บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ดอกส้มโชกุนจากต้นที่มีอายุ 8 ปี

2. อุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างดอก

2.1 กรรไกรขนาดเล็ก

2.2 หลอดแก้วขนาดเล็ก

3. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของดอกด้วยวิธีพาราฟิน (paraffin method)

3.1 น้ำยาเอฟ เอ เอ (Formalin-Aceto-Alcohol: FAA) สูตร 2

3.2 พาราฟิน (paraffin)

3.3 Haupt's adhesive

3.4 ฟอร์มาลิน (formalin) 3 เปอร์เซ็นต์

3.5 ไซลีน (xylene)

3.6 สีซาฟรานิน (safranin)

3.7 สีฟาทส์กรีน (fast green)

3.8 สีฮีมอะลัม (hemalum) สูตร Delafield's hematoxylin

3.9 โคลฟออย (clove oil)

3.10 เพอร์เม้าท์ (permount)

3.11 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บดอก

3.12 ตู้หลอมพาราฟิน (paraffin oven)

3.13 เครื่องฝังพาราฟิน (paraffin embedding center)

3.14 ปากคีบ บีกเกอร์และเข็มเขี่ย

3.15 ถ้วยสำหรับฝังชิ้นส่วนพืช (embedding ring molds)

3.16 เครื่องตัดเนื้อเยื่อชนิดล้อหมุน (rotary microtome)

3.17 เครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ (slide warmer)

3.18 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (coplin jars)

3.19 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์

3.20 กล่องเก็บสไลด์

4. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเรณูด้วยวิธีอะซีโตไลซีส (acetolysis method)

4.1 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide)

4.2 กรดอะซีติกเข้มข้น (conc. acetic acid)

4.3 สารละลายอะซีติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride)

4.4 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. sulfuric acid)

4.5 เอธิลแอลกอฮอร์ 100 เปอร์เซ็นต์ (absolute alcohol)

4.6 น้ำมันซิลิโคน (silicone oil)

4.7 บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

4.8 ถ้วยกรอง

4.9 หลอดทดลองชนิดก้นแหลม (centrifuge tube)

4.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

4.11 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บเรณู

5. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการศึกษาความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธี Fluorochromatic Reaction (FCR) Test

5.1 สารฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (fluorescein diacetate)

5.2 อะซีโตน (acetone)

5.3 น้ำตาลซูโครส (sucrose)

5.4 จานแก้ว เข็มเขี่ย ปากคีบและหลอดหยด

6. อุปกรณ์สำหรับการวัดปริมาตรและความเข้มข้นของน้ำหวาน

6.1 หลอดแก้วขนาดเล็ก (microcapillary tubes) ความจุ 5 ไมโครลิตร

6.2 Hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO มีช่วงความเข้มข้น 0-32% Brix.

7. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการศึกษาแมลง

7.1 เอธิลอะซีเตต (ethyl acetate)

7.2 สวิงจับแมลง

7.3 ขวดแก้วขนาดเล็กและใหญ่สำหรับสลบแมลง

7.4 เข็มเซ็ตแมลงเบอร์ 1 และ 3

7.5 ตู้อบแมลง

8. อุปกรณ์สำหรับการบันทึกข้อมูลและภาพถ่าย

8.1 Ocular และ stage micrometer

8.2 ฟิล์มสี ความไวแสง 100 และ 400 เท่า

8.3 กล้องถ่ายรูป

8.4 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพร้อมอุปกรณ์บันทึกภาพ

8.5 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) รุ่น JSM-5800 LV พร้อมอุปกรณ์บันทึกภาพ

8.6 กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent microscope) พร้อมอุปกรณ์บันทึกภาพ

8.7 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

วิธีดำเนินการ

1. กำหนดพื้นที่ศึกษา

เลือกพื้นที่ปลูกส้มโชกุน ตำบลคลองหอยโข่ง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา ในพื้นที่ 1 ไร่ 1 งาน ส้มโชกุนในแปลงนี้มีอายุต้น 8 ปี จำนวน 140 ต้น มีการให้น้ำระบบน้ำหยดให้ทั้งปุ๋ยคอกและปุ๋ยเคมี (สูตร 13-13-21 และ 0-0-50) ปีละ 2 ครั้ง

2. วิธีการศึกษาและการเก็บข้อมูล

2.1 ศึกษาลักษณะโครงสร้างดอก

โดยดูจากดอกที่บานเต็มที่และดูส่วนต่างๆ ของดอกทุกส่วน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ บันทึกลักษณะของพืชโดยวาดภาพแบบลายเส้นและภาพถ่าย

2.2 ศึกษาการเจริญของดอก

2.2.1 ศึกษาระยะการเจริญของดอก โดยออกสำรวจดอกส้มโชกุนในเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน 2544 โดยทำการคัดเลือกต้นส้มโชกุนในแปลงปลูกจำนวน 4 ต้นที่มีขนาดของดอกใกล้เคียงกันและมีระยะความห่างระหว่างต้นที่สะดวกในการเก็บข้อมูล เมื่อได้ต้นแล้วจึงทำการเลือกช่อดอก 10 ช่อดอกทุกทิศซึ่งเป็นดอกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร (ดอกระยะที่ 1) จำนวน 40 ดอกต่อ 1 ต้น พร้อมทำเครื่องหมายและบันทึกการเจริญของดอกที่เวลา 8.00 นาฬิกา โดยการสังเกตรูปร่างดอก ขนาดของดอก (วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความยาวเฉลี่ยของกลีบดอกด้วยเวอร์เนีย) สีของกลีบเลี้ยงกลีบดอกที่เปลี่ยนไปและการกระจายของต่อมน้ำมันที่ผิวด้านนอกของกลีบดอกไปจนกระทั่งดอกบานเต็มที่และบันทึกภาพไว้

2.2.2 ศึกษาช่วงเวลาการบานของดอก โดยศึกษาการบานของดอกในวันต่างๆ และช่วงเวลาต่างๆ ในรอบวัน ทำการเก็บข้อมูลในเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน 2544 จากช่อดอกเดียวกันกับการศึกษาระยะการเจริญของดอกและแบ่งการบันทึกข้อมูลออกเป็นสองส่วนคือ

ส่วนแรก บันทึกจำนวนดอกบานแต่ละวัน ตั้งแต่วันแรกที่ดอกแรกในช่อดอกนั้นบานจนถึงวันที่ดอกสุดท้ายในช่อดอกนั้นบาน โดยทำการบันทึกข้อมูลที่เวลา 16.00 นาฬิกาของแต่ละวันแล้วนำข้อมูลจำนวนดอกบานของแต่ละต้นในแต่ละวันมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ส่วนที่สอง บันทึกข้อมูลจำนวนดอกบานที่ระยะเวลาต่างๆ ในรอบวันตั้งแต่ 8.00, 10.00, 12.00, 14.00 และ 16.00 นาฬิกา แล้วนำข้อมูลจำนวนดอกบานในแต่ละต้นในช่วงเวลาต่างๆ มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

Central Library
Prince of Songkla University

2.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างดอกส่วนต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เก็บดอกในระยะการเจริญที่ 1 ถึง 8 มาแช่ในน้ำยารักษาสภาพสำหรับดอก (ภาคผนวก 1) แล้วจึงผ่านการทำให้ดอกแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง (Critical Point Drier: CPD) ก่อนที่จะนำดอกไปติดบนแท่นติดตัวอย่าง (stubs) พร้อมกับนำไปฉาบด้วยทองคำ แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พร้อมบันทึกภาพ

2.4 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของดอกด้วยวิธีพาราฟิน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Johansen (1940)

2.4.1 นำดอกระยะต่างๆ แช่ในน้ำยาเอฟ เอ เอ สูตร 2 (ภาคผนวก 1) อย่างน้อย 18 ชั่วโมง แล้วจึงขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วย ethyl-butyl alcohol series (ภาคผนวก 1) ที่ระดับ 5 ถึง 12 ระดับละ 2 ชั่วโมง

2.4.2 เทพาราฟินที่หลอมตัวอยู่ในตู้หลอมพาราฟินที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวของพาราฟินเล็กน้อย) ลงในหลอดแก้วประมาณ 1 ใน 3 ส่วนแล้วปล่อยทิ้งไว้จนพาราฟินแข็งตัว จากนั้นจึงเทน้ำยาระดับที่ 12 พร้อมด้วยดอกลงบนพาราฟินที่แข็งตัวแล้วด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำหลอดแก้วไปเก็บในตู้หลอมพาราฟินทันที ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงจึงเปลี่ยนพาราฟินใหม่ ทำเช่นนี้ทุก 2 ชั่วโมงประมาณ 3-4 ครั้ง พาราฟินจะแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ (infiltration) จากนั้นจึงนำดอกมาฝังลงในพาราฟินด้วยเครื่องฝังพาราฟิน

