.789
1C10-2E11	3.300	0.195	3.105
1C10-2G6	1.668	0.136	1.533
1C10-3E6	2.285	0.100	2.185
1C10-4E10	3.300	0.173	3.127
1C10-4G9	3.300	0.220	3.080
1C10-4G10	3.300	0.163	3.137
1C10-5F6	2.583	0.110	2.473

ตารางที่ 5 แสดงค่า Optical density (OD) จากการตรวจแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ ZR-BSA และ BSA ของ Media ที่เก็บจากหลุมโคลน 1G9 ที่มีโคลนเดี่ยว ภายหลังจากการทำ Limiting dilution

ชื่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี	ค่าเฉลี่ย O.D วัดที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		ค่าความแตกต่างของค่า O.D
	หลุมที่เคลือบด้วย ZR-BSA	หลุมที่เคลือบด้วย BSA	
1G9-1D9	2.468	0.141	2.327
1G9-1F7	2.125	0.179	1.946
1G9-1B6	1.992	0.078	1.914
1G9-1D6	1.924	0.080	1.844
1G9-2B6	2.819	0.091	2.728
1G9-2C10	2.982	0.083	2.899
1G9-2D6	2.946	0.080	2.867
1G9-2F7	2.742	0.075	2.667
1G9-2E3	2.383	0.102	2.281
1G9-2F5	3.004	0.122	2.882
1G9-2H8	3.170	0.153	3.017
1G9-4B2	2.893	0.152	2.741
1G9-4E10	2.655	0.112	2.543
1G9-5E11	3.222	0.105	3.117
1G9-5F9	2.924	0.120	2.804
1G9-6G8	3.219	0.101	3.118
1G9-6F3	2.382	0.120	2.262

#### 4.5 ผลการจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (isotyping)

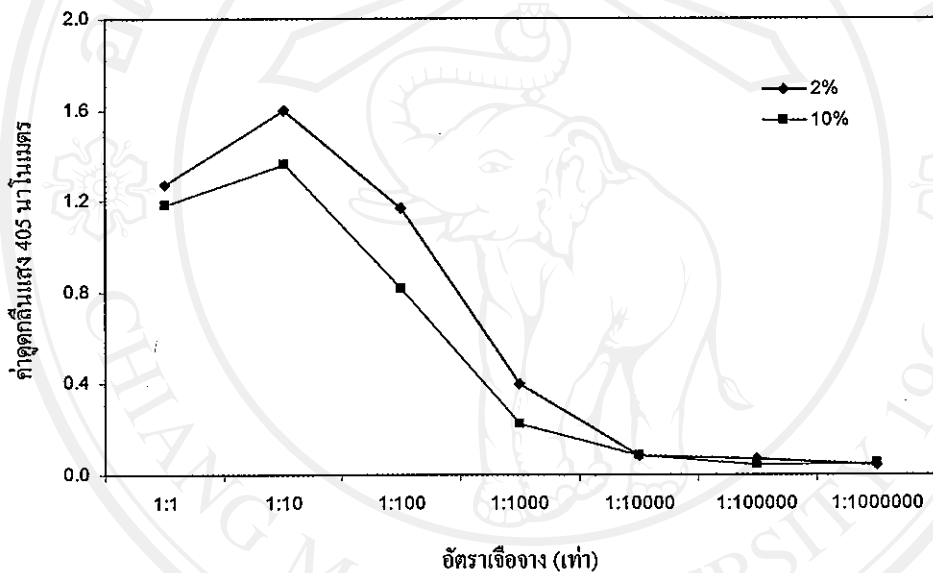
เมื่อเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จาก Hybridoma cells ภายหลังจากการทำ Limiting dilution มาจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน พบว่าเป็น Immunoglobulin G1 (IgG1) ทั้งหมด ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการศึกษาของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการทำการปฏิกิริยากับ goat anti-mouse IgG1, goat anti-mouse IgG2a, goat anti-mouse IgG2b, goat anti-mouse IgG3, goat anti-mouse IgM และ goat anti-mouse IgA

