

บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย

การผสมเกสรทุเรียนในสวนระบบวนเกษตรจังหวัดอุตรดิตถ์ในครั้งนี้ ใช้พืชทดลองเป็นทุเรียนจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์หลงลับแล พันธุ์หลินลับแล พันธุ์หมอนทอง พันธุ์ชะนี พันธุ์ก้านยาว และพันธุ์กระดุมทอง ที่ปลูกอยู่ในพื้นที่สวนระบบวนเกษตรตำบลนกกก ตำบลแม่พูล และตำบลฝายหลวง อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์ แบ่งการทดลองได้ 4 การทดลอง ได้แก่ การศึกษาพัฒนาการของดอกทุเรียน การศึกษาความสมบูรณ์และควมมีชีวิตของละอองเรณูทุเรียน การศึกษาการผสมเกสรทุเรียน และ การศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลทุเรียนที่เกิดจากการผสมเกสร มีวิธีการวิจัยดังนี้

1. การศึกษาพัฒนาการของดอกทุเรียน

การเตรียมสไลด์ถาวรของเนื้อเยื่อโดยเก็บตัวอย่างดอกในเดือนมกราคมถึงเดือนเมษายน เก็บทุก ๆ สัปดาห์ในระยะของการเจริญและพัฒนาของดอก 7 ระยะ คือ ระยะไข่ปลา ระยะตาปู ระยะเหยียดดินหนู ระยะลูกกระดุม ระยะหัวกำไล ระยะดอกบาน และระยะป็นหรือไม้กั๊ต มีขั้นตอนการเตรียมตลอดจนวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ ดังนี้

1.1 เก็บตัวอย่างสดตามที่วางแผนไว้มาแช่ลงในน้ำยา FAA (formalin - acetic acid - alcohol) ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว ให้น้ำยาแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชอย่างทั่วถึง จากนั้นจึงปิดฝาขวดให้แน่นและเก็บขวดตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

น้ำยา FAA ซึ่งทำหน้าที่ในการฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) ที่ใช้ในการศึกษานี้มีส่วนผสม ดังนี้

| | | |
|---------------------|----|-----------|
| 95% ethyl alcohol | 50 | มิลลิลิตร |
| glacial acetic acid | 5 | มิลลิลิตร |
| formalin | 10 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 35 | มิลลิลิตร |

1.2 ถ่ายเนื้อเยื่อออกจากน้ำยา FAA มาใส่ลงในแอลกอฮอล์เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อ โดยให้ผ่านน้ำยาที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จากระดับต่ำไปหาสูง คือ จาก 50 เปอร์เซ็นต์ (%) ไปเป็น 70, 85, 95 และ 100% ตามลำดับ อันเป็นวิธีการดึงน้ำออกจากเซลล์อย่างค่อยเป็นค่อยไป เพื่อไม่ให้เซลล์เหี่ยวและเสียรูปทรงดั้งเดิม แอลกอฮอล์ที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์นี้เป็นส่วนผสมของแอลกอฮอล์ 3 ชนิด คือ 95% ethyl alcohol, absolute ethyl alcohol และ tertiary butyl alcohol (TBA) โดยที่น้ำยาที่มีแอลกอฮอล์ในความเข้มข้นแต่ละระดับจะมีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ 3 ชนิดแตกต่างกันไป ดังแสดงในตาราง 3.1 สำหรับน้ำยาระดับที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เป็น 100% (ระดับ 5) นั้นมีสี erythrosin ผสมอยู่เล็กน้อย เพียงพอเพื่อให้เกิดสีแดงในน้ำยาเพื่อให้สีติดที่ผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อหรือติดลึกเข้าไปถึงด้านใน ซึ่งเนื้อเยื่อที่ติดสีนี้ช่วยให้การฝังเนื้อเยื่อนั้นในพาราฟินทำได้สะดวกและจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อในพาราฟินได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้สีแดงของ erythrosin จะหลุดจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อในขณะที่มีการละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อระหว่างขั้นตอนของการย้อมสี

เมื่อผ่านเนื้อเยื่อในน้ำยาที่มีแอลกอฮอล์จนถึงระดับ 5 แล้วจึงถ่ายเนื้อเยื่อลงในขวดที่บรรจุ TBA บริสุทธิ์นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงถ่ายเนื้อเยื่อลงในขวดที่มีส่วนผสมของ TBA

และพาราฟินเหลว (1:1) เพื่อให้เนื้อเยื่อพร้อมรับการซึมแทรกของพาราฟิน (paraffin infiltration) ก่อนนำเนื้อเยื่อเข้าสู่ขั้นตอนของการแทรกพาราฟินซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับยึดเนื้อเยื่อให้คงตัวในขั้นตอนของการตัดเนื้อเยื่อ

น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมของแอลกอฮอล์ 3 ชนิดดังกล่าวแล้วข้างต้นโดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวเจือจาง อัตราส่วนของส่วนผสมในน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ระดับ 1 ไปจนถึงระดับ 5 ตามวิธีของ Sass (1966) แสดงไว้ในตาราง 3.1 ทั้งนี้การดึงน้ำออกจากเซลล์ใช้เวลาระดับละไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง

ตาราง 3.1 ส่วนผสมของแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์จากความเข้มข้นต่ำไปหาสูง

| ระดับ | เปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์ | 95 % ethyl alcohol (มล.) | absolute ethyl alcohol (มล.) | tertiary butyl alcohol (มล.) | น้ำกลั่น (มล.) |
|-------|-------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------|
| 1 | 50 | 40 | - | 10 | 50 |
| 2 | 70 | 50 | - | 20 | 30 |
| 3 | 85 | 50 | - | 35 | 15 |
| 4 | 95 | 45 | - | 55 | - |
| 5 | 100 | - | 25 | 75 | - |

1.3 ถ่ายเนื้อเยื่อที่ดึงน้ำออกหมดแล้วลงไปในช่วงแก้วซึ่งบรรจุพาราฟินที่หลอมจนเหลวไว้แล้ว เปิดฝาขวดออก นำไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่าเพื่อให้พาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อจนเต็ม

1.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในสารตัวกลาง (embedding media) คือ พาราฟินในรูปของ paraplast แล้วจัดเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการก่อนที่พาราฟินจะแข็งตัว

1.5 นำแท่งพาราฟินที่มีเนื้อเยื่อฝังอยู่ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าโดยมีเนื้อเยื่อพิชอยู่ตรงกลาง แล้วนำมาติดกับแท่งไม้ซึ่งผ่านการต้มในพาราฟินจนแท่งไม้นั้นมีพาราฟินแทรกอยู่ในช่องว่างของเนื้อไม้และเคลือบผิวของแท่งไม้โดยรอบ จากนั้นนำแท่งไม้ไปติดไว้บนแป้นของเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน (rotary microtome) ตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้มีความหนา 13-15 ไมครอน ได้ชิ้นส่วนของพิชในพาราฟินออกมาเป็นแผ่นติดกันยาวในลักษณะของริบบิ้นหรือแถบพาราฟิน (paraffin ribbon)

1.6 นำแถบพาราฟินมาเลือกให้ได้ชิ้นส่วนที่ต้องการ แล้วแยกแผ่นพาราฟินเหล่านี้ออก นำไปติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่สะอาดโดยใช้น้ำยาเหนียว (adhesive) ช่วยยึดเนื้อเยื่อพิชให้ติดกับแผ่นกระจกสไลด์ วางแผ่นกระจกสไลด์เหล่านี้นบนเครื่องอุ่นสไลด์ ทิ้งไว้จนแผ่นชิ้นส่วนแห้งและติดแน่นกับแผ่นกระจกสไลด์

น้ำยายึดเนื้อเยื่อพิชสูตรเข้มข้นมีส่วนผสมคือ ไซไซขาว 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 49 มิลลิลิตร เมื่อจะใช้จึงเจือจางน้ำยา 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร

1.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อแล้วไปย้อมสีแบบสีเดียว (single stain) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้สี Delafield's hematoxylin มีขั้นตอนคือ แช่แผ่นกระจกสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อลงในไซลิเนน (xylene) เพื่อกำจัดพาราฟินออกให้คงเหลือเฉพาะเนื้อเยื่อที่ติดอยู่กับแผ่นกระจกสไลด์ จากนั้นจึงนำไปผ่าน

ขั้นตอนแช่ในชุดสารละลายเอทานอลโดยเริ่มจากเอทานอลเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อโซลิน เท่ากับ 1:1, และเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ต่อโซลิน เท่ากับ 1:1 แล้วนำไปแช่ในเอทานอลเข้มข้น 95, 70, 50 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในแต่ละขั้นตอนแช่ทิ้งไว้เป็นเวลานานอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นจึงนำแช่ในสารละลายสีย้อมเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปผ่านกระบวนการย้อนกลับ คือแช่ในสารละลายเอทานอล 30, 50, 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้เวลาในแต่ละขั้นตอนนานอย่างน้อย 5 นาที เช่นกัน จากนั้นจึงนำไปแช่ในสารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ต่อโซลิน เท่ากับ 1:1 และนำไปแช่ในเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์เป็นขั้นตอนสุดท้าย และเก็บสไลด์ไว้ในสารละลายโซลิน เพื่อเตรียมการปิดแผ่นกระจกสไลด์ต่อไป

1.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึด ทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้องหรือใช้ไฟจากหลอดไฟส่องจนแห้ง

1.9 ศึกษาเนื้อเยื่อไตกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วบันทึกภาพ

1.10 วิเคราะห์ผลการศึกษาของเนื้อเยื่อไตในแต่ละระยะ

2. การศึกษาความสมบูรณ์และควมมีชีวิตของละอองเรณูทุเรียน

ศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณูของทุเรียนพันธุ์หลงลับแล พันธุ์หินลับแล พันธุ์หมอนทอง พันธุ์ชะนี พันธุ์ก้านยาว และพันธุ์กระดุมทอง ในระยะการปล่อยละอองเรณู มีขั้นตอนการศึกษาดังต่อไปนี้

2.1 การเก็บตัวอย่างเรณู

เก็บตัวอย่างอับเรณูของทั้งหกพันธุ์ พันธุ์ละ 1 ต้น โดยเก็บจากดอกทุเรียน 5-6 ดอกต่อต้น เก็บพันธุ์ละ 3 ซ้ำ เลือกดอกที่เกสรเพศผู้อยู่ในระยะการปล่อยละอองเรณู ซึ่งอยู่ในช่วงเวลา 19.00-21.00 น. เก็บเฉพาะอับเรณูที่แตกไว้ในขวดบรรจุละอองเรณู ปิดฝาให้สนิท เขียนชื่อพันธุ์และวันที่เก็บติดไว้ที่ขวด แล้วเก็บขวดละอองเรณูไว้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 สภาพ คือ 0, 5 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 1, 3, 6, 10, 15, 21, 28, 36, 45, 55, 66, 78, 91, 105 และ 120 วัน จากนั้นจึงนำละอองเรณูในสภาพการเก็บรักษาที่แตกต่างกันมาศึกษาการงอกโดยการเลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงละอองเรณู

2.2 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงละอองเรณู

อาหารสำหรับเลี้ยงละอองเรณูในงานวิจัยนี้ใช้ส่วนประกอบตามวิธีการของ Brewbaker and Kwack (1963) มีส่วนประกอบของ stock mineral solution ดังนี้

| | |
|---|--------------|
| กรดบอริก (boric acid : H_3BO_3) | 0.01 กรัม |
| แคลเซียมไนเตรต (calcium nitrate : $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) | 0.03 กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.02 กรัม |
| โพแทสเซียมไนเตรต (potassium nitrate : KNO_3) | 0.01 กรัม |
| น้ำกลั่น | 10 มิลลิลิตร |

จากนั้นจึงเตรียมอาหารที่ใช้เลี้ยงละอองเรณู โดยชั่งซูโครส (sucrose) 1.0 กรัม แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร แล้วจึงนำ stock mineral solution ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมในสารละลายซูโครส

2.3 ขั้นตอนการศึกษาและการบันทึกข้อมูล

หยดอาหารสำหรับเลี้ยงละอองเรณูประมาณ 1-2 หยด ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ นำละอองเรณูของทุเรียนแต่ละพันธุ์มาเกาะใส่บนอาหารเลี้ยงนี้ โดยใช้แผ่นกระจกสไลด์ 1 แผ่นต่อทุเรียน 1 พันธุ์ ทำพันธุ์ละ 10 ซ้ำ ในแต่ละสภาพการเก็บรักษา แล้วปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปวางไว้ในจานเพาะเลี้ยงที่รองพื้นด้วยกระดาษกรองชุ่มน้ำ เพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ละอองเรณู ปิดฝาจานเพาะเลี้ยง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบระยะเวลาจึงนำแผ่นกระจกนั้นมาติดตามการงอกของหลอดเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกภาพลักษณะการงอกและนับจำนวนละอองเรณูทั้งหมดและจำนวนละอองเรณูที่งอก ด้วยเครื่องนับจำนวนแบบมือกด (hand-held tally counter) โดยกำหนดให้ละอองเรณูที่มีหลอดเรณูงอกออกมายาวเท่ากับหรือมากกว่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางละอองเรณูถือเป็นเรณูที่งอก นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกเฉลี่ย และวิเคราะห์โดยวิธีของ Duncan's new multiple range test

3. การศึกษาการผสมเกสรทุเรียน

ทำการผสมเกสรทุเรียน 6 พันธุ์ โดยทำการผสมแบบพบกันหมด ไม่น้อยกว่าคู่ผสมละ 5 ซ้ำ ขั้นตอนการผสมทุเรียนเริ่มจากการตัดแต่งดอกแม่พันธุ์ โดยตัดกลีบดอกและเกสรเพศผู้ออกให้หมด ให้เหลือเฉพาะเกสรเพศเมีย จากนั้นเมื่อถึงเวลาที่ละอองเรณูมีความพร้อมในการผสมคือ เวลา 19.00-21.00 น. ทดสอบโดยใช้หลังมือสัมผัสกับละอองเรณู หากมีละอองเล็ก ๆ ติดอยู่ที่หลังมือแสดงว่าละอองเรณูมีความพร้อมในการผสมแล้ว จากนั้นนำละอองเรณูของพ่อพันธุ์แต่ละพันธุ์ที่ต้องการผสมมาสัมผัสที่ยอดเกสรเพศเมียของดอกแม่พันธุ์ที่ตัดแต่งไว้ แล้วคลุ้มด้วยผ้าขาวบางเพื่อป้องกันการผสมพันธุ์จากดอกอื่น ผูกป้ายบันทึก เขียนชื่อแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ และวันเดือนปีที่ทำการผสม

ติดตามและบันทึกการเจริญเติบโตของผลทุเรียนที่ทำการผสมเกสร โดยวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางหรือความกว้าง และความยาวของผลทุเรียนทุกสัปดาห์ด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (vernier caliper) (150 x 0.05 mm) และสายวัด หลังจากวันที่ผสมเกสรจนถึงระยะผลแก่พร้อมเก็บเกี่ยว

4. การศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลทุเรียนที่เกิดจากการผสมเกสร

เมื่อผลทุเรียนที่ผสมเกสรเจริญเติบโตถึงระยะแก่พร้อมเก็บเกี่ยวได้ จึงทำการเก็บผลทุเรียนเหล่านั้นมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล รวมถึงลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของทุเรียนทั้งภายนอกและภายใน ดังนี้

4.1 ลักษณะทางกายภาพของผลทุเรียนที่เกิดจากการผสมเกสร

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลทุเรียนที่เกิดจากการผสมเกสร โดยพิจารณาจากลักษณะภายนอกของผล และลักษณะของเปลือก เนื้อ และเมล็ด

4.1.1 ลักษณะภายนอกของผลพิจารณา 4 อย่าง ได้แก่

- ขนาดผล วัดจากความกว้างสุดหนามหรือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และวัดความยาวสุดหนาม วัดจากบริเวณที่กว้างที่สุดและยาวที่สุด
- น้ำหนักผล โดยการชั่งน้ำหนักทั้งผล
- ขนาดขั้วผล วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของขั้วผล
- ขนาดก้านผล วัดความยาวจากขั้วผลถึงปากปลิง

4.1.2 ลักษณะทางคุณภาพของผลทุเรียน พิจารณาใน 3 ลักษณะ ได้แก่ เปลือก เนื้อ และเมล็ด มีรายละเอียดดังนี้

- น้ำหนักเปลือกสดและเปลือกแห้ง น้ำหนักเนื้อ และน้ำหนักเมล็ดต่อผล
 - จำนวนพูต่อผล จำนวนเมล็ดต่อผล
 - ความหนาของเปลือก ความหนาแกน สุ่มวัดอย่างน้อย 3 จุด
 - ความหนาเนื้อ วัดความหนาของเนื้อในทุกพูของแต่ละผล
 - ขนาดเนื้อต่อพู วัดความกว้างและยาวของเนื้อในทุกพูของแต่ละผล
 - ขนาดเมล็ด วัดความกว้าง ยาว และหนา ของทุกเมล็ดในแต่ละผล
 - ค่าสี เปลือก เนื้อ และเมล็ดของทุเรียน วัดด้วยเครื่องวัดสี ยี่ห้อ HunterLab รุ่น Color Flex[®] ของบริษัท Hunter Associates Laboratory ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยการวัดสุ่มวัดค่าสีอย่างน้อย 3 จุดในแต่ละตัวอย่าง โดยค่าที่วัดได้แสดงเป็นค่า L*, a*, b* แล้วนำค่า a* และ b* มาคำนวณหาค่า chroma (C*) และ hue angle (H°) จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992)
- $$\text{chroma (C*)} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$
- $$\text{hue angle (H°)} = \arctangent (b^*/a^*)$$
- ความแน่นเนื้อ วัดค่าความแน่นเนื้อของทุเรียนโดยใช้เครื่อง Penetrometer รุ่น FT011 (0-11 Lbs.) ของบริษัท FACCHINI ประเทศอิตาลี ขนาด 0-5 กิโลกรัม หัววัดรูปทรงกระบอก (cylinder shape) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ยาว 10 มิลลิเมตร โดยวัดค่าความแน่นเนื้อของทุเรียนจำนวน 3 จุดต่อพู คือ บริเวณด้านบน ด้านล่าง และกลางพู แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย โดยแต่ละซ้ำวัดค่าความแน่นเนื้อของทุเรียนทุกพู

4.2 การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีและชีวเคมี

4.2.1 ปริมาณวิตามินซี (vitamin C) วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีของเนื้อทุเรียน ด้วยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลายอินโดฟีนอล (indophenol) โดยชั่งเนื้อทุเรียนที่ป่นละเอียดน้ำหนัก 10 กรัม แล้วเติมกรดออกซาลิก (oxalic acid) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ปีเปตต์สารละลายที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติ ซึ่งสารละลายที่ได้มีสีชมพู คงตัวนานประมาณ 15 วินาที แล้วคำนวณหาปริมาณวิตามินซี โดยใช้ปริมาตร 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ไทเทรตกับสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับปริมาตร 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ไทเทรตกับสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน (Ranganna, 1986)

4.2.2 ปริมาณแคโรทีนอยด์ (carotenoid) วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม โดยชั่งเนื้อทุเรียนที่สับละเอียด 1 กรัม แช่เนื้อทุเรียนในสารละลาย dimethylsulphoxide (DMSO) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คนตัวอย่างด้วยความเร็วเป็นเวลา 2 นาที วางไว้ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 นำสารละลายที่กรองได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 665, 649 และ 480 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ คำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักสด (Pawelzik, 2005)

4.2.3 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลและสารต้านอนุมูลอิสระ มีวิธีการดังนี้

- การเตรียมสารสกัด บดเนื้อทุเรียนให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างเนื้อทุเรียนแล้วนำมาผสมกับเมทานอล (methanol) ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเขย่าสารละลายดังกล่าวในสภาวะมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองสารละลายโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วปรับปริมาตรระหว่างสารละลายที่กรองได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วย 0.45 μm syringe nylon filter แล้วเก็บรักษาสารสกัดไว้ในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยนำสารสกัดจากเนื้อทุเรียนใส่ลงในหลอดทดลองปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 375 ไมโครลิตร วางไว้ในที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu solution ปริมาตร 125 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำสารละลายผสมไปเขย่าในสภาวะมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดจากพืชเป็นค่ามาตรฐาน (blank) เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำมาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยเทียบเป็นหน่วยไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม (microgram gallic acid equivalent/g fresh weight) ซึ่งวิธีการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลดังกล่าวนี้ดัดแปลงจาก Sellappan *et al.* (2002)

- การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay (DPPH) นำสารสกัดที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลาย DPPH แล้วนำสารผสมที่ได้ไปเขย่าภายใต้สภาวะมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดเป็นค่ามาตรฐาน (blank) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเทียบเป็นหน่วยไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสด 1 กรัม (microgram gallic acid equivalent/g fresh weight) ทั้งนี้การวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Manthey (2004)

4.2.4 ค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (pH and titratable acidity (TA)) ชั่งเนื้อทุเรียนที่ป่นละเอียดน้ำหนัก 10 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) หลังจากนั้นไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.2 โดยใช้เครื่องวัดพีเอช แล้วคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดมาลิก (g malic acid/100 g fresh weight)

$$\% TA = \frac{\text{normality of NaOH (0.1 N)} \times \text{equi.wt. of malic acid} \times \text{vol. NaOH} \times 100}{\text{Weight of sample (10)}}$$

4.2.5 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids; TSS) ปั่นเนื้อทุเรียนในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 (dilution factor = 4) ด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสวมนใส่มาหาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ด้วยเครื่อง digital refractometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น PAL-1 นำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้} = \text{ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้} \times 4 \text{ (dilution factor)}$$

4.2.6 ปริมาณความชื้น ปริมาณโปรตีน ไขมัน เส้นใย และไขมัน โดยการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บันทึกผล คำนวณหาค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบผลการทดลองผสมเกสรของทุเรียนแต่ละคู่ผสม