

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

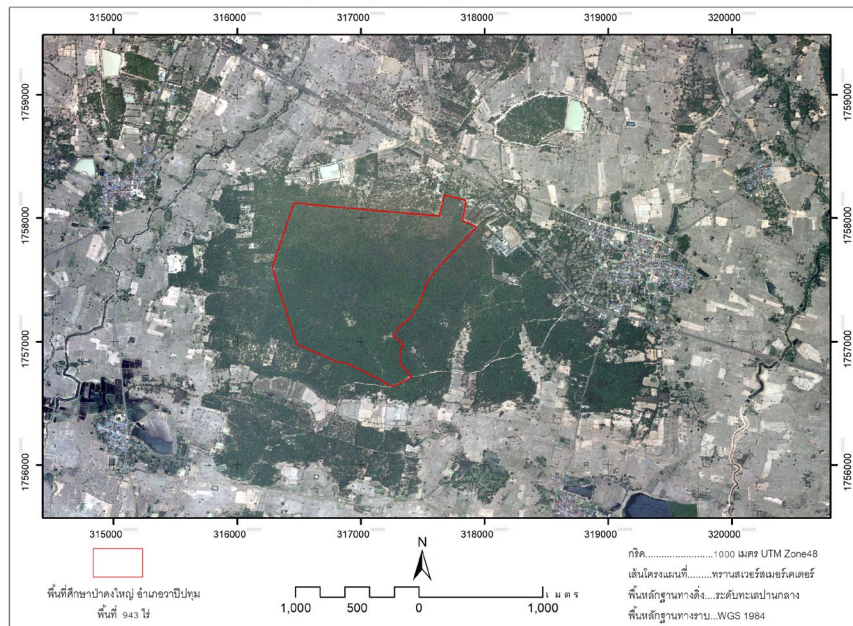
วิธีการดำเนินการวิจัย พื้นที่ป่า

ป่าไม้ประเภทเต็ง รัง โดยมีไม้ป่าจำพวกต้นเต้า ต้นแดง ต้นชาด ต้นจิก ต้นยูคา
ลักษณะป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รายละเอียดดังตาราง ที่ 3.1 และภาพที่ 3.1-3.3

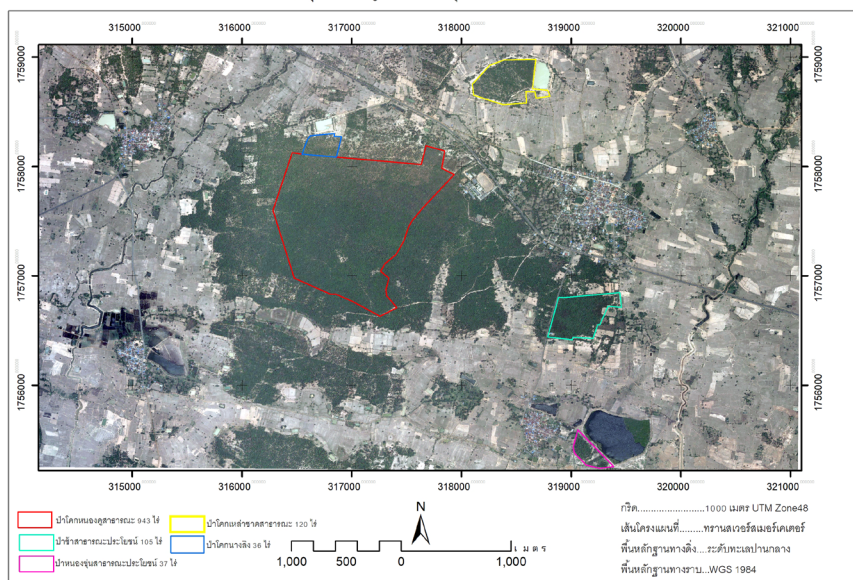


ภาพที่ 3.1 ลักษณะป่าดงใหญ่ ต.ดงใหญ่ อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม

พื้นที่ป่าชุมชนดงใหญ่ อำเภอวาริชภูมิ จังหวัดมหาสารคาม



พื้นที่ป่าชุมชนดงใหญ่ อำเภอวาริชภูมิ จังหวัดมหาสารคาม



ที่มา : <https://www.google.co.th/maps/search>

13.1 การสำรวจภาคสนาม

ศึกษาบริบทของป่าดงใหญ่ ในด้านต่าง ๆ โดยการจัดเวทีชาวบ้านที่อยู่บริเวณป่าชุมชน เพื่อร่วมกันวางแผนการออกสำรวจให้ร่วมกัน

13.2. สำรวจพื้นที่วิจัย

การสำรวจความหลากหลายของเห็ดจะใช้เทคนิคการสำรวจตามเส้นทางศึกษาธรรมชาติ สภาพพื้นที่ป่าชุมชน และสัมภาษณ์ประชาชนในชุมชน เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดจุดสำรวจความหลากหลายของชนิดเห็ดป่า

13.3. การสำรวจและการเก็บตัวอย่างเห็ด

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดทุกชนิดในป่าชุมชน โดยเริ่มสำรวจในเดือน พฤษภาคม พ.ศ.2559 ถึงเดือนธันวาคม 2560 โดยออกเก็บตัวอย่างเดือนละ 2 ครั้ง ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะเก็บรายละเอียดลักษณะทางนิเวศวิทยาของเห็ด ก่อนที่จะทำการเก็บตัวอย่างเห็ด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนก และวิธีการเก็บตัวอย่างจะต้องเก็บเห็ดให้มีโครงสร้างที่สมบูรณ์มากที่สุด ทำการบันทึกภาพ เก็บตัวอย่างโดยใช้พลั่วมือหรือมีดปลายแหลม แซะดอกเห็ดออกจากแหล่งที่พบ ใส่ในถุงกระดาษ เพื่อนำกลับมาตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาในห้องปฏิบัติการ

13.4. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดในห้องปฏิบัติการ

1. ในการตรวจสอบชนิดและชื่อของเห็ด เบื้องต้นจะสัมภาษณ์หรือสอบถามจากชาวบ้านที่อยู่ในท้องถิ่นที่มีความรู้ความชำนาญเรื่องเห็ดเป็นอย่างดี ทำให้ทราบชื่อพื้นเมืองของเห็ดเป็นวิธีที่ง่ายและทำให้ทราบชื่อเห็ดได้เร็วเร็ว แต่อาจได้ข้อมูลไม่ถูกต้อง
2. สอบถามจากนักวิชาการหรือผู้เชี่ยวชาญด้านเห็ด
3. ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ โดยการนำตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้มาศึกษาทางลักษณะสัณฐาน เช่น ลักษณะหมวก ครีบ สี ความสูงของก้าน ด้ายตาเปล่า แวนขยายและไตกล้องเตอริโอระบบูสีของดอกเห็ด โดยใช้แผ่นเทียบสีของ Kangsadal Books Publishing ปี ค.ศ.1996 ดอกเห็ดบางชนิดต้องนำมากรีดทำแผลเพื่อดูการหลังของสารทางบาดแผล ตรวจสอบโครงสร้างภายในดอกเห็ด และสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดชนิดใช้แสง (Light microscope) และทดสอบเห็ดบางชนิดด้วยน้ำยา Melzer's เพื่อมาจัดจำแนกอนุกรมวิธานเห็ดตาม เกษม, 2537; อนงค์, 2544; 2551; นิวัฒน์, 2553; Arora, 1987; กรมอุทยานฯ, 2553; Royal Institute, 1996; Largent et al. 1973; Ruksawong and Flegel, 2001; Pegler, 1997

13.5. การศึกษาทางด้านอณูชีววิทยา (Molecular Biology)

1. การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1. ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (RBC Bioscience Corp.) แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer 2 ชุด คือ ITS1: 5'- TCCGTA GGTGAACCTGCGG -3' and ITS4: 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3' (Fischer, 2004; White et al., 1990) ในแต่ละปฏิกิริยา PCR ใช้ปริมาตรรวมของสารละลายเป็น 50 μ l ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 2 μ l, 1x reaction buffer, Mgcl₂ 1.5 mM, 0.2 mM dNTP, primer 2.5 μ M, Taq 0.4 units (diluted 1 : 20 in ddH₂O) ใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาภายใต้เครื่อง thermal cycler ดังนี้

ขั้นที่ 1 : 95 °C 2 นาที; จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 2 : 94 °C 45 วินาที, 50 °C 45 วินาที, 72 °C 45 วินาที; จำนวน 36 รอบ

ขั้นที่ 3 : 72 °C 5 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยหยอดสารละลายปริมาตร 5 μ l ลงบนแผ่นเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% ที่มีเอธิเดียมโบรไมด์ 0.125 μ g/ml แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 V นานประมาณ 50 นาที (Sambrook et al., 1989) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่เหลือจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ Macrogen (Seoul, Korea)

2. การวิเคราะห์ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) ด้วยโปรแกรม MEGA 7 (Tamura et al., 2017)

13.6 การศึกษาข้อมูลภูมิปัญญาการใช้ประโยชน์

1. ศึกษาภูมิปัญญาการใช้ประโยชน์จากเห็ดโดยจัดประชุมผู้รู้เกี่ยวกับเห็ดในชุมชน โดยใช้เทคนิคการสัมภาษณ์จากกลุ่มเป้าหมาย คือ ปราชญ์ชาวบ้าน หมอยา และผู้นำชุมชน เพื่อสอบถามข้อมูลเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากเห็ดในประเด็นต่าง ๆ ดังนี้ วิธีการเก็บเห็ดป่า ช่วงฤดูกาลในการเก็บเห็ดป่าบริเวณและพื้นที่เก็บเห็ดป่า วิธีการถ่ายทอดภูมิปัญญาในการเก็บเห็ดป่า ความเชื่อในการเก็บเห็ดป่า ภูมิปัญญาท้องถิ่นกับการบริโภค ภูมิปัญญาท้องถิ่นในการแลกเปลี่ยนสินค้า และการใช้ประโยชน์เห็ดป่า อ้างอิงจาก ละออศรี เสนาะเมือง และคณะ, 2554; พวงพกา แก้วกรม แลคณะ, 2556)