2.4.3 นำเนื้อเยื่อมาตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อชนิดล้อหมุน ให้เนื้อเยื่อมีความหนา 10 ถึง 15 ไมโครเมตร แล้วนำริบบอน (paraffin ribbons) วางบนแผ่นสไลด์ (affixing) โดยใช้ Haupt's adhesive และฟอร์มาลิน 3 เปอร์เซ็นต์ แล้ววางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วันหรือจนกระทั่งแผ่นสไลด์แห้งสนิท จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อบนสไลด์มาละลายพาราฟินออก (deparaffinization) (ภาคผนวก 1)

2.4.4 ย้อมสี (staining) เนื้อเยื่อที่โครงสร้างส่วนต่างๆ ของดอกด้วยวิธีการย้อม 2 สี 2 แบบ นั่นคือ การย้อมสีซาฟรานิน ฟาส์ทกรีน (safranin-fast green staining) และการย้อมสีซาฟรานิน ฮีมอะลัม (safranin-hemalum) สูตร Delafield's hematoxylin (ภาคผนวก 1)

2.4.5 ศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อและบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2.5 ศึกษาการเจริญของเรณู

2.5.1 ศึกษาการเจริญของเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ด้วยการบันทึกภาพการเจริญของเรณูในดอกระยะที่ 1 ถึง 8 หากพบเรณูที่เจริญเต็มที่ให้บันทึกข้อมูลเพิ่มเติมในส่วนของรูปร่าง (shape) ความยาวของแกนระหว่างขั้ว (Polar axis: P) ความยาวของแกนตามแนวเส้นศูนย์สูตร (Equatorial axis: E) ความหนาของผนังชั้นนอกและขนาดของเรณู (size) (ภาคผนวก 2)

2.5.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเรณูด้วยวิธีอะซีโตไลซีส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Erdtman (1971)

2.5.2.1 นำดอกส้มโชกุนในระยะการเจริญที่ 1 ถึง 8 มาแยกเอาเฉพาะเกสรเพศผู้ใส่ลงในบีกเกอร์ แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ลงไป 10 มิลลิเมตร นำไปต้มให้เดือดนานประมาณ 5 นาทีเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่อาจติดมา

2.5.2.2 นำของเหลวนี้มากรองด้วยถ้วยกรองและทิ้งกากไป เก็บส่วนที่เป็นของเหลวไว้ในหลอดทดลองก้นแหลม แล้วนำหลอดทดลองเข้าเครื่องปั่นความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาทีจึงเทของเหลวทิ้ง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ถึง 3 ครั้งเพื่อให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์หมดไป โดยเติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองแล้วนำหลอดทดลองเข้าเครื่องปั่นๆ นานครั้งละ 2 นาทีจึงเทน้ำทิ้ง

2.5.2.3 เติมกรดอะซีติกเข้มข้นลงไป 10 มิลลิเมตร แล้วนำหลอดทดลองเข้าเครื่องปั่นๆ นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้งเพื่อกำจัดน้ำออกให้หมด

2.5.2.4 เติม acetolysis mixture (ประกอบด้วยกรดอะซีติกแอนไฮไดรด์และกรดซัลฟูริกเข้มข้น ในอัตราส่วน 4.5 ต่อ 0.5 โดยปริมาตร) จากนั้นจึงนำหลอดทดลองเข้าเครื่องปั่นๆ นาน 1 นาที เทสารละลายออก (โดยเทสารละลายนี้ใส่ขวดเฉพาะเพื่อนำไปกำจัดทิ้งภายหลัง)

2.5.2.5 เติมกรดอะซีติกเข้มข้นแล้วนำเข้าเครื่องปั่นนาน 1 นาที เทน้ำยาทิ้ง

2.5.2.6 ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ถึง 3 ครั้ง นำเข้าเครื่องปั่นนาน 1 นาที เทน้ำกลั่นทิ้ง

2.5.2.7 ดึงน้ำออกด้วยเอธิลแอลกอฮอร์ 30, 50, 70, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับด้วยการนำเข้าเครื่องปั่นนานระดับละ 1 นาที เทเอธิลแอลกอฮอร์ทิ้ง

2.5.2.8 เติมสารละลายเบนซีนประมาณ 1 ถึง 2 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้ว เทสารละลายทั้งหมดลงในหลอดเก็บเรณู ทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนที่จะเติมน้ำมันซิลิโคนลงไปในหลอดเก็บเรณู

2.5.2.9 นำเรณูที่เก็บไว้ในขวดเก็บเรณูมาทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้ง แล้วนำไปติดบนแท่นติดตัวอย่างพร้อมกับนำไปฉาบด้วยทองคำ บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2.6 ศึกษาในดอกระยะที่บานเต็มที่

2.6.1 ศึกษาความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธี Fluochromatic Reaction (FCR) Test ดัดแปลงจากวิธีการของ Heslop-Harrison และ Heslop-Harrison (1970)

2.6.1.1 เลือกดอกที่บานเต็มที่ขนาดเท่าๆ กัน จาก 4 ต้นๆ ละ 10 ดอก รวม 40 ดอก นำมาไว้ในจานแก้วที่สะอาด

2.6.1.2 ตัดเฉพาะส่วนของอับเรณูของทุกดอกๆ ละ 2 อับเรณู รวม 80 อับเรณู มาทดสอบความมีชีวิตหลังจากที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ โดยที่เวลาหนึ่งๆ นั้นกำหนดให้มีการทำซ้ำจำนวน 10 ซ้ำๆ ละ 8 อับเรณู

2.6.1.3 ขยี้อับเรณูบนสไลด์ แล้วนำสารละลายฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (สีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต 2 มิลลิกรัมผสมกับอะซีโตน 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายนี้ในที่มืด โดยเก็บใส่ขวดสีชาที่หุ้มกระดาษฟอยด์และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ผสมกับสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ หยดสารละลายบนสไลด์แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้นาน 5 ถึง 10 นาทีเพื่อให้โมเลกุลของสีซึมผ่านผนังเรณูเข้าสู่ไซโทพลาซึม เรณูที่ยังคงมีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ไปตัดกับโมเลกุลของสี ทำให้เกิดการเรืองแสงสีเขียวหรือสีเหลืองอมเขียว และเรณูที่ไม่มีชีวิตจะไม่เรืองแสง (Shivanna and Rangaswamy, 1993) ซึ่งสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซ็นซ์ที่ excition filter 450 ถึง 490 นาโนเมตรและ barrier filter 520 นาโนเมตร

2.6.1.4 สุ่มนับจำนวนเรณูในแต่ละสไลด์ให้อยู่ในช่วง 250 ถึง 350 เรณูขึ้นไป รวม 10 จุดต่อสไลด์ (Thomson *et al.*, 1994) แล้วนำจำนวนที่นับได้ในแต่ละสไลด์มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อคิดเปอร์เซ็นต์ที่ชั่วโมงต่างๆ กัน จากนั้นจึงเปรียบเทียบค่าความมีชีวิตของเรณูที่เก็บรักษาไว้ที่ชั่วโมงต่างๆ

2.6.2 ปริมาตรและความเข้มข้นของน้ำหวาน ทำการศึกษาช่วงที่ส้มโชกุนมีการออกดอกในเดือนมีนาคม 2545 โดยคัดเลือกต้นและดอกที่บานจำนวน 6 ต้นๆ ละ 10 ดอก รวม 60 ดอก แล้วทำการวัดปริมาตรน้ำหวานด้วยหลอดแก้วขนาดเล็กที่มีความจุ 5 ไมโครลิตร ดูดน้ำหวานตรงตำแหน่งระหว่างกลีบดอกกับเกสรเพศผู้ในช่วงเวลาห่างกันทุก 1 ชั่วโมงตั้งแต่เวลา 8.00 ถึง 16.00 นาฬิกา โดยวัดปริมาตรน้ำหวานจากต่างดอกบนต้นเดียวกันและต่างต้นแล้วนำปริมาตรน้ำหวานที่วัดได้นำมาหาค่าเฉลี่ยต่อดอก ส่วนความเข้มข้นของน้ำหวาน วัดจากการนำปริมาตรน้ำหวานที่วัดได้ในแต่ละช่วงเวลามาหาช่วงความเข้มข้นของน้ำหวานด้วยเครื่องมือ hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO มีช่วงความเข้มข้น 0-32% Brix.

2.7 ศึกษาชนิดแมลงที่เข้ามาเยี่ยมดอกส้มโชกุน

โดยสังเกตชนิดแมลงที่เข้ามาที่ดอกส้มโชกุน ในเวลาช่วงก่อนดอกบานสูงสุด (8.00-9.00 น.) ช่วงที่ดอกบานสูงสุด (9.00-11.00 น.) และช่วงหลังจากที่ดอกบานสูงสุด (หลัง 11.00 น.) แล้วใช้สวิงดักจับใส่ในขวดสลบแมลงที่เติมน้ำยาเอธิลอะซีเตต เพื่อนำไปตรวจจำแนกอันดับและชนิด ด้วยเอกสารอ้างอิงทางด้านอนุกรมวิธานของแมลง