

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการ

#### ก. สถานที่ทำการวิจัย

1. หมู่บ้านสวนตาล หมู่บ้านเมืองเลน และหมู่บ้านดอนแก้ว ตำบลในเวียง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตน่าน

#### ข. อุปกรณ์

1. เครื่องวัดความหวาน (ATAGO Hand sugar refractometer)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า
3. เวอร์เนีย แคลิเปอร์
4. กระดาษเทียบสี (Methuen handbook of colour)
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 N
6. ฟีนอล์ฟทาลีน 0.1 เปอร์เซ็นต์
7. สารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol-natrium
8. สารละลาย metaphosphoric acid 4 เปอร์เซ็นต์
9. กรดแอสคอร์บิก
10. ขวดรูปชมพู่
11. บิวเรตและชาหยั่ง
12. กล้องจุลทรรศน์ที่ติดตั้งกล้องถ่ายรูป
13. ปีกเกอร์ขนาด 50 มล. และ 100 มล.
14. สารละลาย p-dichlorobenzene (PDB) ที่อิ่มตัวในน้ำ
15. กรดเกลือ ความเข้มข้น 1 N
16. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
17. สีย้อม orcein

18. ป้ายกระดาษสำหรับทำเครื่องหมาย
19. ปากคืบ
20. เข็มเขี่ย
21. แวนชยาย
22. ตลับเมตร
23. Farmer's fluid

ค. วิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 **สำเนาวิชาของมะไฟจีน**

ใช้ต้นมะไฟจีนที่มีอายุและขนาดทรงพุ่ม ที่ใกล้เคียงกัน จำนวน 12 ต้น จากทั้ง 3 หมู่บ้าน หมู่บ้านละ 4 ต้น โดยให้สัญลักษณ์  $R_1$ ,  $R_2$  และ  $R_3$  แทนหมู่บ้าน สวนตาล ตอนแก้ว เมืองเลน ตามลำดับ และ  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  และ  $T_4$  แทนต้นที่ใช้เป็นตัวอย่าง เพื่อศึกษาลักษณะทางสำเนาวิชาของมะไฟจีน เริ่มทำการบันทึกข้อมูลตั้งแต่ 1 พฤศจิกายน 2535 โดยใช้หลักในการศึกษาตามคู่มือการบรรยายรายละเอียดของพืชตระกูลส้ม (IBPGR, 1988) และพจนานุกรมวิธานของเพพร (2526) ลักษณะต่าง ๆ ที่ศึกษามีดังนี้

1. นิสัยการเจริญเติบโต ได้แก่ลักษณะการเจริญเติบโต ความสูงของทรงพุ่ม ความกว้างของทรงพุ่ม รูปร่างของทรงพุ่ม และความหนาแน่นของทรงพุ่ม
2. ลำต้น ได้แก่ ลักษณะลำต้น ลักษณะเนื้อไม้ และเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น
3. ใบ ได้แก่ ประเภทของใบ การเรียงตัวของใบ ความกว้างและความยาวของใบประกอบ ความยาวของก้านใบประกอบ จำนวนใบย่อย ความกว้างและความยาวของใบย่อย และความยาวของก้านใบย่อย รูปร่างของใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบ ผิวใบ และเนื้อใบ
4. ดอก ได้แก่ ตำแหน่งของช่อดอก ชนิดของช่อดอก จำนวนดอกย่อยต่อช่อ ขนาดของดอกที่เล็กที่สุดและดอกบานเต็มที่ ชนิดของดอก การจัดตำแหน่ง ความสัมพันธ์ ขนาด สี และจำนวนขององค์ประกอบของดอก ซึ่งประกอบด้วยกลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย

5. ผล ได้แก่ ชนิดของผล รูปร่างของผลและการเปลี่ยนสีของผิวเปลือก ตั้งแต่อายุ 1 เดือนจนกระทั่งผลแก่ อายุ 4 เดือน
6. เมล็ด ได้แก่ จำนวนเมล็ดต่อผล รูปร่างลักษณะของเมล็ด ขนาดของเมล็ด สีของเมล็ด และส่วนประกอบของเมล็ด

## การทดลองที่ 2 การเจริญเติบโตของมะไฟจีน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยใช้ต้นมะไฟจีนจำนวน 12 ต้น ซึ่งเป็นชุดเดียวกับการทดลองที่ 1 สุ่มทำเครื่องหมายต้นละ 8 ช่อ ในแต่ละช่อทำเครื่องหมายดอกไว้ 20 ดอก แล้วศึกษาสรีรวิทยาทางการสืบพันธุ์ ของมะไฟจีน ได้แก่ การเจริญเติบโตของดอก การเจริญเติบโตของผล และการงอกของเมล็ด

### การเจริญเติบโตของดอก

ศึกษาช่วงเวลาต่างๆ เพื่อบ่งบอระยะเวลาของการเจริญเติบโตของดอก เริ่มศึกษาตั้งแต่เป็นดอกขนาดเล็กที่สุดที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า จนกระทั่งเป็นผลแก่ โดยสังเกตและบันทึกข้อมูลดังนี้

1. ช่วงเวลาการออกดอก บันทึกช่วงเวลาเริ่มออกดอก นับจำนวนช่อดอกที่เกิดขึ้นในแต่ละสัปดาห์ และช่วงเวลาที่ใช้ในการแทงช่อดอกหมดทั้งต้น
2. ช่วงเวลาตั้งแต่ออกดอกถึงดอกบานเต็มที่ โดยการติดป้ายเล็ก ๆ ที่ก้านดอก นับจำนวนวันที่ดอกมีขนาดเล็กที่สุดที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ถึงวันที่ดอกบานเต็มที่ ดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ของทั้งช่อ และดอกบานทั้งช่อ
3. ช่วงเวลาที่พร้อมผสมของเกสรตัวเมีย โดยการสัมผัสช่อดอกที่อยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของทรงพุ่ม นับตั้งแต่วันที่เริ่มเห็นดอกย่อยบานประปรายจนกระทั่งถึงเวลาที่พร้อมผสม ใช้แว่นขยายส่องดูที่ยอดเกสรตัวเมีย สังเกตยอดเกสรตัวเมียที่พร้อมผสมจะปลดปล่อยของเหลวลักษณะเหนียว ๆ ออกมา (Soost and Cameron, 1975)

4. ช่วงเวลาที่พร้อมผสมของเกสรตัวผู้ ศึกษาในทำนองเดียวกับการพร้อมผสมของเกสรตัวเมีย เพียงแต่ใช้แว่นขยายส่องดูการแตกของอับเกสรเท่านั้น (Soost and Cameron, 1975)

5. ช่วงเวลาตั้งแต่ดอกบานเต็มที่ถึงติดผล โดยการตัดป้ายเล็ก ๆ ที่ก้านดอกย่อยที่บานเต็มที่ นับจำนวนวันตั้งแต่ดอกบานเต็มที่ถึงติดผล ซึ่งสังเกตได้จากการเหี่ยวและร่วงไปของกลีบดอก และเกสรตัวผู้ ส่วนกลีบเลี้ยงและเกสรตัวเมียยังติดอยู่บนก้านดอก

6. ช่วงเวลาตั้งแต่ดอกบานเต็มที่ถึงผลแก่ โดยการนับจำนวนวันต่อจากข้อ 2 จนกระทั่งผลแก่

#### การเจริญเติบโตของผล

ศึกษาข้อมูลทางกายภาพและชีวเคมี เพื่อบ่งบอกระยะของการเจริญเติบโตของผล ทำโดยเก็บผลมะไฟจันทน์จากดอกที่ทำเครื่องหมายไว้ จากต้นมะไฟจันทน์ทุกต้น ต้นละ 10 ผลต่อครั้ง โดยเริ่มเก็บครั้งแรกหลังจากดอกบาน 1 เดือน และเก็บทุกเดือน เดือนละ 1 ครั้ง จนกระทั่งผลแก่เต็มที่ โดยบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ดังนี้

1. น้ำหนักสด โดยชั่งผลบนเครื่องชั่งละเอียด บันทึกน้ำหนักสด มีหน่วยเป็นกรัม
2. ปริมาตรของผล โดยการแทนที่น้ำ บันทึกปริมาตรของผล มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร
3. ความหนาแน่นของผล โดยคำนวณจากน้ำหนักสดและปริมาตรของผล มีหน่วยเป็นกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สูตร

$$\text{ความหนาแน่นของผล} = \frac{\text{น้ำหนักสดของผล}}{\text{ปริมาตรของผล}}$$

4. ความยาวของผล โดยวัดบริเวณส่วนที่ยาวที่สุดของผลด้วยเวอร์เนียแคลิเปอร์ บันทึกความยาวของผล มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

5. เส้นผ่าศูนย์กลางของผล โดยวัดบริเวณส่วนที่กว้างที่สุดของผลด้วยเวอร์เนียแคลิเปอร์ บันทึกเส้นผ่าศูนย์กลางของผล มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

6. ดัชนีรูปร่างของผล โดยคำนวณได้จากความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางของผล ตามวิธีของ Cohen *et al.* (1972) และ Mc Donald and Hillebrand (1980) ตามสูตร

$$\text{ดัชนีรูปร่างของผล} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของผล}}{\text{ความยาวของผล}}$$

7. ปริมาณกรดรวม (Total Acids; TA) โดยนำน้ำคั้นจากผลมะไฟจันทมาไทเตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นตัวชี้ความสมมูลของกรดและต่างมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณกรดรวม มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยใช้สูตร

$$\% \text{ acid} = \frac{(N \text{ base}) \times (\text{ml base}) \times (\text{meq.wt. citric}) \times 100}{(\text{ml juice})}$$

N base = Normality ของสารละลายต่างมาตรฐาน

ml base = จำนวนมิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ในการไทเตรต

meq.wt. ของกรดซิตริก = 0.06406

8. ปริมาณรวมของ ของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids ; TSS) โดยใช้ hand refractometer มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์บริกซ์

9. ปริมาณวิตามินซี โดยใช้ Tincturimetric method (ณัฐ, 2522 ; Collins and Webb, 1979) บันทึกปริมาณวิตามินซี มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

10. สีของผิวเปลือกของผล โดยนำมาเทียบสีกับแผ่นเทียบสีมาตรฐาน Methuen Handbook of Colour (Kornerup and Wanscher, 1981)

11. จำนวนผลต่อช่อ โดยการนับจำนวนผลต่อช่อเมื่อผลแก่แล้ว

12. จำนวน น้ำหนักและปริมาตรของเมล็ด โดยนับจำนวนเมล็ดทั้งหมดในผล แยกเมล็ดที่ลีบและเมล็ดปกติออกจากกัน ชั่งน้ำหนักสดของเมล็ด บันทึกน้ำหนักของเมล็ด มีหน่วยเป็นกรัม และบันทึกปริมาตรของเมล็ด มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร

13. การงอกของเมล็ด แกะเมล็ดมะไฟจันทออกจากผลที่สุก นำมาเพาะทันที ในซีเล้า แกลบผสมทรายละเอียด อัตราส่วน 1 : 1 เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การงอก จำนวน และลักษณะของต้นกล้าชงอก

### การทดลองที่ 3 เซลล์พันธุกรรมของมะไฟจีน

ทำสไลด์เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากมะไฟจีน ตามวิธีการของกวูดล (2528) ดังต่อไปนี้

- ก. การเตรียมปลายรากพืช ใช้ปลายรากของต้นกล้ามะไฟจีน ที่เพาะจากเมล็ด ตัดปลายรากบริเวณที่มีสีขาวชุ่น ยาว 2-3 มิลลิเมตร นำปลายรากไปทำการ pretreat โดยแช่ปลายรากในสารละลายของ p-dichlorobenzene ที่อุณหภูมิ 12-16°C นาน 2-3 ชั่วโมง สารละลายดังกล่าว มีผลทำให้นิวเคลียสหยุดชะงักการแบ่งเซลล์ในระยะเมตาเฟส
- ข. การตรึงเซลล์ หลังจาก pretreat แล้ว นำปลายรากไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพ สูตร Farmer's fluid นาน 12 ชั่วโมง
- ค. การแช่ย่อย นำปลายรากที่แช่ในน้ำยารักษาสภาพแล้ว ไปแช่ใน 1 N HCl ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า (Dyer, 1979)
- ง. การย้อมสี นำปลายรากวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดและหยดสี orcein ลงไป 1-2 หยด ใช้เข็มเขี่ยเซลล์ให้แตกกระจายมากๆ ในขณะที่เดียวกันเอาชิ้นส่วนของรากที่มีขนาดใหญ่ออกบ้าง วางกระจกปิดสไลด์ปิดทับลงไป แล้วใช้นิ้วหัวแม่มือกดขยี้ลงบนกระจกปิดสไลด์เบาๆ เพื่อให้เซลล์แบนแนบติดแผ่นสไลด์และทำให้เซลล์กระจายตัวมากขึ้น แล้วนำไปศึกษาและถ่ายรูปใต้กล้องจุลทรรศน์