

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ด

- (1) กล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ Sony รุ่น DSC-550
- (2) กล่องและถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างเห็ด
- (3) กระดาษบันทึกข้อมูลเห็ดในสนาม ปากกาและดินสอ
- (4) คู่มือการจำแนกชนิดเห็ดเพิ่มเติม
- (5) Gel Electrophoresis
- (6) สารเคมี Ethyl Alcohol
- (7) เครื่องวัดความชื้นในดิน
- (8) ปริ้นเตอร์ ยี่ห้อ HP

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์เห็ด

- (1) กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา ยี่ห้อ Nikon รุ่น Eclipse E 400 และ Eclipse E 600
- (2) กล้องจุลทรรศน์ Stereo กำลังขยาย 5 และ 10 เท่า ยี่ห้อ Nikon รุ่น SMZ-2B
- (3) แว่นขยาย กำลังขยาย 10 เท่า
- (4) ปากคีบ, เข็มเขี่ย
- (5) สไลด์และกระจกปิดสไลด์

(6) กล้องถ่ายรูป Minolta รุ่น X700 และกล้องดิจิทัล Still camera ยี่ห้อ Sony รุ่น

DSC-550

(7) กระดาษสีขาวและสีดำ ขนาด 5x5, 7x7, 9x9 cm² สำหรับการพิมพ์สปรอ

(8) ตัวอย่างของเห็ดที่เก็บได้

(9) คู่มือการจำแนกชนิด, ระบุวิธานเพื่อใช้ในการตรวจเอกลักษณ์เห็ด

(10) แบบข้อมูลการจำแนกชนิด

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างเห็ด

(1) ขวดแก้วสำหรับการดองเห็ด

(2) กล่องพลาสติก

(3) ตู้อบแห้ง

(4) ฟอรัมาลิน

(5) เอทิล แอลกอฮอล์

(6) น้ำกลั่น

(7) ซองกระดาษ ขนาด 3x4 นิ้ว สำหรับการเก็บรักษาเห็ดแห้ง

(8) กระดาษขาว ขนาด 5x7 นิ้ว สำหรับบันทึกรายละเอียดของเห็ด

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

3.2.1 ประชากรที่ทำการศึกษา

เห็ดที่เกิดในบริเวณอุทยานแห่งชาติภูพาน อ.ภูพาน จ.สกลนคร

3.2.2 กลุ่มตัวอย่าง

เห็ดที่พบและเก็บได้จากในบริเวณอุทยานแห่งชาติภูพาน อ.ภูพาน จ.สกลนคร

3.2.3 ตัวแปรที่ทำการวิจัย

3.2.3.1 ตัวแปรอิสระ ได้แก่ เห็ดที่เกิดในบริเวณอุทยานแห่งชาติภูพาน อ.ภูพาน

จ.สกลนคร

3.2.3.2 ตัวแปรตาม ได้แก่ อุณหภูมิ ความหนาแน่น สีหรือสีที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อถูกตัดหรือขยี้ให้ฉีกขาด กลิ่นของสปอร์ สีของสปอร์โดยใช้แว่นขยาย การเรืองแสงในที่มืดหรือเวลากลางวัน ความเป็นกรด-ด่าง ของดิน ความชื้นของดิน ลักษณะของเส้นใยของเห็ด อุณหภูมิ ความเข้มของแสง

3.2.5.1 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1) พื้นที่ป่าและชุมชนที่ศึกษาวิจัย (ป่าดิบแล้งในอุทยานแห่งชาติภูพาน)

การเลือกพื้นที่เหมาะสมเพื่อทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดกินได้และเห็ดพิษ นั้น จำต้องเข้าใจและรู้จักชนิดของป่า ช่วงเวลา ฤดูกาลที่มีฝนตกมาลหรือฝนตกน้อย เนื่องจากเห็ดที่พบ ในธรรมชาติของไทยนั้นมีจำนวนมาก การออกดอกเห็ดมักขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนและระบบนิเวศของป่า ในที่นี้ผู้วิจัยเลือกพื้นที่ป่าอุทยานแห่งชาติภูพาน อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร ดังนั้นจึงได้ กำหนดพื้นที่ ศึกษา จำนวน 1 แปลง โดยวิธีการสุ่ม (random sampling) ขนาดของแปลง 100 x 100 เมตรและ 10x1,000 เมตร และวิธีการสุ่ม (Shimwell, 1971) ได้สรุปการวางแปลงตัวอย่างไว้ 5 วิธีการ คือ 1) วาง แปลงตัวอย่างขนาดใหญ่เพียงแปลงเดียวที่คิดว่าเป็นตัวแทนที่ดีของสังคม เรียกวิธีการนี้ว่า Relve method (ข้อจำกัดวิธีการนี้ หมู่ไม้หรือสังคมต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด) 2) วางแปลงตัวอย่างลงในพื้นที่ โดยให้ทุกส่วนของพื้นที่มีโอกาสได้รับเลือกเท่าๆ กัน (random sampling) 3) การวางแปลงตัวอย่าง โดย การกำหนดบางส่วนและเป็นการสุ่มเลือกให้มีโอกาสเท่ากันบางส่วน (stratified random sampling) 4) การ วางแปลง โดยให้มีระยะเท่าๆ กันในแผนที่ที่กำหนดไว้ (Systematic sampling) และ 5) วางแปลง ต่อเนื่องกัน ไปเป็นแนวยาวในรูปของแถบพื้นที่ (belt transect sampling)

2) ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ด

2.1) กำหนดแปลงศึกษาโดยการสุ่มตัวอย่างแปลง 1 แปลง ขนาด 100 x 100 เมตร และ 10x1,000 เมตร จำนวน 1 แปลง ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ด เดือนละ 1-2 ครั้ง โดยเก็บเดือน ละ 2 ครั้งในเดือน มิถุนายน กรกฎาคม และสิงหาคม

2.2) บันทึกภาพของเห็ดที่พบในสภาพธรรมชาติ ลักษณะทางนิเวศวิทยา ก่อนที่จะ ทำการเก็บตัวอย่างเห็ด โดยใช้กล้องถ่ายภาพชนิดคิดเลนส์ถ่ายใกล้ได้ และกล้องดิจิทัล ทำให้ สามารถเก็บภาพ ลักษณะรูปร่าง แหล่งกำเนิดหรือถิ่นที่อยู่อาศัย สีของเห็ดแต่ละชนิด รวมทั้งต้นไม้ที่ขึ้น นอยู่บริเวณโดยรอบของเห็ด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนก

2.3) วิธีการเก็บตัวอย่างของเห็ด สิ่งที่ต้องคำนึงให้มากที่สุด ในการเก็บตัวอย่าง เห็ด คือ จะต้องเก็บเห็ดให้มีโครงสร้างที่สมบูรณ์ที่สุด และเก็บเห็ดที่มีขั้นตอนหลายๆระยะ จึงใช้หลาย วิธีเพื่อให้เหมาะสมแต่ละชนิด ได้แก่ ใช้มือถอน มีคปลายแหลม เสียม ซ้อน

2.4) จดบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ของเห็ดแต่ละชนิดอย่างละเอียด จำต้องรีบจดบันทึก ลักษณะโครงสร้างต่างๆ ไว้เร็วที่สุด เพราะเห็ดอาจเกิดการเน่าทำให้รูปร่างเปลี่ยนไปหรือเปลี่ยนแปลงสีได้ รายละเอียดข้อมูลที่บันทึกได้แก่

ประเภทของอินทรีย์วัตถุที่เห็ดขึ้นอยู่ เช่นดิน มูลสัตว์ เนื้อไม้ เปลือกไม้ ต้นไม้ ที่มีชีวิต ซากสัตว์ ฯลฯ

- สีหรือสีที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อถูกตัดหรือขยี้ให้ลึกซึ้ง
- กลิ่นของสปอร์
- สีของสปอร์โดยใช้แว่นขยาย
- การเรืองแสงในที่มืด หรือเวลากลางวัน
- ความเป็นกรด – ด่าง ของดิน
- ความชื้นของดิน
- ลักษณะของเส้นใยของเห็ด
- อุณหภูมิ
- ความเข้มของแสง
- วันที่ สถานที่ และชื่อของผู้เก็บตัวอย่างเห็ด

3) ทำการพิมพ์สปอร์ เพื่อศึกษารูปร่างและสีของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอหรือกล้องจุลทรรศน์ชนิดสองตา วิธีพิมพ์สปอร์ โดยการตัดก้านของเห็ดให้เกือบชิดหมวกเห็ดและเอาหมวกเห็ดคว่ำลงบนกระดาษสีขาวและสีดำ วางไว้ในที่ไม่มีลมพัดหรือใช้บีกเกอร์ขนาดใหญ่เท่าหมวกเห็ดคว่ำไว้ก็ได้ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 - 10 ชั่วโมง ผงสปอร์จะตกลงบนกระดาษ นำหมวกเห็ดออกก็จะเห็นผงสปอร์และสีของสปอร์ รูปร่างและสีของสปอร์นี้เป็นสิ่งที่จะช่วยในการจำแนกชนิดของเห็ดได้ ทั้งนี้เพราะเห็ดแต่ละชนิด จะมีรูปร่างสปอร์และสีของสปอร์แตกต่างกันซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของเห็ดแต่ละชนิด

4) การตรวจเอกลักษณ์ของเห็ดตัวอย่าง ตามหลักอนุกรมวิธาน

ได้ทำการศึกษาค้นคว้าและจัดรวบรวมกลุ่มหรือหมู่ต่างๆ จากตัวอย่างเห็ดเท่าที่สามารถรวบรวมได้ โดยใช้ลักษณะที่เหมือนกันใช้เป็นชนิดเดียวกัน ลักษณะที่คล้ายคลึงกันให้อยู่ใน

สกุลเดียวกันและลักษณะคล้ายกันลดลงไปให้อยู่ในระดับลดลงไปให้อยู่ในระดับถัดไปตามหน่วยของการจำแนกที่สูงขึ้นไป การตรวจสอบชนิดและการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ทำได้ 3 วิธี

4.1) สัมภาษณ์หรือสอบถามจากชาวบ้านที่อยู่ในท้องถิ่นนั้น ที่มีความรู้ความชำนาญเรื่องเห็ดเป็นอย่างดีหรือภูมิปัญญาท้องถิ่น วิธีนี้ทำให้ทราบชื่อพื้นเมืองของเห็ดแต่ละท้องถิ่น จะเรียกชื่อแตกต่างกันออกไป เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดและทำให้ทราบชื่อเห็ดได้รวดเร็ว แต่อาจจะเป็นข้อมูลที่ไม่ถูกต้องนักเป็นการสอบถามเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นจะต้องตรวจสอบข้อมูลให้ถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง จากตำราหรือหนังสือต่าง ๆ เกี่ยวกับการจำแนกเห็ด

4.2) ขอคำแนะนำและสอบถามจากนักวิชาการหรือผู้เชี่ยวชาญด้านเห็ด เมื่อมีปัญหาสงสัยหรือไม่แน่ใจในตัวอย่างเห็ดชนิดนั้น ๆ

4.3) ตรวจรายชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดด้วยตนเอง ศึกษาลักษณะโครงสร้างอย่างละเอียด ลักษณะนิสัย ถิ่นกำเนิดหรือถิ่นที่อยู่อาศัย และนำข้อมูลที่ได้อไปเปรียบเทียบกับจากรูปตัวอย่างเห็ดจากหนังสือต่าง ๆ เช่น เห็ดเมืองไทย : เทคโนโลยีการเพาะเห็ด (อนงค์, 2544) เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย (ราชบัณฑิตยสถาน, 2539) รวมถึงการใช้จุลทรรศน์กล้องจุลทรรศน์เห็ดและราในประเทศไทย (มรกต, 2544)

4.4) เพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเลี้ยง (Tissue culture) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ของ Ectomycorrhiza

4.5) หาคความสัมพันธ์ของชนิดพืชและการเจริญเติบโตของเส้นใย (Ectomycorrhizal Association)

4.6) Scanning Micrograph ของสปอร์เห็ดบางชนิดที่สำรวจพบ

4.7) ทา Molecular Karyotype ของเห็ด Ectomycorrhiza บางชนิด ใน Family Amanitaceae และ Family Boletaceae

3.2.5.2 การเก็บรักษาตัวอย่างเห็ด

เห็ดมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันไป เนื้อเห็ดก็มีความนุ่มหรือความแข็งแตกต่างกันไปด้วยจึงต้องมีการรักษาสภาพเห็ดไว้ให้เหมือนกับพบเห็ดตามธรรมชาติให้มากที่สุดซึ่งมีหลายวิธีด้วยกัน แต่ที่นิยมใช้คือ

(1) วิธีคองด้วยน้ำยา วิธีนี้เป็นวิธีที่รักษาสภาพเห็ดได้ดี ขนาดไม่เปลี่ยนแปลงไปมากนัก แต่มีข้อเสียคือ ทำให้สีเดิมของเห็ดเปลี่ยนไปและน้ำยาที่คองจะต้องมีการเปลี่ยนน้ำยาบ่อย ๆ เมื่อน้ำยามีการเปลี่ยนและเปลี่ยนสภาพเกิดขึ้น น้ำยาที่ใช้คองเห็ดมีหลายชนิด ชนิดคองง่ายและเป็นที่ยอมรับใช้มีส่วนประกอบดังนี้

ฟอร์มาลิน	30	มิลลิลิตร
เอทิลแอลกอฮอล์ 90%	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2,000	มิลลิลิตร

(2) วิธีการตากแห้ง ตากด้วยแสงแดดประมาณ 1-3 วัน แล้วเก็บใส่ภาชนะให้มิดชิด

(3) วิธีการอบ อบในตู้ใช้อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน

ทั้ง 2 วิธีหลังนี้นิยมใช้กับเห็ดที่มีเนื้อเห็ดไม่อวบน้ำและแข็ง เช่น เห็ดกระด้าง เป็นต้น

3.3 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการสิ่งแวดล้อม ชั้น 4 ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร