

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะทางพืชสวนของมะเขือเทศ

รวบรวมเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ L22 เป็นพันธุ์ที่นร้อนคัดเลือกจากพันธุ์มะเขือเทศของ The Asian Vegetable Research and Development Center ประเทศไต้หวัน พันธุ์ 502 x 667 เป็นพันธุ์ลูกผสมจากศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร (multiple cropping center ;MCC) เป็นพันธุ์ที่คัดเลือกมาจากลูกผสมของพันธุ์ฤดูหนาว Peto 81 และพันธุ์ที่นร้อน CL5915-206D42-5-0และพันธุ์ VF134-1-2 เป็นพันธุ์มะเขือเทศฤดูหนาว เป็นพันธุ์การค้า เริ่มเพาะเมล็ดเดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 โดยหยอดเมล็ดลงในกระบะเพาะ ส่วนผสมของวัสดุเพาะ คือ ดิน:ขุยมะพร้าว:ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1:1:1 รดน้ำเช้า เย็น ทุกวันและให้ต้นกล้าได้รับแสงแดด เมื่อต้นกล้ามีอายุ 25 วัน หลังเมล็ดงอก ย้ายกล้าลงแปลงปลูกเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2546 วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design ; RCBD) มี 9 หน่วยการทดลองคือ 3 พันธุ์และ 3 อายุผล ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ ขนาดแปลง 1x3 เมตร ระยะระหว่างแถว 60 เซนติเมตร และระยะระหว่างต้น 35 เซนติเมตร ปลูกแถวคู่ แถวละ 5 ต้น (รูป 4) บันทึกลักษณะทางพืชสวนตามแบบของ Descriptors for Tomato (*Lycopersicon spp.*) (IPGRI, 1996) บันทึกน้ำหนักผลผลิต ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ปริมาณกรดที่ได้จากการไตเตรตและ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)



รูป 4 แปลงปลูกมะเขือเทศ

แบบบันทึกลักษณะทางพืชสวนของมะเขือเทศ (IPGRI, 1996)

การบันทึกลักษณะของพืช (plant characteristics) เมื่อต้นมะเขือเทศมีผลสุกข้อที่ 2 - 3

1. การเจริญภายนอก (vegetative)

1.1 ชนิดการเจริญเติบโต (plant growth type)

- | | | |
|-------|---|-----------------------------------|
| คะแนน | 1 | แคระ (dwarf) |
| | 2 | เป็นพุ่มไม่ทอดยอด (determinate) |
| | 3 | กึ่งพุ่ม (semi-determinate) |
| | 4 | ทอดยอด หรือเลื้อย (indeterminate) |

1.2 ขนาดต้น (plant size)

- | | | |
|-------|---|------------------------|
| คะแนน | 3 | เล็ก (small) |
| | 5 | ปานกลาง (intermediate) |
| | 7 | ใหญ่ (large) |

1.3 ความหนาแน่นของขนที่ลำต้น (stem pubescence density)

- | | | |
|-------|---|------------------------|
| คะแนน | 3 | เล็กน้อย (sparse) |
| | 5 | ปานกลาง (intermediate) |
| | 7 | หนาแน่น (dense) |

1.4 ความยาวปล้อง (stem internode length)

- | | | |
|-------|---|------------------------|
| คะแนน | 3 | สั้น (short) |
| | 5 | ปานกลาง (intermediate) |
| | 7 | ยาว (long) |

1.5 ความหนาแน่นของใบ (foliage density)

- | | | |
|-------|---|------------------------|
| คะแนน | 3 | เล็กน้อย (sparse) |
| | 5 | ปานกลาง (intermediate) |
| | 7 | หนาแน่น (dense) |

1.6 จำนวนของใบใต้ช่อดอกแรก (number of leaves under 1st inflorescence)

- | | | |
|-------|---|------------|
| คะแนน | 3 | น้อย (few) |
| | 7 | มาก (many) |

1.7 การวางตัวของใบ (leaf attitude)

- | | | |
|-------|---|----------------------------|
| คะแนน | 3 | กึ่งตั้งตรง (semi-erect) |
| | 5 | ขนานกับพื้น (horizontal) |
| | 7 | ห้อยลง (drooping) |

1.8 ชนิดของใบ (leaf type) (รูป 5)

- | | | |
|-------|---|--------------------------------------|
| คะแนน | 1 | แคระ (dwarf) |
| | 2 | คล้ายใบมันฝรั่ง (potato leaf type) |
| | 3 | มาตรฐาน (standard) |
| | 4 | peruvianum |
| | 5 | pimpinellifolium |
| | 6 | hirsutum |
| | 7 | อื่นๆ (other) |

1.9 การหยักของใบ (degree of leaf dissection)

- | | | |
|-------|---|--------------------------|
| คะแนน | 3 | น้อย (low) |
| | 5 | ปานกลาง (intermediate) |
| | 7 | มาก (high) |

1.10 สีของสารแอนโทไซยานินที่เส้นใบ (anthocyanin colouration of leaf veins)

- | | | |
|-------|---|----------------------------|
| คะแนน | 1 | ไม่ชัดเจน (obscure vein) |
| | 2 | ปกติหรือชัดเจน (normal) |



รูป 5 ชนิดของใบมะเขือเทศ

2. ช่อดอกและผล (inflorescence and fruit)

2.1 ลักษณะช่อดอก (inflorescence descriptors)

2.1.1 ชนิดของช่อดอก (inflorescence type)

- คะแนน
- 1 ช่อดอกเดี่ยว (generally uniparous)
 - 2 มีทั้งช่อดอกเดี่ยวและช่อดอกแบบผสม (both partly uniparous, partly multiparous)
 - 3 ช่อดอกแบบผสม (generally multiparous)

2.1.2 สีกลีบดอก (corolla colour)

- คะแนน
- 1 สีขาว (white)
 - 2 สีเหลือง (yellow)
 - 3 สีส้ม (orange)
 - 4 สีอื่น ๆ (other)

2.1.3 ชนิดของกลีบดอก (corolla blossom type)

- คะแนน
- 1 ปิด (closed)
 - 2 เปิด (open)

2.1.4 ความยาวกลีบดอก (petal length, mm.)

2.1.5 ความยาวกลีบเลี้ยง (sepal length, mm.)

2.2 ลักษณะผล (fruit descriptors)

2.2.1 สีภายนอกของผลอ่อน (exterior colour of immature fruit)

- คะแนน
- 1 ขาวปนเขียว (greenish – white)
 - 3 เขียวอ่อน (light green)
 - 5 เขียว (green)
 - 7 เขียวเข้ม (dark green)
 - 9 เขียวเข้มมาก (very dark green)

2.2.2 แถบยาวสีเขียวที่ไหล่ผล (presence of green (shoulder) strip on the fruit)

- สัญลักษณ์
- 0 ไม่มี (absent)
 - 1 มี (present)

2.2.3 ความเข้มของไหล่เขียว (intensity of greenback)

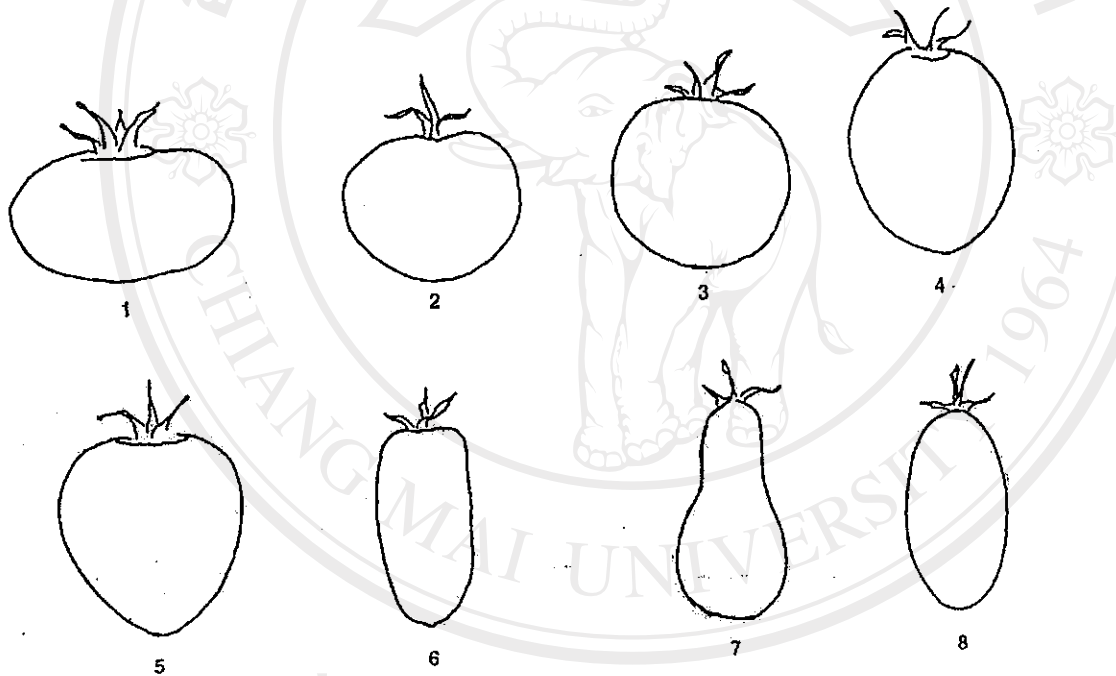
- คะแนน
- 3 น้อย (slight)
 - 2 ปานกลาง (intermediate)
 - 7 มาก (strong)

2.2.4 ขนอ่อนที่ผล (fruit pubescence)

- คะแนน
- 3 น้อย (sparse)
 - 3 ปานกลาง (intermediate)
 - 7 มาก (dense)

2.2.5 รูปร่างผล (predominant fruit shape) ระยะผลสุกแก่เต็มที่ (full maturity stage) (รูป 6)

- คะแนน
- 1 แบน (flattened)
 - 2 แบนเล็กน้อย (slightly flattened)
 - 3 กลม (rounded)
 - 4 กลมทรงสูง (high rounded)
 - 5 รูปหัวใจ (heart-shaped)
 - 6 รูปทรงกระบอก (cylindrical)
 - 7 รูปผลแพร์ (pyriform)
 - 8 รูปทรงรี (ellipsoid)
 - 9 อื่น ๆ (other)



รูป 6 รูปร่างผลของมะเขือเทศระยะผลสุกแก่เต็มที่

2.2.6 ขนาดผล (fruit size)

- คะแนน
- 1 เล็กมาก (very small ;< 3 cm.)
 - 2 เล็ก (small ;3 – 5 cm.)
 - 3 ปานกลาง (intermediate ;5.1 – 8 cm.)
 - 4 ใหญ่ (large ;8.1 – 10 cm.)
 - 5 ใหญ่มาก (very large ;> 10 cm.)

2.2.7 ความสม่ำเสมอของขนาดผล (fruit size homogeneity)

- คะแนน
- 1 น้อย (low)
 - 2 ปานกลาง (intermediate)
 - 3 มาก (high)

2.2.8 น้ำหนักผล (fruit weight; g.)

2.2.9 ความยาวผล (fruit length; mm.)

2.2.10 ความกว้างผล (fruit width; mm.)

2.2.11 สีภายนอกของผลสุก (exterior colour of mature fruit)

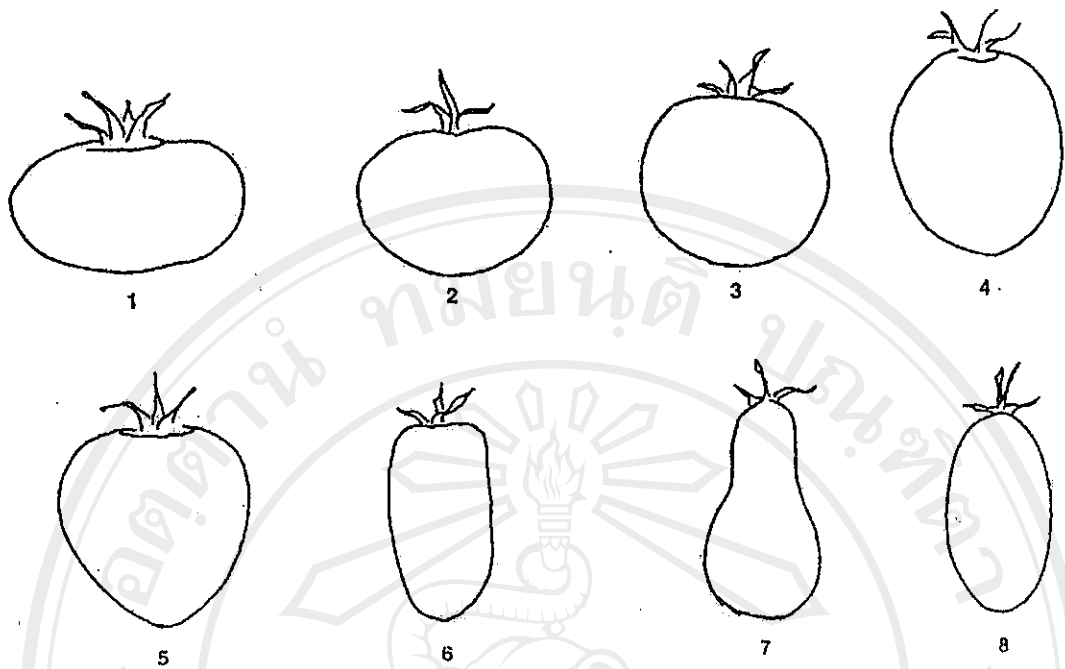
- คะแนน
- 1 เขียว (green)
 - 2 เหลือง (yellow)
 - 3 ส้ม (orange)
 - 4 ชมพู (pink)
 - 5 แดง (red)
 - 6 อื่น ๆ (other)

2.2.12 ความเข้มของสีภายนอก (intensity of exterior colour)

- คะแนน
- 3 อ่อน (light)
 - 5 ปานกลาง (intermediate)
 - 7 เข้ม (dark)

2.2.13 รูปร่างของผลในระยะที่สอง (secondary fruit shape) (รูป 7)

- คะแนน
- 1 แบน (flattened)
 - 2 แบนเล็กน้อย (slightly flattened)
 - 3 กลม (rounded)
 - 4 กลมทรงสูง (high rounded)
 - 5 รูปหัวใจ (heart-shaped)
 - 6 รูปทรงกระบอก (cylindrical)
 - 7 รูปผลแพร์ (pyriform)
 - 8 รูปทรงรี (ellipsoid)
 - 9 อื่น ๆ (other)



รูป 7 รูปร่างของผลในระยงที่ตอง

2.2.14 สันที่ปลายกลีบเลี้ยง (ribbing at calyx end)

- คะแนน
- 1 อ่อนมาก (very weak)
 - 2 อ่อน (weak)
 - 3 ปานกลาง (intermediate)
 - 4 แข็งแรง (strong)

2.2.15 ความง่ายในการหลุดออกจากก้านผล (easiness of fruit to detach from the pedicel)

- คะแนน
- 3 ง่าย (easy)
 - 5 ปานกลาง (intermediate)
 - 7 ยาก (difficult)

2.2.16 รูปร่างของไหล่ผล (fruit shoulder shape) (รูป 8)

- คะแนน
- 1 ราบ (flat)
 - 3 ลึกลงเล็กน้อย (slightly depressed)
 - 5 ลึกลงปานกลาง (moderately depressed)
 - 7 ลึกลงมาก (strongly depressed)



รูป 8 รูปร่างของไหลผล

2.2.17 ความยาวก้านผล (pedicel length, cm.)

2.2.18 ความยาวก้านผลจากข้อผล (pedicel length from abscission layer; cm.)

2.2.19 ข้อต่อของข้อผล (presence/absence jointless pedicel)

สัญลักษณ์ 0 ไม่มี (absent)

1 มี (present)

2.2.20 ความกว้างของแผลที่ข้อผล (width of pedicel scar; mm.)

คะแนน 3 แคบ (narrow)

5 ปานกลาง (medium)

7 กว้าง (wide)

2.2.21 ขนาดของคอร์ครอบ ๆ แผลที่ข้อผล (size of corky area around pedicel scar, mm.)

คะแนน 3 เล็ก (small)

5 ปานกลาง (intermediate)

7 ใหญ่ (large)

2.2.22 ความง่ายในการลอกเปลือก (easiness of fruit wall; skin to be peeled)

คะแนน 3 ง่าย (easy)

5 ปานกลาง (intermediate)

7 ยาก (difficult)

2.2.23 สีผิวของผลสุก (skin colour of ripe fruit)

- คะแนน 1 ไม่มีสี (colourless)
 2 สีเหลือง (yellow)

2.2.24 ความหนาของผนังผล (pericarp, mm.)

2.2.25 สีผนังผลเนื้อ (flesh colour of pericarp)

- คะแนน 1 เขียว (green)
 2 เหลือง (yellow)
 3 ส้ม (orange)
 4 ชมพู (pink)
 5 แดง (red)
 6 อื่น ๆ (other)

2.2.26 ความเข้มของสีเนื้อ (flesh colour intensity)

- คะแนน 3 อ่อน (light)
 5 ปานกลาง (intermediate)
 7 เข้ม (dark)

2.2.27 รูปร่างผลเมื่อตัดตามขวาง (fruit cross-sectional shape) (รูป 9)

- คะแนน 1 กลม (round)
 2 เหลี่ยม (angular)
 3 ไม่สม่ำเสมอ (irregular)



1



2



3

รูป 9 รูปร่างผลเมื่อตัดตามขวาง

2.2.28 ขนาดของแกนภายในผล (size of core)

2.2.29 จำนวนช่องภายในผล (number of locules)

2.2.30 รูปร่างของแผลที่เกิดจากเกสรเพศเมีย (shape of pistil scar) (รูป 10)

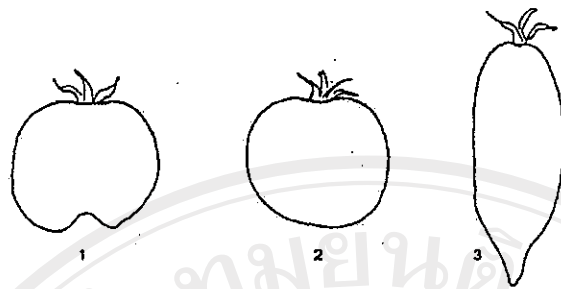
- คะแนน
- 1 จุด (dot)
 - 2 รูปดาว (stellate)
 - 3 รูปเส้นตรง (linear)
 - 4 ไม่สม่ำเสมอ (irregular)



รูป 10 รูปร่างของแผลที่เกิดจากเกสรเพศเมีย

2.2.31 รูปร่างของก้นผล (fruit blossom end shape) (รูป 11)

- คะแนน
- 1 เว้า (indented)
 - 2 เรียบ (flat)
 - 3 แหลม (pointed)



รูป 11 รูปร่างของก้นผล

2.2.32 รอยแผลที่ก้นผล (blossom end scar condition)

คะแนน

- 1 เปิด (open)
- 2 ปิด (closed)
- 3 มีทั้ง 2 แบบ (both)

2.2.33 ความแน่นเนื้อ (fruit firmness)

คะแนน

- 3 นุ่ม (soft)
- 5 ปานกลาง (intermediate)
- 7 แน่น (firm)

3. เมล็ด (seed)

3.1 รูปร่างเมล็ด

คะแนน

- 1 ค่อนข้างกลม (globular)
- 2 รูปไข่ (ovate)
- 3 สามเหลี่ยมมีก้นแหลม (triangular with pointed base)

3.2 สีของเมล็ด (seed colour)

คะแนน

- 1 เหลืองอ่อน (light yellow)
- 2 เหลืองเข้ม (dark yellow)
- 3 เทา (grey)
- 4 น้ำตาล (brown)
- 5 น้ำตาลเข้ม (dark brown)

4. ลักษณะอื่น ๆ (other)

- 4.1 จำนวนวันออกดอก 50 % (วัน)
- 4.2 ความสม่ำเสมอในการสุก
- 4.3 ผลผลิตรวม(กิโกรัมต่อไร่)
- 4.4 ค่าความเป็นกรดต่าง
- 4.5 ปริมาณน้ำตาล (องศาบริกซ์)
- 4.6 ปริมาณกรดรวมในรูปร้อยละของกรดซิตริก(เปอร์เซ็นต์)

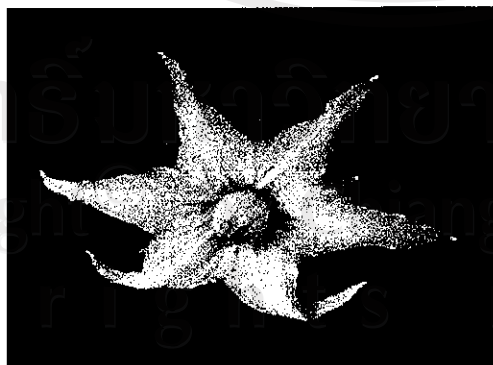
การทดลองที่ 2 ระดับไลโคปีนที่อายุผลต่าง ๆ

2.1 เตรียมแปลงปลูก

เตรียมแปลงจำนวน 27 แปลง ขนาดแปลง 1 x 3 เมตร โดยปลูก 2 แถว แถวละ 5 ต้น ระยะปลูกระหว่างแถว 60 เซนติเมตร ระหว่างต้น 35 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในบล็อก โดยที่การปลูกมะเขือเทศ 3 พันธุ์ คือพันธุ์ L-22, VF134 – 1 – 2 และพันธุ์ 502 x 667 มี 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำมีช่วงอายุผล 45, 55 และ 65 วัน ปลูกทดสอบที่แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.2 วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อสกัดไลโคปีน

เก็บตัวอย่างผลมะเขือเทศที่อายุผล 45, 55 และ 65 วัน โดยนับวันแรกที่ดอกบานเต็มที่ (รูป 12) เป็นวันที่ 1 โดยถือว่าเป็นวันที่ได้รับการผสม แล้วทำการติดป้าย ครอบกำหนดเก็บผลผลิต แปลงละ 10 ผล โดยเลือกเก็บเฉพาะผลที่ติดป้ายไว้



รูป 12 ดอกมะเขือเทศที่บ้านเต็มที

2.3 วิธีการสกัดไลโคปีน

ทำการสกัดไลโคปีนด้วยวิธีของ Magison and Blauch (2003) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำผลไม้เนื้อที่ได้ออกจากการเก็บตัวอย่าง ใส่เครื่องปั่น เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วปั่นให้ละเอียดโดยให้อยู่ในรูปของน้ำมะเขือเทศขุ่น (puree)
2. ชั่ง puree มา 40 กรัม เติมนิวเมธานอล (methanol) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้สักครู่
3. แล้วนำมากรองด้วย Buchner funnel ใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
4. นำสารละลายที่กรองได้เก็บไว้ในบีกเกอร์ ห่อกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันการออกซิไดซ์จากแสง
5. ส่วนของเศษที่อยู่บนกระดาษกรองนำมาสกัดซ้ำด้วยสารผสมระหว่างอะซิโตน (acetone) และเฮกเซน (hexane) ในอัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 70 มิลลิลิตร
6. นำไปกรองซ้ำอีกครั้งด้วย Buchner funnel กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ครั้งหลังนี้ไปผสมกับสารละลายที่กรองได้ในครั้งแรก คนให้เข้ากัน
7. นำส่วนผสมที่เข้ากันแล้วเทใส่ separatory funnel ที่ห่อฟอยล์ไว้
8. ทำการล้างอะซิโตนและเมธานอลออกด้วยน้ำกลั่น 50 และ 100 มิลลิลิตรอย่างละ 3 ครั้ง จะเห็นชั้นของสารละลายสีส้มใสอยู่ชั้นบน คือชั้นของเฮกเซนที่มีไลโคปีนละลายอยู่
9. เติมนิวโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ที่อิ่มตัวในเมธานอลปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
10. ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตรจำนวน 3 ครั้ง
11. เก็บชั้นเฮกเซนไว้ในขวดที่ปิดสนิท ห่อด้วยฟอยล์ เก็บไว้ในตู้เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

2.4 การวัดปริมาณไลโคปีน

1. นำสารไลโคปีนมาตรฐาน โอลีโอเรซิน (oleorasin) ความเข้มข้น 6 % w/w ชั่งมา 15 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลาย ในที่นี้ใช้เฮกเซน ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายไลโคปีนมาตรฐานมา 1, 0.75, 0.5, 0.25 และ 0.1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมหอกเซนให้ครบ 10 มิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นได้ 18, 13.5, 9, 4.5 และ 1.8 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
3. นำตัวอย่างไลโคปีนที่สกัดได้ มาปรับความเข้มข้นเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมและใกล้เคียงกับช่วงความเข้มข้นของสารละลายไลโคปีนมาตรฐานแล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง