บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. ต้นส้มจุกที่ปลูกด้วยกิ่งตอนอายุ 6 ปี จำนวน 20 ต้น ปลูกอยู่ในแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และแปลงปลูกเกษตรกร ในพื้นที่บ้านโฮ๊ะ หมู่ที่ 5 ตำบลทุ่งตำเสา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
2. อุปกรณ์และสารเคมีศึกษาลักษณะดอก ได้แก่ น้ำยาคงสภาพ เอฟ เอ เอ สูตร 2 (ประกอบด้วย เอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซีติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และฟอร์มาลินในอัตราส่วน 18:1:1) กรรไกรขนาดเล็ก หลอดแก้วขนาดเล็ก ขวดแก้วขนาดเล็ก ปากคีบ เข็มเขี่ย
3. อุปกรณ์และสารเคมีศึกษาลักษณะและจำนวนเรณู ได้แก่ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซค์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำกลั่น กรดอะซีติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ อะซีติกแอนไฮไดรด์ผสมกับซัลฟิวริกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ เอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเบนซีน น้ำยาคงสภาพ เอฟ เอ เอ สูตร 2 บีกเกอร์ ถ้วยกรอง หลอดแก้วก้นแหลม เครื่องหมุนเหวี่ยง แท่งแก้ว ขวดเก็บเรณู แป้นทองเหลือง โถดูดความชื้น ไมโครสไลด์ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด
4. อุปกรณ์และสารเคมีศึกษาความมีชีวิตของเรณู ได้แก่ สีอะซีโตคาร์มีน จานเพาะเชื้อ แผ่นสไลด์หลุม กระจกปิดสไลด์ และกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
5. อุปกรณ์และสารเคมีศึกษาการงอกของหลอดเรณู ได้แก่ น้ำยาคงสภาพคานอยส์ เอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 30 และ 70 เปอร์เซ็นต์ น้ำกลั่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.8 นอร์มอล สีอะนิลีนบลู กลีเซอรีนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ กรรไกร ถุงกระดาษ พู่กัน แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์ และกล้องจุลทรรศน์แบบปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์
6. อุปกรณ์และสารเคมีศึกษากายวิภาคดอก ได้แก่ เอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 75, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำยาคงสภาพ เอฟ เอ เอ สูตร 2 สีฟาร์ทกรีน ฟอร์มาลิน ไซลีน โคลฟ เพอร์เมาท์ กลีเซอรอล เบ้าหลอม เครื่องฝังพาราฟิน ตู้หลอมพาราฟิน บล็อกพลาสติก พาราฟิน เครื่องตัดเนื้อเยื่อชนิดล้อหมุน แผ่นสไลด์ เครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ ขวดแก้วสำหรับย้อมสี แป้นทองเหลือง โถดูดความชื้น กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

7. อุปกรณ์และสารเคมีศึกษาความพร้อมรับเรณูของเกสรเพศเมียและการถ่ายเรณู ได้แก่ กลีเซอรีนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ น้ำยาคงสภาพคานอยส์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.8 นอร์มอล สีอะนิลีนบลู เอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 30 และ 70 เปอร์เซ็นต์ พู่กัน กรรไกร ปากคีบ จานเพาะเชื้อ ถุงกระดาษ แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์ และกล้องจุลทรรศน์แบบปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์
8. อุปกรณ์และสารเคมีศึกษาชนิดและพฤติกรรมของแมลง ได้แก่ เอธิลอะซีเตต ยาสลบสำหรับแมลง ขวดแก้วขนาดเล็กและใหญ่สำหรับใส่แมลง สวิงจับแมลง เข็มเข็ตแมลง ตู้อบแมลง เอกสารทางอนุกรมวิธานทางแมลงเพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของแมลง กล้องถ่ายรูปดิจิตอล และฟิล์มสีความไวแสง 100 และ 400
9. อุปกรณ์และสารเคมีศึกษาน้ำหวานดอก ได้แก่ Mobile phase ที่ประกอบด้วย Acetonitrile กับ Deionized water สารละลายมาตรฐานของ กลูโคส ฟรุคโทส ซูโครส มอลโทส น้ำหวานดอกส้มจุก ถุงกระดาษ น้ำกลั่น หลอดแก้วขนาดเล็กความจุ 5 ไมโครลิตร hand refractometer มีช่วงความเข้มข้น 0-32 องศาบริกซ์ กระบอกตวง เครื่องชั่งสาร ช้อนตักสาร Temperature Column Reflective Index Detector Column Zorbax Carbohydrate 4.6 x 150 มิลลิเมตร 5 ไมครอน และเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) รุ่น Aqilent 1100

วิธีการ

1. การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาดอกส้มจุก

1.1 การออกดอกและลักษณะดอก

ทำการศึกษาการออกดอกและลักษณะดอกส้มจุกในช่วงเดือนออกดอกตามฤดูกาลออกดอกระหว่างเดือนมีนาคมถึงเมษายน พ.ศ. 2548 บันทึกสภาพอากาศในขณะที่ออกดอกและสังเกตตำแหน่งการออกดอกบนกิ่ง เก็บดอกต้นละ 5 ดอก เป็นจำนวนทั้งสิ้น 50 ดอก มาแช่ในน้ำยาคงสภาพ เอฟ เอ เอ สูตร 2 และทำการศึกษาลักษณะของดอก รูปร่าง สี จำนวน และส่วนประกอบของดอก

1.2 การบานของดอกและจำนวนดอก

ทำการศึกษาระยะเวลาการบานของดอกโดยบันทึกช่วงเวลาการบานของดอกตั้งแต่ดอกแรกจนถึงดอกสุดท้ายที่บานภายในต้นจำนวน 10 ต้น และช่วงเวลาที่ดอกบานสูงสุดภายในรอบวัน โดยนับจำนวนดอกที่บานทุกๆ ชั่วโมงตั้งแต่เวลา 7:00 ถึง 17:00 นาฬิกา ของแต่ละวันที่ดอกบานสูงสุด 3 วันติดต่อกัน โดยใช้กรรไกรขลิปกลีบดอกเพื่อเป็นเครื่องหมายดอกที่นับเสร็จแล้ว

1.3 การศึกษาเกสรเพศผู้

1.3.1 ลักษณะเรณู

เก็บดอกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง มาแยกเอาเฉพาะเกสรเพศผู้ใส่ลงในบีกเกอร์ แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไปจนท่วมตัวอย่าง (ประมาณ 10 มิลลิลิตร) ต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออก นำของเหลวจากการต้มมากรองผ่านถ้วยกรองลงในบีกเกอร์ แล้วนำของเหลวที่ได้ถ่ายลงหลอดแก้วก้นแหลม จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเอาเรณูออกด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนของเหลวทิ้งไป แล้วล้างตะกอนที่มีเรณูที่ก้นหลอดแก้วก้นแหลมโดยเทน้ำกลั่นลงไปแล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาที ล้างน้ำกลั่นซ้ำ 2-3 ครั้งเพื่อกำจัดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ทุกครั้งที่ล้างด้วยน้ำกลั่นให้นำหลอดแก้วก้นแหลมเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 2 นาที จึงเติมกรดอะซีติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดแก้วก้นแหลม เขย่า เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงนาน 2 นาที เทของเหลวทิ้งเพื่อกำจัดน้ำ แล้วเติมอะซีติกแอนไฮไดรด์ผสมกับซัลฟูริคเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมอะซีติกแอนไฮไดรด์ผสมกับซัลฟูริคเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สารละลายอะซีติกแอนไฮไดรด์ 4.5 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมกับซัลฟูริคเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ช้าๆ จน

ปริมาตรสารละลายเป็น 5 มิลลิลิตร การเตรียมสารละลายนี้จะต้องเตรียมแล้วใช้ทันทีไม่ควรเตรียมไว้นาน) จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วก้นแหลม แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงนาน 2 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วจึงเติมกรดอะซีติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดแก้วก้นแหลมแล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงนาน 2 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วกำจัดน้ำออกด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมเอธิลแอลกอฮอล์หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดแก้วก้นแหลมเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงนาน 2 นาที แล้วเทสารละลายที่ใสทิ้ง เรณูที่ได้ส่วนหนึ่งนำไปเก็บโดยเติมสารละลายเบนซีน ทิ้งให้แห้งสนิทแล้วนำไปใส่ในขวดเก็บรักษาสภาพด้วยน้ำมันซิลิโคน อีกส่วนหนึ่งทิ้งให้แห้งสนิทแล้วติดบนแป้นทองเหลือง แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น นำแป้นทองเหลืองที่มีเรณูที่แห้งไปฉาบผิวด้วยทองคำ บันทึกภาพเรณูพร้อมวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด และบรรยายลักษณะของเรณู

1.3.2 จำนวนเรณู

เก็บดอกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง ต้นละ 5 ดอก รวม 50 ดอก มาแช่ในน้ำยาคงสภาพเอฟ เอ เอ สูตร 2 คัดเฉพาะส่วนของอับเรณูของดอกละ 1 อับ รวม 5 อับ สุ่มอับเรณู 1 อับ แล้วใช้แท่งแก้วขยี้อับเรณูบนไมโครสไลด์แล้วหยดน้ำกลั่น นำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแล้วทำการนับจำนวนเรณูในแต่ละอับเรณู พร้อมกับบันทึกจำนวน โดยทำการนับ 5 ซ้ำต่ออับเรณู รวมทั้งหมด 10 อับ หาค่าเฉลี่ยของจำนวนเรณูต่อดอก

1.3.3 ความมีชีวิตของเรณู

เก็บดอกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง ต้นละ 5 ดอก รวม 50 ดอก คัดเฉพาะส่วนของอับเรณูของดอกๆ ละ 5 อับ รวม 250 อับ เก็บไว้ในจานเพาะเชื้อซึ่งวางไว้ในอุณหภูมิห้อง สุ่มอับเรณูมา 3 อับขยี้ลงบนแผ่นสไลด์หลุมโดยทำ 5 ซ้ำต่อช่วงเวลา จากนั้นหยดด้วยสีอะซีโตคาร์มีน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที ตามกำหนดเวลา 0, 3, 6, 9, 24 และ 48 ชั่วโมง นำเรณูที่ย้อมสีอะซีโตคาร์มีนไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วสุ่มนับจำนวนเรณูที่ติดสีและไม่ติดสีโดยนับ 5 จุดต่อ 1 สไลด์ บันทึกภาพเรณูที่ติดสีและไม่ติดสี นำค่าที่นับได้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต จากสูตร

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต = (จำนวนเรณูที่ติดสี/จำนวนเรณูทั้งหมด) x 100

1.3.4 การงอกของหลอดเรณู

ติดป้ายที่ดอกก่อนเริ่มบาน โดยกระทำ ณ เวลาต่างๆ 3 ซ้ำๆ ละ 5 ดอก รวม 15 ดอก คลี่กลีบดอกแล้วทำการตอนเกสรเพศผู้ โดยใช้กรรไกรขนาดเล็กตัดอับเรณูที่ยังไม่ปลดปล่อยเรณูออก แล้วจึงคลุมดอกด้วยถุงกระดาษและเมื่อถึงเวลาดอกบานเต็มที่ ให้ทำการถ่ายเรณูแบบผสมข้ามโดยใช้พู่กันที่มีเรณูสัมจุกจากดอกที่บานใหม่ๆ ต่างต้นกันมาป้ายบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมียเบาๆ ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการถ่ายเรณูให้เก็บดอกมาแล้วปลิดกลีบดอกทิ้งแล้วแช่เฉพาะเกสรเพศเมียไว้ในน้ำยาคงสภาพคานอยส์ จากนั้นเปลี่ยนมาแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70, 30 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกลั่นตามลำดับ ทุกขั้นตอนใช้เวลา 30 นาที จากนั้นแช่ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.8 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วจึงย้อมด้วยสีอะนิลีนบลูเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายในไตรโพแทสเซียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 นอร์มอล นาน 10 นาที แล้วตัดแยกส่วนเกสรเพศเมียออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กันและตัดแยกรังไข่ออกจากเกสรเพศเมีย นำแต่ละส่วนวางบนแผ่นสไลด์หยดด้วยกลีเซอรีนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์พร้อมกดเบาๆ แล้วนำไปตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นทำการนับจำนวนเรณูบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมีย หลอดเรณูในเกสรเพศเมียส่วนบน ส่วนกลาง ส่วนล่างและหลอดเรณูที่งอกเข้าไปที่ออวุลในรังไข่ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design : CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

1.4 การศึกษาเกสรเพศเมีย

1.4.1 กายวิภาค เนื้อเยื่อวิทยา และลักษณะปลายยอดเกสรเพศเมีย

นำดอกที่บานเต็มที่มาแยกเกสรเพศเมียออกมาเป็นตัวอย่าง นำตัวอย่างเกสรเพศเมียมาผ่านกระบวนการดึงน้ำ โดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 75, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เทพาราฟินที่หลอมให้ท่วมปลายยอดเกสรเพศเมีย แล้วจึงนำตัวอย่างเข้าตู้หลอมพาราฟินอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนพาราฟินใหม่อีก 2 ครั้ง ทุกๆ 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างวางลงในเบ้าหลอม พร้อมเทพาราฟินลงไป แล้วจัดตำแหน่งตัวอย่างตามยาวจากนั้นเอาบล็อกพลาสติกไปยึดกับพาราฟินในเบ้าหลอม ปล่อยให้เย็นแล้วแกะชิ้นตัวอย่างออกจากกัน นำตัวอย่างไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อชนิดล้อหมุนให้มีขนาดความหนา 6 ไมครอน นำริบบอนของตัวอย่างวางบนแผ่นสไลด์จนเนื้อเยื่อติดกับแผ่นสไลด์ดีแล้วนำแผ่นสไลด์ที่มีตัวอย่างมาผ่านกระบวนการละลายพาราฟินออก (ภาพผนวกประกอบที่ 1) ย้อมสีด้วยสีฟาร์ทกรีน (ภาพผนวกประกอบที่ 2) ศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อเกสรเพศเมีย พร้อมบันทึกภาพด้วย

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และศึกษาลักษณะปลายยอดเกสรเพศเมียโดยนำเกสรเพศเมียจากดอกบานเต็มที่ มาแช่ในน้ำยาคงสภาพ เอฟ เอ เอ สูตร 2 นำเกสรเพศเมียติดบนแป้นทองเหลือง แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น นำแป้นทองเหลืองที่มีเกสรเพศเมียที่แห้งไปฉาบผิวด้วยทองคำ บันทึกภาพเกสรเพศเมียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

1.4.2 ความพร้อมรับเรณูของเกสรเพศเมีย

ติดป้ายที่ดอกก่อนเริ่มบาน โดยกระทำ ณ เวลาต่างๆ 3 ซ้ำๆ ละ 5 ดอก รวม 15 ดอก คลี่กลีบดอกแล้วทำการตอนเกสรเพศผู้ โดยใช้กรรไกรขนาดเล็กตัดอับเรณูที่ยังไม่ปลด ปล่อยเรณูออก แล้วจึงคลุมดอกด้วยถุงกระดาษและเมื่อถึงเวลาดอกบานเต็มที่ไปแล้ว 0 ชั่วโมง ให้ทำการถ่ายเรณูแบบผสมข้ามโดยใช้พู่กันที่มีเรณูส้มจุกจากดอกที่บานใหม่ๆ ต่างต้นกันมาป้ายบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมียเบาๆ ที่เวลา 3, 6, 9, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากดอกบาน (ทำเช่นเดียวกับที่ 0 ชั่วโมง) เมื่อครบ 48 ชั่วโมง หลังการถ่ายเรณูให้เก็บดอกมาแล้วปลิดกลีบดอกทิ้งแล้วแช่เฉพาะเกสรเพศเมียไว้ในน้ำยาคงสภาพคานอยส์ จากนั้นเปลี่ยนมาแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกลั่นตามลำดับ ทุกขั้นตอนใช้เวลา 30 นาที และแช่ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.8 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 60 นาที แล้วจึงย้อมด้วยสีอะนิลีนบลูเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายในไตรโพแทสเซียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 นอร์มอล นาน 10 นาที แล้วตัดแยกส่วนเกสรเพศเมียออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กันและตัดแยกรังไข่ออกจากเกสรเพศเมีย นำแต่ละส่วนวางบนสไลด์หยดด้วยกลีเซอรีนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์พร้อมกดเบาๆ แล้วนำไปตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นทำการนับจำนวนเรณูบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมีย หลอดเรณูในเกสรเพศเมียส่วนบน ส่วนกลาง ส่วนล่างและหลอดเรณูที่งอกเข้าไปที่ออวุลในรังไข่ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design : CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s multiple range test (DMRT)

2. การศึกษาการถ่ายเรณูของส้มจุก

2.1 ผลของการถ่ายเรณูต่อการติดผล

การศึกษาผลของการถ่ายเรณูต่อการติดผลของส้มจุก โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) มี 3 ทรีตเมนต์ได้แก่ 1) การถ่ายเรณูแบบผสมข้ามด้วยมือ 2) การถ่ายเรณูแบบเปิดตามธรรมชาติ และ 3) ไม่มีการถ่ายเรณู วิธีการถ่ายเรณูแบบผสมข้ามด้วยมือกระทำโดยสุ่มและติดป้ายดอกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง จำนวน 10 บล็อกๆ ละ 10 ดอก รวม 100 ดอก คลี่กลีบดอกแล้วดึงเกสรเพศผู้ออกให้หมดจึงคลุมดอกด้วยถุงกระดาษ รอจนดอกบานเต็มที่ เมื่อดอกบานเต็มที่แล้ว ทำการถ่ายเรณูโดยใช้พู่กันที่มีเรณูจากดอกบานใหม่ๆ จากต่างต้นป้ายบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมียเบาๆ คลุมดอกด้วยถุงกระดาษเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเอาถุงกระดาษออก ส่วนการถ่ายเรณูแบบเปิดตามธรรมชาติ สุ่มและติดป้ายดอกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง จำนวน 10 บล็อกๆ ละ 10 ดอก รวม 100 ดอก ปล่อยให้มีการถ่ายเรณู ตามธรรมชาติ และไม่มีการถ่ายเรณู สุ่มและติดป้ายดอกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง จำนวน 10 บล็อกๆ ละ 10 ดอก รวม 100 ดอก คลี่กลีบดอกแล้วดึงเกสรเพศผู้ออกให้หมดแล้วคลุมดอกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเอาถุงกระดาษออก บันทึกจำนวนการติดผลทุกๆ สัปดาห์จนเก็บเกี่ยวผลผลิต

2.2 ชนิดและพฤติกรรมของแมลงในการถ่ายเรณู

สุ่มเลือกต้นส้มจุกที่อยู่ในระยะดอกบานเต็มที่ จำนวน 4 ต้น สังเกตพร้อมบันทึกชนิดและพฤติกรรมของแมลงที่เข้ามาเยือนดอกส้มจุกที่กำลังบานในแต่ละต้นในวันที่ดอกบานสูงสุด 3 วันติดต่อกัน โดยเก็บข้อมูล 20 นาทีแรกของทุกๆ ชั่วโมงตั้งแต่เวลา 7:00 ถึง 17:00 นาฬิกา ใช้สวิงจับแมลงที่เข้ามาเยือนดอกส้มจุกและทำให้แมลงสลบ จำแนกแมลงโดยแยกเป็นหมวดหมู่ว่าพบแมลงในกลุ่มใดบ้าง พร้อมบันทึกภาพแมลงที่จับมาได้

2.3 ปริมาณและองค์ประกอบน้ำหวานดอก

คัดและติดป้ายดอกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง ต้นละ 10 ดอก จำนวน 10 ต้น รวม 100 ดอก แล้วจึงคลุมดอกด้วยถุงกระดาษเพื่อป้องกันแมลงมาดูดน้ำหวาน จนดอกบาน วัดปริมาณน้ำหวานโดยสอดหลอดแก้วขนาดเล็กความจุ 5 ไมโครลิตร ตรงตำแหน่งกลีบดอกกับก้านชูเกสรเพศผู้ ทุกๆ 2 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 7:00 ถึง 17:00 นาฬิกา แล้วบันทึกผล นำปริมาณน้ำหวานที่เก็บได้หาความเข้มข้นด้วยเครื่องมือ hand refractometer ที่มีช่วงความเข้มข้น 0-32 องศาบริกซ์

นำน้ำหวานดอกไปวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำหวานด้วยวิธีการโครมาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) แล้วบันทึกผล