บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์การศึกษา

1. พืชทดลอง

ในการศึกษาใช้กระเจี๊ยบเขียว 3 สายพันธุ์คือ

1.1 พันธุ์ Hit 9701 ของบริษัทไดนามิคพันธุ์พืช จำกัด เป็นพันธุ์ลูกผสมรุ่นที่ 1 ผลิตในอินเดีย เป็นที่นิยมของบริษัทและเกษตรกรที่ผลิตเพื่อการส่งออก ผลผลิตสูงและค่อนข้างต้านทานต่อไวรัส

1.2 พันธุ์ของบริษัท Timfood เป็นพันธุ์ลูกผสมรุ่นที่ 1 ค่อนข้างต้านทานต่อไวรัส บริษัทจะนำเมล็ดมาให้เกษตรกรปลูกและรับซื้อคืนโดยเฉพาะ

1.3 พันธุ์พื้นเมือง เป็นเมล็ดพันธุ์ที่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จานุลักษณ์ ขนบดี สถาบันวิจัยและฝึกอบรมเกษตรลำปาง เก็บรวบรวมเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ไม่ผ่านการคัดเลือกแบบสกัดสายพันธุ์แท้ชั่วที่ 3

ฝักที่นำมาศึกษาอายุ 5 วันหลังการผสมเกสร ความยาว 9-11 ซม. เก็บเกี่ยวจากแปลงปลูกที่จังหวัดนครนายกโดยตรง ฤดูกาลที่เพาะปลูกและเก็บเกี่ยว ระหว่าง เดือนพฤษภาคม 2544 - เดือนกุมภาพันธ์ 2545

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของฝัก

- กล้องจุลทัศน์ (Olympus รุ่น BH-2)
- กล้องถ่ายรูป
- ฟิล์มถ่ายรูป
- แผ่นสไลด์
- กระจกปิดสไลด์ (coverglass)
- Plant microtome
- มีด
- พู่กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ไม้บรรทัด
- เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
- หลอดหยด

2.2 วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ

- เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
- มีด
- เขียง
- กล้องถ่ายรูป
- ฟิล์มถ่ายรูป
- ฟอล์ย (foil)
- ไม้บรรทัด
- เวอร์เนีย (vernier caliper)
- แผ่นเทียบสี (Color chart) ของ The Royal Horticultural Society
- เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Penetrometer)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Refractometer รุ่น N-1E ของบริษัท Atago)
- โกร่งบดยา
- ผ้ากรอง
- บีกเกอร์ (beaker)
- กรวยแก้ว
- ขวดรูปชมพู่
- กระบอกตวง
- volumetric flask
- กระดาษกรอง No. 4 ของบริษัท Whatman
- สารดูดความชื้น
- หลอดหยด
- บิวเรต (burette)
- ปิเปต (pipette)
- เครื่องวัด pH (pH meter)
- แท่งแก้วคน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- หลอดทดลอง
- เข็มและหลอดฉีดยา
- ตะแกรง 30 mesh
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (10-14 องศาเซลเซียส)
- ตู้อบ (hot air oven)
- เทอร์โมมิเตอร์
- ตู้ดูดควัน (fume hood)
- เครื่องผนึกพลาสติก
- เตาต้มน้ำ
- เครื่อง gas chromatography
- หลอดเก็บก๊าซหรือขวดน้ำเกลือพร้อมจุกปิด

2.3 ฟิล์มและถุงพลาสติก

- ถุงพลาสติกขุ่นแบบมีซิปผลิตด้วย Low-density polyethylene (LDPE) ความหนา 67.55 ไมโครเมตร ขนาด 5x7 นิ้ว มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ 3.16 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน ที่ 38 องศาเซลเซียสความชื้นสัมพัทธ์ 90% (ศูนย์การบรรจุหีบห่อไทย)
- ฟิล์มพลาสติก OPP20/DL/L-LDPE50 # NE882 ของบริษัท สตรองแพค จำกัด(มหาชน) ความหนา 75 ไมโครเมตร ทำเป็นถุง ขนาด 5x7 นิ้ว มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (Oxygen Gas Transmission Rate, OTR) 1340 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน ที่ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 0% อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ 1.76 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน ที่ 38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90%
- ฟิล์มพลาสติก NY15/PE20/L-LDPE75 # I658 ของบริษัท สตรองแพค จำกัด (มหาชน) ความหนา 110 ไมโครเมตร ทำเป็นถุง ขนาด 5x7 นิ้ว อัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน 82 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน ที่ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 0% อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ 2.26 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน ที่ 38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90%
- ถุงพลาสติกขุ่นแบบบางผลิตด้วย High-density polyethylene (HDPE) ความหนา 11.3 ไมโครเมตร ขนาด 5x7 นิ้ว อัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน 16,932 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน ที่ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 0% อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ 16.89 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน ที่ 38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90%

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีในการศึกษาลักษณะฝักทางกายวิภาค

- safranin O
- ยาเคลือบเล็บ

3.2 สารเคมีในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพฝัก

- น้ำกลั่น
- สารละลาย sodium chloride อิ่มตัว
- Sodium hydroxide (NaOH)
- Metaphosphoric acid (HPO_3)
- Ascorbic acid (vitamin C)
- 2,6-dichlorophenol indophenol sodium salt hydrate (DI)
- Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
- Nitric acid (HNO_3) pH 2.1
- Nitric acid (HNO_3) 0.5 N
- 2-propanol

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองเป็นแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ใช้ฝักกระเจี๊ยบเขียว 3 สายพันธุ์ที่คาดว่าน่าจะมีความแตกต่างกันในด้านกายวิภาคของฝัก เก็บในถุงที่ผลิตจากฟิล์มพลาสติกที่ต่างกัน 4 ชนิด ชนิดที่ 1 คือ Low-density polyethylene (LDPE) ชนิดที่ 2 คือ OPP20/DL/L-LDPE50 (OPP) ชนิดที่ 3 คือ NY15/PE20/L-LDPE75 (NY) ชนิดที่ 4 คือ High-density polyethylene (HDPE) โดยแต่ละถุง(ซ้ำ)บรรจุฝักกระเจี๊ยบ 6 ฝักที่เก็บตอนเช้าของวันที่ทำการทดลอง มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน ชุดควบคุมไม่ได้ใส่ถุง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 และ14 องศาเซลเซียสความชื้นสัมพัทธ์ 95 (±5)% ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจะถูกวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Anova และ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. **การเก็บข้อมูลสำหรับการทดลอง**

การศึกษาแบ่งเป็น 2 ตอนคือ

ตอนที่ 1

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของฝักที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียน้ำของฝักกระเจี๊ยบทั้ง 3 พันธุ์ คือ ความหนาแน่นของ stomata และ trichome ต่อพื้นที่และต่อน้ำหนัก ความหนาของชั้น cuticle ของผนังฝัก (pericarp)

ตอนที่ 2

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของฝักกระเจี๊ยบที่เก็บในชุดการทดลองต่างๆ ทุก 3 วันเป็นเวลา 21 วันหรือจนกระทั่งไม่เป็นที่ยอมรับ โดยเก็บข้อมูล ลักษณะที่ปรากฏ (overall appearance) ขนาด สี น้ำหนัก water content ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids) ความแน่นเนื้อ (firmness) เส้นใย (fiber) เพกติน (pectin) วิตามินซี การสะสมก๊าซเอทิลีนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ การตัดสินว่าฝักมีลักษณะไม่เป็นที่ยอมรับคือ เมื่อฝักมีคะแนน overall appearance ต่ำกว่า 7 คะแนน

3 **การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของฝัก**

3.1 **การหาจำนวนของ** stomata **ต่อพื้นที่และต่อน้ำหนัก**

ทำการสุ่มชั่งน้ำหนักและวัดพื้นที่ของชิ้น pericarp จากบริเวณกลางฝัก เก็บตัวอย่าง 2 ด้านจาก 1 ฝัก ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาลงบนผิวฝัก ทิ้งไว้ให้แห้ง ลอกภาพพิมพ์ออกแล้วนำไปวางบนสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 33 เท่าบันทึกผลด้วยภาพถ่าย นับจำนวน stomata ต่อพื้นที่

3.2 **การหาจำนวนของ** trichome **ต่อพื้นที่และต่อน้ำหนัก**

ทำการสุ่มชั่งน้ำหนักและวัดพื้นที่ของชิ้น pericarp ใช้วิธีการศึกษาและบันทึกผลด้วยภาพถ่ายวิธีเดียวกับข้อ 3.1 นับจำนวน trichome ต่อพื้นที่

3.3 **การความหนาของชั้น** cuticle **ของ** pericarp

ตัดชิ้น pericarp มา 1 ด้าน (กว้างประมาณ 0.9 เซนติเมตร) ยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ตัด X- section ด้วยเครื่อง Plant microtome บริเวณกลางฝัก นำชิ้นเนื้อเยื่อพืชแช่ในสารละลาย safranin O เจือจาง วางบนแผ่นสไล์ดปิดทับด้วย กระจกปิดสไลด์ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์

กำลังขยาย 66 เท่า บันทึกผลด้วยภาพถ่าย วัดความหนาของชั้น cuticle แล้วคำนวณกลับเป็นขนาดจริง

4. **การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของฝัก**

4.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของฝัก

4.1.1 ประเมินลักษณะฝัก

โดยใช้แผ่นเทียบสีเทียบบริเวณกลางฝัก และให้คะแนนลักษณะที่ปรากฏ (overall appearance) โดยมีเกณฑ์ คือ

ฝักสีเขียวสดเต่งตึง	= 9	คะแนน
ฝักเริ่มเหี่ยวหรือมีรอยเพียงเล็กน้อย	= 7	คะแนน
ฝักเริ่มเหี่ยว มีรอยหรือจุดสีน้ำตาลตามก้าน	= 5	คะแนน
ฝักเหี่ยวมีรอยหรือจุดสีน้ำตาลสังเกตเห็นได้ชัด	= 3	คะแนน
ฝักมีรอยสีน้ำตาลมาก เปลี่ยนสีหรือมีกลิ่นผิดปกติภายในถุง	= 1	คะแนน

คะแนนที่ยอมรับได้คือมากกว่า 7 คะแนน

4.1.2 ความยาว

วัดความยาวของฝักด้วยไม้บรรทัด บันทึกผล

4.1.3 เส้นผ่านศูนย์กลาง

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางด้วย vernier caliper บริเวณกลางฝัก

4.1.4 ความหนาผนังฝัก (pericarp thickness)

ตัดขวางบริเวณกลางฝัก วัดความหนาของ pericarp ด้วย vernier caliper

4.2 น้ำหนักของฝักเมื่อเปรียบเทียบเป็น%ของน้ำหนักเริ่มต้น

ทำการบันทึกน้ำหนักของฝักในแต่ละชุดการทดลองทุก 3 วัน โดยถือว่าวันแรกที่ทำการทดลอง ฝักมีน้ำหนักเป็น 100 % แล้วนำมาคำนวณการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักดังสมการ

น้ำหนักของฝักเมื่อเทียบเป็น%ของน้ำหนักเริ่มต้น (%) =

$$\frac{\text{น้ำหนักในวันที่บันทึกผลการทดลอง (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้นในวันแรก (กรัม)}}$$

4.3 **ปริมาณ** Water content

ทำการชั่งน้ำหนักสดของชิ้นฝักประมาณ 5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้งที่ได้ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วนำมาคำนวณตามสมการ

$$\text{water content (\%)} = \frac{\text{(น้ำหนักสด-น้ำหนักแห้ง) x 100}}{\text{น้ำหนักสด}}$$

4.4 **ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้** (Total Soluble Solids,TSS)

ชั่งน้ำหนักเนื้อฝักประมาณ 5 กรัม เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1(dilution factor) บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา ใช้ผ้าขาวบางคั้นน้ำ หยดลงในเครื่อง Refractometer อ่านค่าและนำไปคำนวณหาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

ปริมาณ TSS ($^{\circ}$Brix) = ค่า soluble solids ที่อ่านได้ X 2

4.5 **ความแน่นเนื้อ** (Firmness)

โดยใช้เครื่อง Penetrometer ที่มีหัวเจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร (พื้นที่ 0.503 ตารางเซนติเมตร) เจาะทะลุผนังฝักลึก 0.5 ซม.

$$\text{ค่าความแน่นเนื้อ (นิวตัน, N)} = \frac{\text{ค่าที่อ่านได้ x 9.807}}{0.503}$$

4.6 **ปริมาณเส้นใย** (Fiber) (Gould, 1977)

ชั่งน้ำหนักสดของตัวอย่างฝักประมาณ 5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง บดด้วยโกร่งบดยา ล้างเนื้อเยื่อลงในบีกเกอร์ด้วยน้ำเดือด 40 มล. เติม 50% NaOH 5 มล.คนและต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาทีในตู้ดูดควัน เทสารละลายเนื้อเยื่อที่ได้ลงในตะแกรง 30 mesh ล้างด้วยน้ำไหลประมาณ 5 นาที ล้าง fibrous material ที่ได้ลงในบีกเกอร์ กรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่งนำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณเส้นใย

$$\text{ปริมาณเส้นใย(\%)} = \frac{\text{น้ำหนัก fiber x 100}}{\text{น้ำหนักสดของตัวอย่างฝัก}}$$

4.7 ปริมาณ Pectin (Crandall and McCain, 2000)

นำตัวอย่างผักหนักประมาณ 5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ในสารละลาย Nitric acid pH 2.1 ปริมาตร 50 มล. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับ pH เป็น 1.8 ด้วย Nitric acid 0.5 N ต้มและคนเร็วๆ 45 นาที ทิ้งไว้ให้หายร้อนแล้วปรับให้เป็น pH 4 ด้วย สารละลาย Sodium bicarbonate กรองสารละลายที่ได้ลงในขวดรูปชมพู่ ทำการตกตะกอนด้วย 100% 2-propanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายตัวอย่างโดยทิ้งไว้เป็นเวลา 18 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแล้วล้างตะกอนด้วย 70% 2-propanol สองครั้งตามด้วย 100% 2-propanol หนึ่งครั้ง ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วนำไปอบให้แห้ง บันทึกน้ำหนักด้วยด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่งและคำนวณปริมาณ pectin

$$\text{ปริมาณ pectin (\%)} = \frac{\text{น้ำหนัก pectin} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างผัก}}$$

4.8 ปริมาณวิตามินซี (Askar and Treptow, 1993)

ทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างผักประมาณ 5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ บดกับสารละลาย 3% Metaphosphoric acid ที่เย็น แล้วเพิ่มปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 3% Metaphosphoric acid ที่เย็น กรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้มา 5 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วย Dye solution* จนเป็นสีชมพูถาวรเป็นเวลา 15 วินาที นำปริมาตร Dye solution ที่ได้มาคำนวณตามสมการ

$$\text{ปริมาณวิตามินซี (มก./100 ก.)} = \frac{\text{ปริมาตร Dye solution ที่ใช้ (มล.)} \times \text{Dye factor*(มล.)} \times 5000}{5 \times \text{น้ำหนักตัวอย่างผัก (ก)}}$$

4.9 การสะสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเอทิลีน

ทำการดูดก๊าซจากถุงฟิล์มพลาสติกที่บรรจุกระเจี๊ยบของชุดการทดลองต่างๆ ที่ทราบปริมาตรแล้วจำนวน 10 มิลลิลิตร แทนที่ในน้ำเกลืออิ่มตัวในหลอดเก็บก๊าซ จากนั้นนำก๊าซที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง gas chromatograph ของบริษัท SHIMADZU รุ่น GC-8A ภายในบรรจุคอลัมน์ PORAPACK Q 80/100 mesh Thermal conductivity detector อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส และตรวจวัดปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่อง gas chromatograph ของบริษัท SHIMADZU รุ่น GC-14A ภายในบรรจุคอลัมน์ PORAPACK N 80/100 mesh Flame Ionization detector อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ณ ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย