

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. สถานที่ การวางแผนการทดลองและข้อมูลอากาศ

##### 1.1 สถานที่และการวางแผนการทดลอง

การสังเกตการณ์การเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศที่มีต่อชีววิทยาดอกชีวพาหะ การถ่ายละอองเรณูและการติดผลของส้มโชกุน ทำการทดลองในแปลงปลูกส้มโชกุนของเกษตรกรจำนวน 2 พื้นที่ ที่มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ได้แก่

1. เขตอำเภอยะหา จังหวัดยะลา
2. เขตอำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี

เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลการศึกษาด้าน ข้อมูลอากาศ ลักษณะทางชีววิทยาดอก ชนิดและพฤติกรรมของชีวพาหะ การถ่ายละอองเรณูและการติดผล โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Design) วิเคราะห์ข้อมูลด้านสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์

##### 1.2 ข้อมูลอากาศ

1.2.1 เก็บและบันทึกข้อมูลอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ด้วยเครื่องวัดและบันทึกค่าอุณหภูมิและความชื้นอากาศ (Mini Datalogger) กำหนดช่วงระยะเวลาในการบันทึกในหน่วยเวลาที่ตลอดระยะเวลาการศึกษา 12 เดือนต่อเนื่องกันโดยวางในตำแหน่งความสูง 1.5 เมตรเหนือพื้นดินซึ่งเป็นตำแหน่งความสูงที่ออกดอกมากที่สุด และห่างจากแนวระหว่างต้น 0.1 เมตร ทำการวัด 1 จุดต่อต้น เป็นจำนวน 20 ต้น ต่อพื้นที่ (ัดแปลงตามระเบียบวิธีของ Mikkelsen และคณะ, 2008)

1.2.2 เก็บและบันทึกข้อมูลความเข้มแสง ด้วยเครื่องวัดและบันทึกความเข้มแสง (Light meter) กำหนดช่วงระยะเวลาในการบันทึกในหน่วยเวลาที่ ตลอดระยะเวลาการศึกษา 12 เดือน โดยวางในตำแหน่งความสูง 1.5 เมตรเหนือพื้นดินซึ่งเป็นตำแหน่งความสูงที่ออกดอกมากที่สุด และห่างจากแนวระหว่างต้น 0.1 เมตร ทำการวัด 1 จุดต่อต้น เป็นจำนวน 20 ต้น ต่อพื้นที่

1.2.3 การประเมินความชื้นดินในช่วงทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างดินในระดับความลึก 30 เซนติเมตร มาในถุงพลาสติก จำนวน 5 ซ้ำต่อจุด 50 จุดในแต่ละพื้นที่ มาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 106 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง นำค่าที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นดินจากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นดิน} = \frac{\text{น้ำหนักดินเปียก} - \text{น้ำหนักดินแห้ง}}{\text{น้ำหนักดินแห้ง}} \times 100$$

## 2. การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาดอก

### 2.1 การออกดอกและลักษณะดอก

2.1.1 บันทึกช่วงเดือนของการออกดอกตามฤดูกาลและตำแหน่งของการออกดอกบนกิ่งทั้ง 2 พื้นที่ๆ ละ 20 ต้น

2.1.2 การศึกษาลักษณะดอกส้มโชกุนในระยะดอกบานเต็มที่โดยทำการสุ่มดอกต้นละ 20 ดอก ทั้ง 20 พื้นที่ๆ ละ 20 ต้น รวมทั้งสิ้น 400 ดอก มาแช่ในขวดรักษาสภาพที่มีน้ำยาคงสภาพ เอฟ เอ เอ สูตร 2 บรรจุอยู่ เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงใช้ปากคีบนำดอกที่อยู่ในขวดดังกล่าว มาศึกษา สีและจำนวนของกลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย

### 2.2 การแตกยอด

สุ่มกิ่งส้มโชกุนต้นละ 5 กิ่ง เป็นจำนวน 20 ต้น รวม 100 กิ่ง ตรวจนับจำนวนยอดใหม่ที่แตกยอดในช่วงการทดลองจำนวน 12 เดือนบันทึกช่วงเดือนการแตกยอดใหม่ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การแตกยอดใหม่ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การแตกยอด} = (\text{จำนวนยอดการแตกยอดใหม่} / \text{จำนวนยอดเดิมทั้งหมด}) \times 100$$

### 2.3 การบานของดอกและจำนวนดอก

ทำการศึกษาระยะเวลาการบานของดอกโดยบันทึกช่วงเวลาการบานของดอกตั้งแต่ดอกแรกจนถึงดอกสุดท้ายที่บานภายในต้นจำนวน 20 ต้นต่อพื้นที่ และช่วงเวลาที่ดอกบานสูงสุดภายในรอบวัน โดยนับจำนวนดอกที่บานทุกๆ ชั่วโมงตั้งแต่เวลา 7:00 ถึง 17:00 นาฬิกา ของแต่ละวันที่ดอกบานสูงสุด 3 วันติดต่อกัน โดยใช้กรรไกรขลิบกลีบดอกเพื่อเป็นเครื่องหมายดอกที่นับเสร็จแล้ว

## 2.4 ความมีชีวิตของละอองเรณู

เก็บดอกในระยะก่อนแตกบาน 1 ชั่วโมง ด้านละ 20 ดอก จำนวน 20 ด้าน รวม 400 ดอกต่อพื้นที่ตัดเฉพาะส่วนของอับละอองเรณูของดอกๆ ละ 5 อับ รวม 2,000 อับ เก็บไว้ในจานเพาะเชื้อซึ่งวางไว้ในอุณหภูมิห้อง สุ่มอับละอองเรณูมาขยี้ลงบนแผ่นสไลด์หลุมโดยทำ 5 ข้างต่อช่วงเวลา จากนั้นหยดด้วยสีอะซีโตคาร์มีน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที ตามกำหนดเวลา 0, 3, 6, 9, 24 และ 48 ชั่วโมง นำละอองเรณูที่ย้อมสีอะซีโตคาร์มีนไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วสุ่มนับจำนวนละอองเรณูที่ติดสีและไม่ติดสีโดยนับ 5 จุดต่อ 1 สไลด์ บันทึกภาพผลละอองเรณูที่ติดสีและไม่ติดสี นำค่าที่นับได้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต จากสูตร

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต = (จำนวนละอองเรณูที่ติดสี/จำนวนละอองเรณูทั้งหมด) x 100 และศึกษาความมีชีวิตละอองเรณูในแปลงปลูกโดยเก็บละอองเรณูจากต้นโดยตรงและศึกษาตามวิธีข้างต้น สำหรับการศึกษาความมีชีวิตละอองเรณูที่ระดับอุณหภูมิ 40, 30, 20, 10, 0, และ -4 องศาเซลเซียส โดยการนำละอองเรณูมาตรวจสอบความมีชีวิตด้วยวิธีการย้อมสี (staining method) โดยใช้สีอะซีโตคาร์มีน ความเข้มข้น 1% และตรวจนับความมีชีวิตของละอองเรณูตามวิธีการข้างต้นเช่นกัน

## 2.5 กายวิภาค เนื้อเยื่อวิทยา และลักษณะปลายยอดเกสรเพศเมีย

นำดอกที่บานเต็มที่มาแยกเกสรเพศเมียออกมาเป็นตัวอย่าง นำตัวอย่าง เกสรเพศเมียมาผ่านกระบวนการสีน้ำ โดยใช้เอซิดแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 75, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เทพาราฟินที่หลอมให้พร้อมปลายยอดเกสรเพศเมีย แล้วจึงนำตัวอย่างเข้าสู่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนพาราฟินใหม่อีก 2 ครั้ง ทุกๆ 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างวางลงในเบ้าหลอม พร้อมเทพาราฟินลงไป แล้วจัดตำแหน่งตัวอย่างตามยาวจากนั้นเอาบล็อกลูกพลาสติกไปยึดกับพาราฟินในเบ้าหลอม ปล่อยให้เย็นแล้วแกะชิ้นตัวอย่างออกจากกัน นำตัวอย่างไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อชนิดล้อหมุนให้มีขนาดความหนา 6 ไมครอน นำริบบอนของตัวอย่างวางบนแผ่นสไลด์จนเนื้อเยื่อติดกับแผ่นสไลด์ดีแล้วนำแผ่นสไลด์ ที่มีตัวอย่างมาผ่านกระบวนการละลายพาราฟินออก ย้อมสีด้วยสีฟาร์ทกรีน ศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อเกสรเพศเมีย พร้อมบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และศึกษาลักษณะปลายยอดเกสรเพศเมียโดยนำเกสรเพศเมียจากดอกบานเต็มที่ มาแช่ในน้ำยาดงสภาพ เอฟ เอ เอ สูตร 2 นำเกสรเพศเมียติดบนแผ่นทองเหลือง แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น นำแผ่นทองเหลืองที่มีเกสรเพศเมียที่แห้งไปจุ่มด้วยทองคำ บันทึกภาพเกสรเพศเมียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

### 3. การศึกษาชนิดและพฤติกรรมของชีวพาหะ

สุ่มต้นส้มโชกุนที่อยู่ในระยะดอกบานเต็มที่ จำนวน 20 ต้น สังเกตพร้อมบันทึกชนิดและพฤติกรรมของแมลงที่เข้ามาเยือนดอกส้มโชกุนที่กำลังบานในแต่ละต้นในวันที่ดอกบานสูงสุด 3 วันติดต่อกัน โดยเก็บข้อมูล 20 นาทีแรกของทุกๆ ชั่วโมงตั้งแต่เวลา 7:00 ถึง 17:00 นาฬิกา ใช้สวิงจับแมลงที่เข้ามาเยือนดอกส้มโชกุนและทำให้แมลงสลบ จำนวนแมลงโดยแยกเป็นหมวดหมู่ว่าพบแมลงในสกุลใดบ้าง พร้อมบันทึกภาพแมลงที่จับมาได้

### 4. การศึกษาการถ่ายละอองเรณูและการติดผล

การศึกษามูลของการถ่ายละอองเรณูต่อการติดผลของส้มโชกุน โดยวางแผนการทดลองแบบ สุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) มี 3 วิธีที่เสนอได้แก่ 1) การถ่ายละอองเรณูแบบผสมข้ามด้วยมือ 2) การถ่ายละอองเรณูแบบเปิดตามธรรมชาติ และ 3) ไม่มีการถ่ายละอองเรณู วิธีการถ่ายละอองเรณูแบบผสมข้ามด้วยมือกระทำโดยสุ่มและติดป้ายดอกกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง จำนวน 20 บล็อกๆ ละ 30 ดอก รวม 600 ดอก ตีกลีบดอกแล้วดึงเกสรเพศผู้ออกให้หมดจึงคลุมดอกด้วยถุงกระดาษ รอจนดอกบานเต็มที่ เมื่อดอกบานเต็มที่แล้ว ทำการถ่ายละอองเรณูโดยใช้ฟู่กันที่มีละอองเรณูจากดอกบานใหม่ๆ จากช่วงต้นป้ายบริเวณปลายยอดเกสรเพศเมียเบาๆ คลุมดอกด้วยถุงกระดาษเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเอาถุงกระดาษออก ส่วนการถ่ายละอองเรณูแบบเปิดตามธรรมชาติ สุ่มและติดป้ายดอกกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง 20 บล็อกๆ ละ 30 ดอก รวม 600 ดอก ปล่อยให้มีการถ่ายละอองเรณูตามธรรมชาติ และไม่มีการถ่ายละอองเรณู สุ่มและติดป้ายดอกกระยะก่อนดอกบาน 1 ชั่วโมง 20 บล็อกๆ ละ 30 ดอก รวม 600 ดอก ตีกลีบดอกแล้วดึงเกสรเพศผู้ออกให้หมดแล้วคลุมดอกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเอาถุงกระดาษออก บันทึกการพัฒนาการและจำนวนการติดผลทุกๆ สัปดาห์

### 5. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำฝน สภาพอากาศกับการแตกยอด ชีววิทยาดอกชีวพาหะ การถ่ายละอองเรณู และการติดผล

นำข้อมูลปริมาณน้ำฝน และสภาพอากาศที่เก็บมาจากพื้นที่แปลงปลูกทั้ง 2 แปลงมาวิเคราะห์ร่วมกับการแสดงออกทางการแตกยอด ชีววิทยาดอก ชีวพาหะ การถ่ายละอองเรณู และการติดผล