Monoclonal antibody	ค่าเฉลี่ย O.D ที่ทำปฏิกิริยากับ		ค่าเฉลี่ย O.D ที่ทำปฏิกิริยากับ		ค่าเฉลี่ย O.D ที่ทำปฏิกิริยากับ		ชนิด
	goat anti-mouse IgG1	goat anti-mouse IgG2a	goat anti-mouse IgG2b	goat anti-mouse IgG3	goat anti-mouse IgGM	goat anti-mouse IgGA	
C10-1B4	0.90	0.62	0.57	0.55	0.55	0.48	IgG1
C10-1E4	0.95	0.58	0.58	0.56	0.58	0.54	IgG1
C10-2E9	0.83	0.63	0.60	0.58	0.61	0.57	IgG1
G9-1F7	0.93	0.61	0.59	0.61	0.58	0.57	IgG1
G9-2F7	0.85	0.61	0.56	0.55	0.61	0.56	IgG1
G9-2H8	0.85	0.48	0.46	0.51	0.51	0.45	IgG1
G9-4E10	0.78	0.47	0.49	0.50	0.50	0.48	IgG1
G9-4B2	0.73	0.49	0.45	0.48	0.54	0.44	IgG1
G9-5E11	0.74	0.47	0.47	0.49	0.61	0.44	IgG1
G9-5F9	0.71	0.46	0.46	0.54	0.50	0.44	IgG1
G9-6G8	0.76	0.45	0.46	0.41	0.42	0.40	IgG1
G9-6F3	0.59	0.46	0.45	0.39	0.40	0.39	IgG1

#### 4.6 ผลการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก Hybridoma cells

หลังจากนำ Hybridoma cells ที่ผลิตต่อฮอร์โมน ZR ที่ได้จากการแยกโคลนเดี่ยว มาทำการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยเลี้ยงด้วย 10 % FBS เป็นเวลา 3-5 วัน ทำการนับเซลล์ไฮบริโดมา จำนวน  $10^5$ - $10^6$  เซลล์/1 มิลลิลิตร เลี้ยงเปรียบเทียบใน 2 % FBS และ 10 % FBS เพื่อศึกษา อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมของการผลิตแอนติบอดี ใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 30 วันหรือสังเกต จน Hybridoma cells ตายจนเกือบหมด พบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ 2 % FBS ผลิตแอนติบอดีเข้มข้นกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ 10 % FBS ดังภาพที่ 16



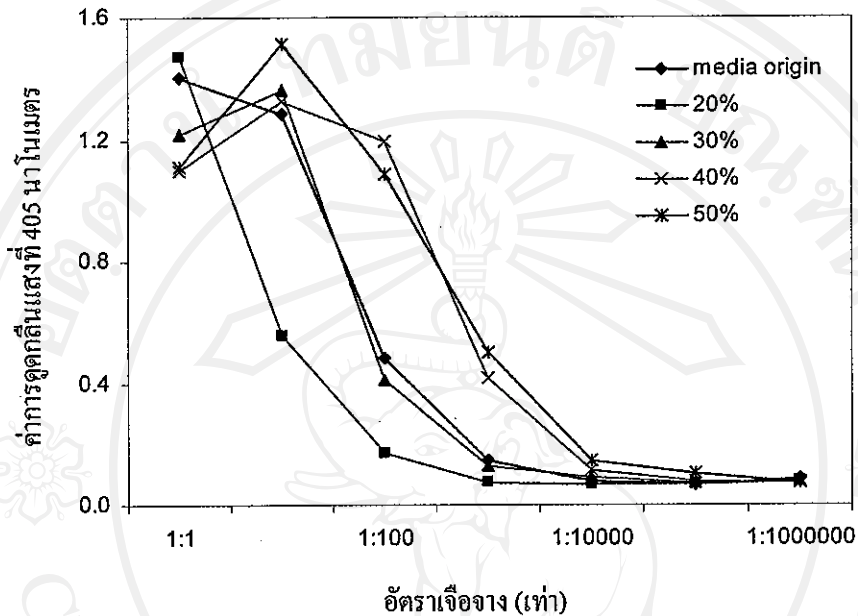
ภาพที่ 16 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรของ media ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ผลิตแอนติบอดี ของ 2 % FBS และ 10 % FBS

#### 4.7 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ (purification) ด้วย saturated ammonium sulfate และปริมาณแอนติบอดีจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

จากการนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 20 %, 30 %, 40 % และ 50 % เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ saturated ammonium sulfate ที่เหมาะสมของการทำให้บริสุทธิ์ พบว่า saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 50 % สามารถตกตะกอนแอนติบอดีได้มากกว่า saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ดังภาพที่ 17 จึงได้นำน้ำเลี้ยง มาทำให้บริสุทธิ์



ด้วย saturated ammonium acetate ที่ความเข้มข้น 50 % เพื่อนำมาใช้ตรวจวัดปริมาณ ZR ในขั้นตอนนี้ต่อไป

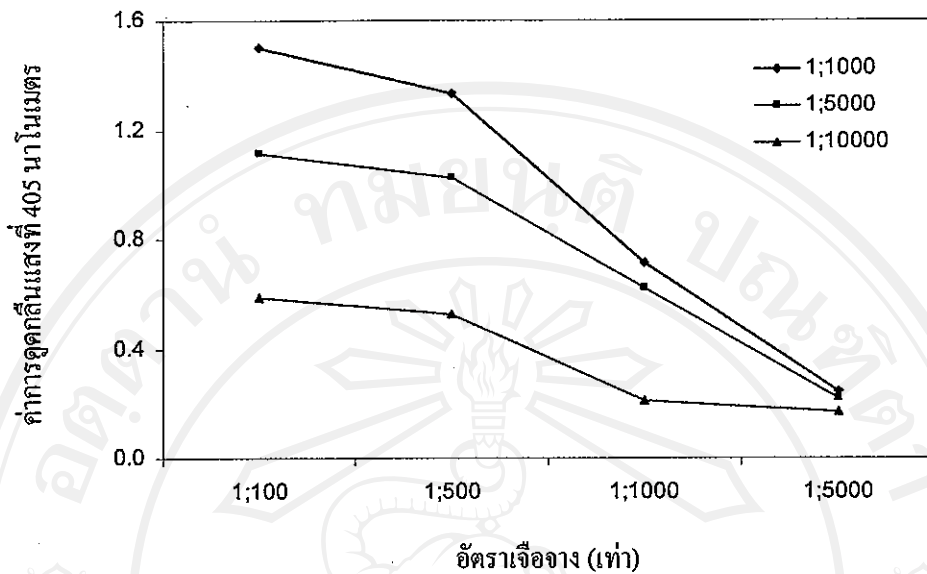


ภาพที่ 17 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรของการทำให้บริสุทธิ์ด้วย saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 20 %, 30 %, 40 % และ 50 %

#### 4.8 ผลการหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAbZR) และแอนไซม์ (anti-mouse IgG-AP)

ในการหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมนี้เลือกแอนติบอดีต่อ ZR จากโคลน ZR-G9 ซึ่งเป็นโคลนที่มีค่า antibody titer สูงที่สุด สุขภาพดี เพิ่มจำนวนเร็ว และสามารถเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ปริมาณมาก ทำให้ได้แอนติบอดีในปริมาณมาก มาหาอัตราการเจือจางของแอนติบอดีที่สัมพันธ์กัน และมีค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.0-1.5 ถ้าหากเลือกใช้ในอัตราส่วนที่มากเกินไป จะทำให้สิ้นเปลือง อัตราเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 1:500 และแอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 1:5000 ดังภาพที่ 18





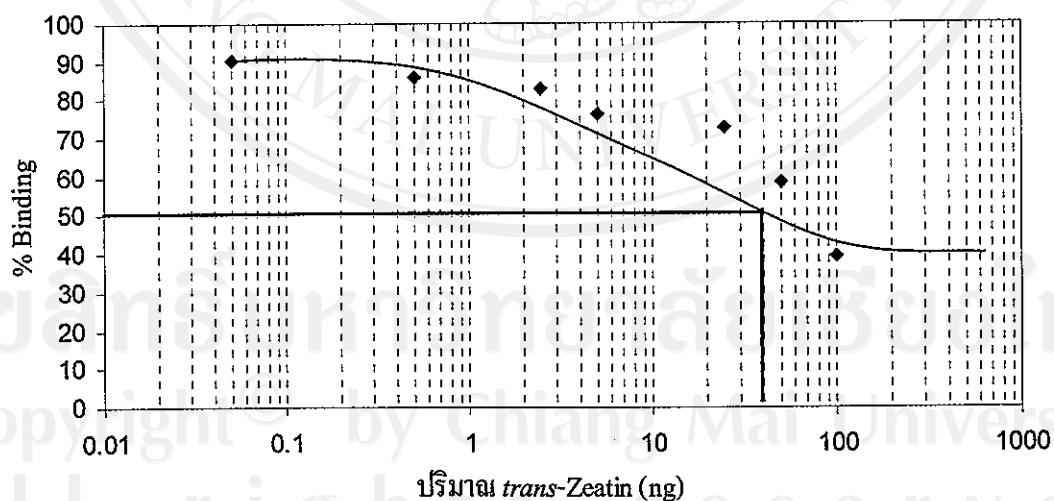
ภาพที่ 18 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ในการหาอัตราเจือจางของแอนติบอดีกับแอนไซม์ที่เหมาะสม

#### 4.9 ผลการวัดปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Cross reaction) ของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR

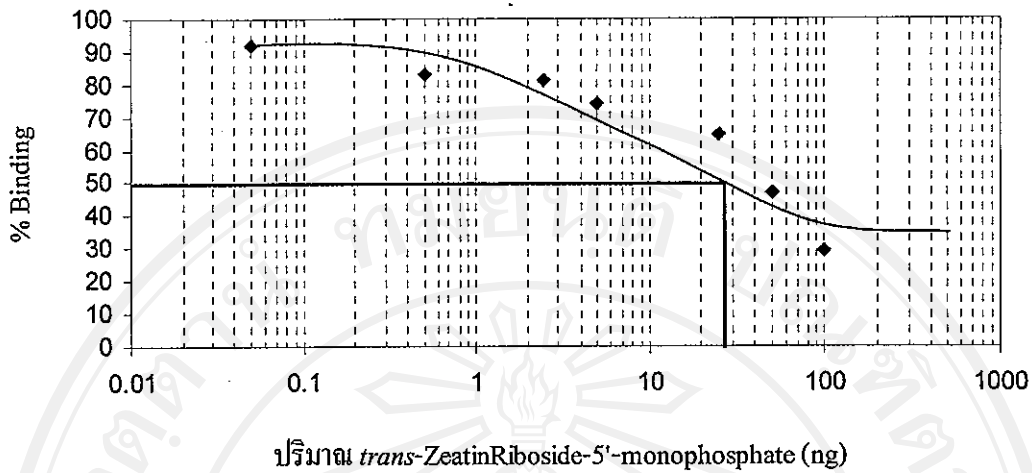
เมื่อนำแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR ทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ *trans-Zeatin Riboside*, *trans-Zeatin Riboside-5'-monophosphate*, *trans-Zeatin*, *Dihydrozeatin*, *trans-Zeatin-9-glucoside*, *Dihydrozeatin Riboside*, *cis-Zeatin*, *cis-Zeatin Riboside*, *N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -Isopentenyl) adenosine*, *N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -Isopentenyl) adenine* และ *trans-Zeatin-0-glucoside Riboside* พบว่า แอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR มี % Cross reaction กับ *trans-ZeatinRiboside-5'-monophosphate* มากที่สุด คือ 86.13 % (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงค่า % Cross reactivity ของแอนติบอดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซอร์โมนชนิดอื่น

ชนิดของซอร์โมน	ค่า % Cross reactivity ที่ 50% displacement
<i>trans</i> -Zeatin Riboside	100
<i>trans</i> -Zeatin Riboside-5'-monophosphate	86.13
<i>trans</i> -Zeatin	56.97
Dihydrozeatin	2.53
<i>trans</i> -Zeatin-9-glucoside	2.48
Dihydrozeatin Riboside	1.91
<i>cis</i> -Zeatin	0
<i>cis</i> -Zeatin Riboside	0
<i>N</i> <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -Isopentenyl)adenosine	-
<i>N</i> <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -Isopentenyl)adenine	-
<i>trans</i> -Zeatin-0-glucoside Riboside	-



ภาพที่ 19 แสดงผลของแอนติบอดีต่อซอร์โมน ZR ทำปฏิกิริยากับ *trans*-Zeatin



ภาพที่ 20 แสดงผลของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR ทำปฏิกิริยากับ *trans-ZeatinRiboside-5'-monophosphate*

#### 4.10 การทำ Intra coefficient assay และ Inter coefficient assay

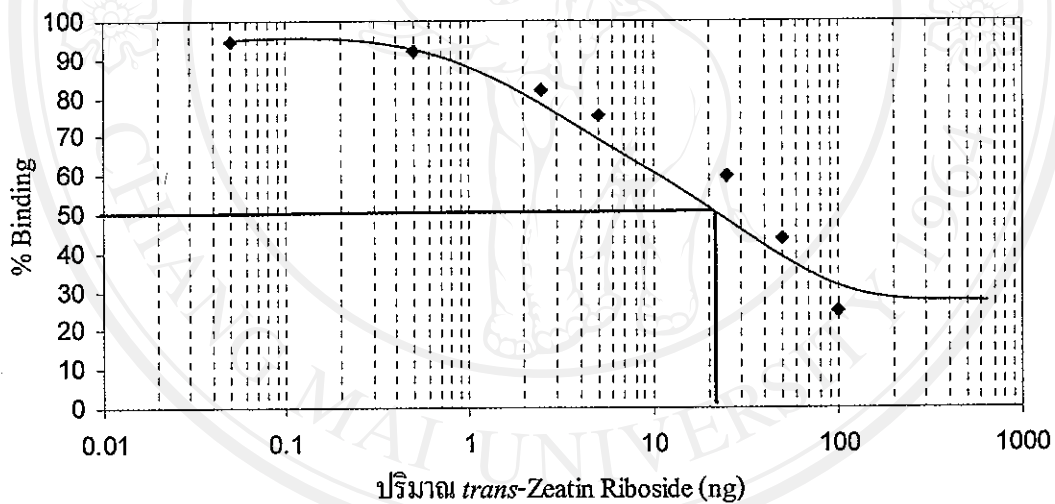
การคำนวณหาค่า Coefficient of variation จากสูตร  $CV = \sigma/\mu$  โดยแทนค่า  $\sigma$  คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และ  $\mu$  คือ ค่าเฉลี่ย (mean) โดยเลือกตัวอย่างที่มีความเข้มข้น ZR เฉลี่ยประมาณ 5 ng/50  $\mu$ l มาทำการวิเคราะห์ เมื่อนำตัวอย่างมาหาค่า intra coefficient assay คือ การวิเคราะห์ภายในเพลทเดียวกัน มีค่า CV เท่ากับ 8.88 % และนำตัวอย่างมาหาค่า inter coefficient assay คือ การวิเคราะห์ก้นละเพลท มีค่า CV เท่ากับ 7.96 %

#### 4.11 ผลการสร้างกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน ZR

ในการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ในอัตราส่วนเจือจางที่ 1:500 และใช้เอนไซม์อัตราเจือจางที่ 1:5000 ในการสร้างกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน ZR พบว่า เมื่อนำแอนติบอดีมาทำปฏิกิริยากับสารละลายฮอร์โมน ZR ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 21) พบความไวของการทำปฏิกิริยาที่ 50 % binding ได้ 38.50 ng/50  $\mu$ l, 80 % binding ได้ 2.50 ng/50  $\mu$ l และ 20 % binding ได้ 100.2 ng/50  $\mu$ l (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แสดงผลที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน.

Concentration ng	Absorbance		B/Bo %	Calculated ng	Deviation %
	Mean	CV			
0.00	1.143	4.9	100		
0.05	1.081	0.8	94.6	0.05	0.0
0.50	1.051	0.3	92.0	0.50	0.0
2.50	0.938	0.6	82.1	2.50	0.0
5.00	0.860	6.4	75.2	5.00	0.0
25.00	0.679	2.3	59.4	24.90	0.4
50.00	0.494	1.4	43.2	50.00	0.0
100.00	0.281	3.0	21.6	100.2	0.2

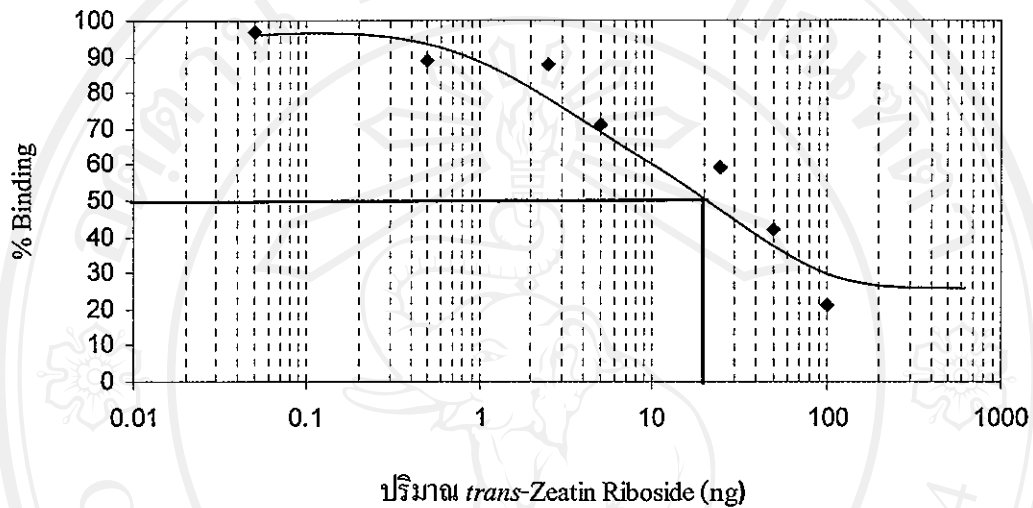


ภาพที่ 21 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน ZR เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีอัตราเจือจาง 1:500 พบความไวของการทำปฏิกิริยาที่ 50 % binding ได้ 38.5 ng/50 ul

Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

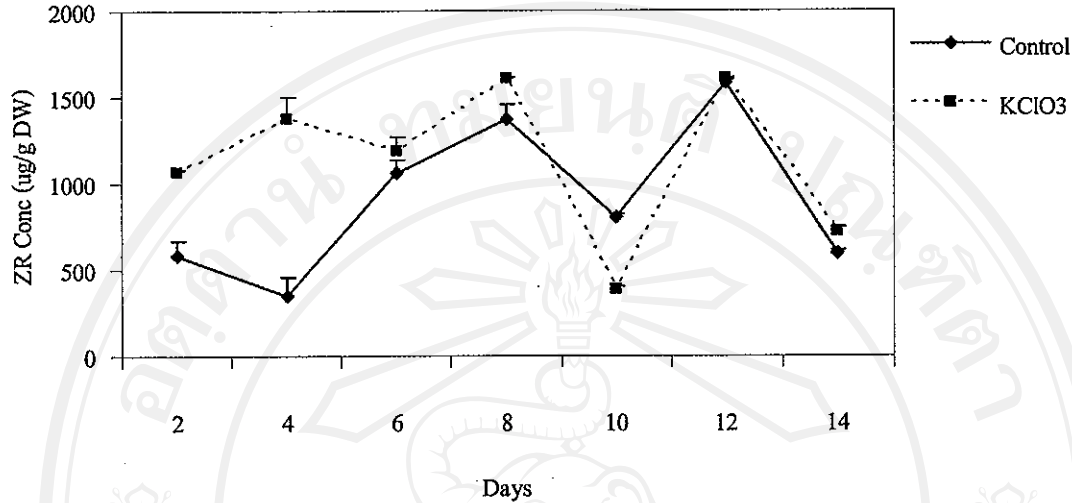
#### 4.12 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน ZR โดยวิธี Indirect ELISA

หลังจากนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นได้ มาทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณฮอร์โมน ZR ในเนื้อเยื่อพืช พบว่า เส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน ZR ควบคู่กับการวิเคราะห์ดังภาพที่ 22 พบความไวของการทำปฏิกิริยาที่ 50 % binding ได้ 37.85 ng/50 ul



ภาพที่ 22 แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน ZR ที่ทำควบคู่กับการวิเคราะห์ปริมาณ ZR ในตัวอย่างพืช พบความไวของการทำปฏิกิริยาที่ 50% binding ได้ 37.85 ng/50 ul

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ZR จากราก พบว่า หลังจากราดสาร โพแทสเซียมคลอเรต ทำให้ปริมาณ ZR เพิ่มขึ้นมากกว่าการไม่ได้ราดสาร โดยพบปริมาณ ZR เพิ่มขึ้นในวันที่ 2, 4, 8, 10 และ 14 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นที่ไม่ได้ราดสาร (ภาพที่ 23 และตารางที่ 9)



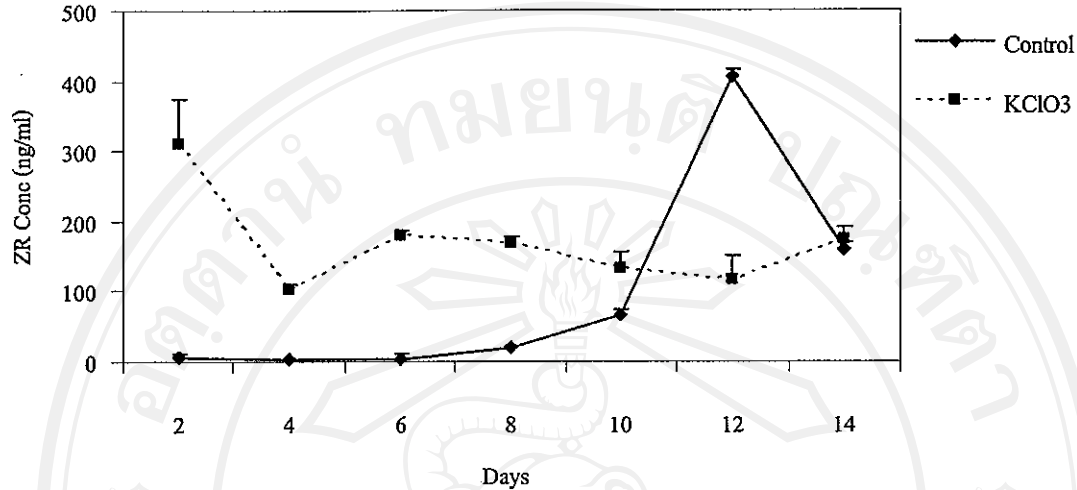
ภาพที่ 23 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ในราก หลังกรรมวิธี

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ในราก หลังกรรมวิธี

กรรมวิธี	ปริมาณ ZR (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)						
	จำนวนวันหลังทำการทดลอง						
	2	4	6	8	10	12	14
ราดสาร KClO <sub>3</sub>	1059.20	1370.5	1173.50	1600.00	380.28	1600.00	713.70
ไม่ราดสาร KClO <sub>3</sub>	576.96	345.84	1056.10	1367.50	795.04	1582.00	585.96
T-test	*	*	ns	*	*	ns	*

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ZR จาก xylem sap พบว่า หลังจากราดสารโพแทสเซียมคลอเรต ทำให้ปริมาณ ZR เพิ่มขึ้นมากกว่าการไม่ได้ราดสาร โดยพบปริมาณ ZR เพิ่มขึ้นในวันที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นที่ไม่ได้ราดสาร (ภาพที่ 24 และตารางที่ 10)



ภาพที่ 24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ใน xylem sap หลังกรรมวิธี

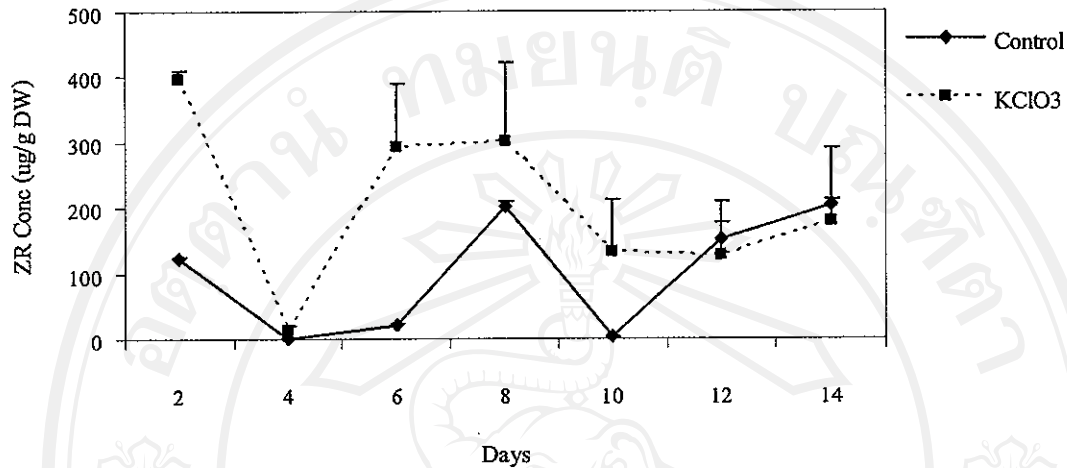
ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ใน xylem sap หลังกรรมวิธี

กรรมวิธี	ปริมาณ ZR (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)						
	จำนวนวันหลังทำการทดลอง						
	2	4	6	8	10	12	14
ราดสาร KClO <sub>3</sub>	307.67	102.18	176.93	167.93	130.51	113.60	172.65
ไม่ราดสาร KClO <sub>3</sub>	6.20	2.00	3.95	19.02	65.50	405.20	158.00
T-test	*	*	*	*	*	*	ns

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ZR จากใบ พบว่า หลังจากการราดสาร โพแทสเซียมคลอเรต ทำให้ปริมาณ ZR เพิ่มขึ้นมากกว่าการไม่ได้ราดสาร โดยพบปริมาณ ZR เพิ่มขึ้นในวันที่ 2, 6 และ 10 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับต้นที่ไม่ได้ราดสาร (ภาพที่ 25 และตารางที่ 11)



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ในใบ หลังกรรมวิธี

ตารางที่ 11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ในใบ หลังกรรมวิธี

กรรมวิธี	ปริมาณ ZR (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)						
	จำนวนวันหลังทำการทดลอง						
	2	4	6	8	10	12	14
ราดสาร KClO <sub>3</sub>	394.80	10.42	292.13	300.00	129.84	124.63	176.60
ไม่ราดสาร KClO <sub>3</sub>	122.18	0.85	20.25	200.00	1.80	150.00	202.12
T-test	*	ns	*	ns	*	ns	ns

หมายเหตุ : เปรียบเทียบความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %