

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์การวิจัย

การสำรวจไลเคนบริเวณป่าพรุในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี มีอุปกรณ์การวิจัย ในภาคสนามและในภาคห้องปฏิบัติการดังนี้

1.1 ภาคสนาม

- (1) แผ่นภาพไลเคน
- (2) ตลับเมตร
- (3) เชือกฟาง ขนาด 2 x 2 เมตร
- (4) มีดคัตเตอร์และกรรไกร
- (5) กล้องดิจิทัล
- (6) แวนขยาย
- (7) สายวัดตัว
- (8) ทิชชู
- (9) ซองกระดาษใส่ตัวอย่าง
- (10) อุปกรณ์ตรวจจับ GPS ยี่ห้อ Garmin รุ่น Etrex
- (11) เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น ยี่ห้อ STANDARD รุ่น ST-8820
- (12) เครื่องวัดความเข้มแสง ยี่ห้อ Delta OHM รุ่น HD 9021
- (13) กระบอกฉีดน้ำ
- (14) แบบฟอร์มการบันทึกผล และ
- (15) เครื่องเขียนต่างๆ เช่น ปากกา ดินสอ ยางลบ ไม้บรรทัด ฯลฯ

1.2 ภาคห้องปฏิบัติการ

- (1) ตัวอย่างไลเคนในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชฯ
- (2) กล้องจุลทรรศน์รุ่น CH30 ยี่ห้อ Olympus
- (3) กล้องดิจิทัล
- (4) Slide และ Cover Slide
- (5) ปากคีบ
- (6) มีดคัตเตอร์และใบมีดโกน

(7) หนังสือไลเคน เช่น หนังสือความหลากหลายของไลเคนป่ากุดจับ จังหวัดอุดรธานี และความหลากหลายของไลเคน ป่าดงภู จังหวัดศรีสะเกษ (สุรางค์ เขียรศิริธัญ และคณะ, 2554ก) ความหลากหลายของไลเคนป่าเขากระยาง จังหวัดพิษณุโลก (สุรางค์ เขียรศิริธัญ และคณะ, 2554ข) ความหลากหลายของไลเคนป่าภูค้ำบก จังหวัดร้อยเอ็ด (สุรางค์ เขียรศิริธัญ และคณะ, 2554ค) ไลเคนแห่งเกาะแสมสารจากยอดเขาถึงชายทะเล (กัณฑ์ชัย บุญประกอบ และกวิณนาถ บัวเรือง, 2550) และคู่มือนักสืบสายลม (สรณรัชฎ์ กาญจนะวณิช, 2553) เป็นต้น

2. สารเคมี

- 2.1 Sodium Hypochlorite (NaOCl)
- 2.2 Potassium Hydroxide (KOH)
- 2.3 Paraphenylenediamine (Pd)
- 2.4 Ethanol 95%
- 2.5 Iodine (I)
- 2.6 Potassium Iodide (KI)

3. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาภาคสนาม โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไลเคนบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติบริเวณป่าพรุในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชฯ รวมระยะทาง 220 เมตร ดังภาพที่ 3.1 ในช่วงเดือนมกราคมถึงตุลาคม 2561 โดยมีวิธีการศึกษา ดังนี้



ภาพที่ 3.1 การวางจุดเก็บตัวอย่างบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชฯ

3.1.1 สํารวจพื้นที่ป่าพรุบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ โดยเก็บตัวอย่างไลเคนบน ต้นไม้ที่ขึ้นทั้งทางด้านซ้ายและขวาของเส้นทางเดิน โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

1) ในพื้นที่เส้นทางเดินที่สร้างด้วยแผ่นคอนกรีต จะเก็บตัวอย่างไลเคนที่เปลือก ต้นไม้ในระดับความสูงตั้งแต่พื้นแผ่นคอนกรีตขึ้นไปจนถึงความสูงประมาณ 2 เมตร

2) ในพื้นที่เส้นทางเดินบนพื้นดิน จะเก็บตัวอย่างไลเคนที่เปลือกต้นไม้ตั้งแต่ระดับ พื้นดินขึ้นไปจนถึงความระดับ 2 เมตร

3.1.2 วัดตำแหน่งทางภูมิศาสตร์อุณหภูมิ ความชื้น และความเข้มแสง

3.1.3 ใช้สายวัดตัววัดเส้นรอบวงของต้นไม้ และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไลเคน

3.1.4 บันทึกภาพไลเคนชนิดต่าง ๆ ที่ทำการสำรวจ

3.1.5 ฉีดน้ำประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้แทลัสส์อ่อนตัว และสามารถเห็นชั้นสาหร่ายได้ อย่างชัดเจนโดยใช้แว่นขยาย

3.1.6 ใช้มีดคัตเตอร์ ตัดส่วนที่ไลเคนยึดเกาะ

3.1.7 ห่อด้วยทิชชู ใส่ช่องเก็บตัวอย่างขนาด 13 x 20 เซนติเมตร

3.1.8 บันทึกข้อมูลสภาพพื้นที่ ได้แก่ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บตัวอย่างไลเคน ชื่อต้นไม้ ขนาด เส้นรอบวง จำนวนไลเคน (จุด) อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มแสง ตำแหน่งภูมิศาสตร์ และชื่อผู้เก็บ ตัวอย่างไลเคน

3.2 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ (Laboratory Study) จากตัวอย่างไลเคนในข้อ 2.1 นำมา ศึกษาโครงสร้างภายนอก ดังนี้

3.2.1 นำตัวอย่างไลเคนจาก ข้อ 3.1 มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4X 10X และ 40X เพื่อดูลักษณะโครงสร้างที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3.2.2 นำตัวอย่างไลเคนมาตัดตามขวาง (X-Section) จากนั้นส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยาย 10X และ 40X เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างภายในและสปอร์ของไลเคน

3.2.3 ทำการบันทึกภาพ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.4 จำแนกชนิดของไลเคนจากหนังสือ

3.2.5 ศึกษาส่วนประกอบทางเคมีเบื้องต้นของไลเคนด้วยการทำ Spot Test

3.3 การเตรียมสารเคมี

3.3.1 Sodium Hypochlorite (NaOCl)

3.3.2 Potassium (K) 10 กรัม นำไปละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลาย Potassium Hydroxide (KOH)

3.3.3 สารละลายอิมิตัวของผลึก Paraphenylenediamine (Pd) 2-3 เกล็ดใน Ethyl Alcohol 95% ปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร ต้องเตรียมทุกวันที่ใช้ (เป็นสารก่อมะเร็ง)

3.3.4 สารละลายไอโอดีน (I) ซังเกล็ดไอโอดีน (I) 0.5 กรัม ในสารละลายโปแตสเซียมไอโอดีน (Potassium Iodine) ซึ่งเตรียมได้จากการละลาย KI 1.5 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร สารละลายนี้ใช้ทดสอบผนังแอสคัส (Ascus) และบริเวณตอนปลายของแอสคัสที่เรียกว่า ธอลัส (Tholus) ซึ่งเกิดสีน้ำเงินกับสารอะไมโลส (พวกแป้ง) (กัณฑ์ชัย บุญประกอบ และกวิณนาถ บัวเรือง, 2550 : หน้า 1-20)

3.4 การทดสอบสี

นำชิ้นส่วนของไลเคนมาวางบนกระดาษสีขาว จากนั้นหยดสารเคมีแต่ละชนิดเพื่อทดสอบสารสีในไลเคน โดยมีการทดสอบสารสีแต่ละชนิด และทำการจดบันทึกชนิดของไลเคน ดังนี้

3.4.1 C-Test (สำหรับการทดสอบ Hypothamnolic Acid) โดยการหยดสาร Sodium Hypochlorite จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกตการเปลี่ยนสี (สีชมพู – สีแดง)

3.4.2 K-Test (สำหรับการทดสอบสาร Anthraquinones) โดยการหยดสาร Potassium hydroxide จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกตการเปลี่ยนสี (สีแดงเข้ม – สีม่วง)

3.4.3 Pd-Test (สำหรับการทดสอบ Norstictic Acid) โดยการหยดสารละลาย Paraphenylenediamine จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกตการเปลี่ยนสี (สีเหลือง - สีแดง)

3.4.4 KC-Test (สำหรับการทดสอบ Usnic Acid) โดยการหยดสาร Potassium Hydroxide จำนวน 1 หยด และ Sodium Hypochlorite จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกตการเปลี่ยนสี (สีส้ม – สีแดง)

3.4.5 I-Test (สำหรับทดสอบ Ascus และ Tholus) โดยการหยดสาร Potassium Iodide จำนวน 1 หยด ลงบนไลเคน สังเกตการเปลี่ยนสี (สีน้ำเงิน)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาและทำการสำรวจเก็บตัวอย่าง มาจำแนกตามอนุกรมวิธานของ กัณฑ์ชัย บุญประกอบ และกวิณนาถ บัวเรือง (2550) สรณรัชฎ์ กาญจนะวณิช (2553) พชร มงคลสุข และสัญญา มีสีม (2555) สุรางค์ เขียวหิรัญ, วีรณา สมพิร์วงศ์, นิดดา แป้นนางรอง และกรรณิการ์ เอียดรา (2554ก; 2554ข; 2554ค) เป็นต้น โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะโครงสร้างของแทลัสภายนอก และตรวจสอบลักษณะทางกายวิภาควิทยา (Anatomy) โดยการตัดตามขวางของแทลัสและโครงสร้างสืบพันธุ์เพื่อศึกษาโครงสร้างภายใน และลักษณะของสปอร์ พร้อมกับการทดสอบหยดสี (Spot test) บนแทลัส

4.2 รวบรวมข้อมูลและผลที่ได้มาอภิปราย และสรุปผลวิจัย เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายของไลเคนในพื้นที่ป่า จากนั้นบ่งชี้คุณอากาศเบื้องต้นตามคู่มือการจำแนกไลเคน