บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 ศึกษาจำนวนและความหนาแน่นของกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนางในแต่ละพื้นที่

1.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. เสียม และช้อนปลูก
2. ถุงพลาสติก และยางรัด
3. กล้องถ่ายรูป
4. สมุดบันทึก ดินสอ และปากกา
5. ฉลากติดรหัสตัวอย่างต้นพืช
6. เชือกฟาง
7. สายวัดยาว 50 เมตร
8. เชือกขนาดยาว 40 เมตร จำนวน 4 เส้น
9. ไม้หลักยาว 1 เมตร จำนวน 4 อัน

1.2 วิธีการทดลอง

ทำการวางแปลงสำรวจขนาด 40 × 40 เมตร ในพื้นที่ศึกษาทั้งหมด 3 พื้นที่คือ ป่าเบญจ-พรรณ บริเวณศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ ป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณ (ป่าไผ่) บริเวณวัดพระธาตุดอยคำ บันทึกจำนวนชนิดและเก็บตัวอย่างว่านจูงนางในแต่ละพื้นที่มาบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนางแต่ละพื้นที่และนับจำนวนต้นของว่านจูง-นางในแต่ละชนิดในแต่ละพื้นที่เพื่อคำนวณค่าความหนาแน่น

การทดลองที่ 2 ศึกษาปัจจัยทางกายภาพต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนางในสภาพธรรมชาติ

2.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความสูงของพื้นที่ (Altimeter)
2. เครื่องวัดพิกัดตำแหน่งของพื้นที่ (GPS)
3. เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ (Wet – dry thermometer)

4. เครื่องวัดอุณหภูมิดิน (Soil thermometer)

5. เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)

6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

7. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

8. ตู้อบ (hot air oven)

9. ถุงเก็บตัวอย่างพืช

10. ไม้บรรทัด

11. กระดาษกรอง (Whatman No. 5)

12. โกร่งบดตัวอย่างดิน

13. ตะแกรงร่อนดิน ขนาด 2 มิลลิเมตร และ 500 ไมโครเมตร

14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HITACHI รุ่น U-1000

15. เครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ของบริษัท PERKIN ELMER รุ่น 3100

16. เตาย่อย ของบริษัท Gerhardt รุ่น Kjeldatherm KB/KBL

17. เครื่องกลั่นไนโตรเจน ของบริษัท Gerhardt รุ่น Vapodest 30

18. เครื่องชั่งสาร

19. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)

20. วัสดุเครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปต หลอดทดลอง ขวดปรับปริมาตร แท่งแก้วคน กรวย กระบอกตวง

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน

2.2.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน

1. Potassium Dichromate ($K_2Cr_2O_7$)
2. Sulfuric acid (H_2SO_4)
3. Ferrous Sulfate (Fe_2SO_4)
4. O-phenanthroline ferrous complex

2.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจนในดิน

1. Sulfuric acid (H_2SO_4)
2. Hydrogen peroxide (H_2O_2)
4. Sodium hydroxide (NaOH)
5. Ethanol (C_2H_5OH)

6. Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)

7. Bromocresol green ($C_{21}H_4Br_4O_5S$)

8. Boric acid (H_3BO_3)

9. Hydrochloric acid (HCl)

10. Selenium powder (Se)

11. Salicylic acid powder (HOC_6H_4COONa)

2.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ธาตุฟอสฟอรัสในดิน

1. Sulfuric acid (H_2SO_4)

2. Hydrochloric acid (HCl)

3. Ammonium Molybdate ($(NH_4)\ 6Mo_7O_{24}$)

4. Ammonium fluoride (NH_4F)

5. Potassium antimony (III) oxide tartrate hemihydrate ($C_4H_4O_6KO_7Sb.\frac{1}{2}H_2O$)

6. Ascorbic acid ($C_4H_8O_6$)

7. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

2.2.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ธาตุโพแทสเซียมในดิน

1. Ammonium Acetate (NH_4OAc)

2. Potassium chloride (KCl)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 บันทึกข้อมูลทางกายภาพของพื้นที่ที่พบกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนาง ทำการบันทึกข้อมูลทุก 15 วันดังนี้

2.3.1.1 พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล

ทำการวัดพิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเลของพื้นที่โดยใช้ GPS และ Altimeter ตามลำดับ บริเวณกลางแปลงทดลองที่ทำการสำรวจในแปลงศึกษาทั้ง 3 แปลงโดยบันทึกข้อมูลในครั้งแรกที่เข้าสำรวจ

2.3. 1.2 อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ

วัดอุณหภูมิและความชื้นของแต่ละแปลงศึกษาในบริเวณกลางแปลง โดยใช้ Wet – dry thermometer แขวนไว้เป็นเวลา 15 นาที บันทึกข้อมูลและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์จากตารางบน Wet – dry thermometer

2.3.1.3 ความเข้มแสงเฉลี่ยในพื้นที่

วัดความเข้มแสงโดยใช้เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter) บริเวณ 4 มุม แปลง บันทึกข้อมูลและคำนวณหาค่าความเข้มแสงเฉลี่ยของแต่ละป่า

2.3. 1.4 อุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน (อำพรรณ, 2547)

วัดอุณหภูมิของดินโดยใช้ Soil thermometer ปักลงไปในดินให้ลึกประมาณ 10 ซม. เป็นเวลา 3 นาที โดยวัดทั้งหมด 4 จุด ในกลุ่มของว่านจูงนางที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ส่วนการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน เก็บดินทั้งหมด 4 จุด ชั่งน้ำหนักภาชนะที่จะอบดิน แล้วตักดิน 10 กรัมใส่ภาชนะ นำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 110 °C จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักดินและภาชนะหลังอบ บันทึกน้ำหนักเพื่อนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน} = \frac{(\text{น้ำหนักดินก่อนอบ} - \text{น้ำหนักดินหลังอบ})}{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ}} \times 100$$

2.3.1.5 วิเคราะห์ค่าปฏิกิริยาความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) (เนาวรัตน์, 2527)

เก็บตัวอย่างดินจาก 4 จุดในกลุ่มของว่านจูงนางที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ นำดินที่ได้มาผึ่งให้แห้ง ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรง 2 มม. จำนวน 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. เติมน้ำกลั่น 20 มล. ใช้ในอัตราส่วนของดินต่อน้ำเป็น 1: 2 คนให้เข้ากันโดยคน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปวัด pH โดยใช้ pH-meter

2.3.1.6 วิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน (Organic matter) (Nelson and Sommers, 1996)

ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 0.5 กรัม เติม Potassium Dichromate 1 $\overline{N}$ จำนวน 10 มล. และใส่ Sulfuric acid จำนวน 20 มล. ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 100 มล. หยด O-phenanthroline ferrous complex ประมาณ 5-6 หยด แล้วนำมาไตรเตรทกับ standard Ferrous Sulfate 0.5 $\overline{N}$

2.3.1.7 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดิน (Total N) (Novozamsky *et. al.*, 1983)

ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 0.40 กรัม ใส่หลอดย่อย เติม Digestion mixture 2.5 มล. แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชม. นำเข้าเตาย่อยเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 100 °C หลังจากผ่านไป 2 ชม. เติม Hydrogen peroxide 30 % 3 มล. โดยเติมครั้งละ 1 มล. เพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง 330 °C เมื่อตัวอย่างเป็นสีขาวขุ่น และไม่มีควันของ Sulfuric acid รอให้เย็น ถ่ายตัวอย่างที่ย่อยแล้วใส่ในหลอดกลั่น หลังจากนั้นนำ erlenmeyer

flask ซึ่งมี Boric acid – indicator บรรจุอยู่ 15 มล. มารองรับใต้ condenser ของเครื่องกลั่น ใส่ 10 $\overline{N}$ Sodium hydroxide ประมาณ 20 มล. นำมาไตเตรตกับ Standart Sulfuric 0.5 $\overline{N}$

2.3.1.8 ปริมาณฟอสฟอรัสที่สามารถเป็นประโยชน์ได้ (Available P) (Houba *et al.,* 1988)

ชั่งดิน 2.5 กรัม มล. เติมสารละลาย Bray II 25 มล. เติมลงไปแล้วเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายที่กรองได้จำนวน 1 มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มล. เติมสารละลาย Reagent B จำนวน 4 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที นำไปอ่านค่าการส่องผ่านของแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

2.3.1.9 ปริมาณโพแทสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ในดิน (Exchangeable K) (Helkme and Sparke, 1996)

ชั่งตัวอย่างดิน 2.5 กรัม ใส่ในหลอดเขย่าดินเติมสารละลาย Ammonium Acetate 1 $\overline{N}$ pH 7 จำนวน 25 มล. เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 หลังจากนั้นดูดสารละลายที่กรองได้จำนวน 1 มล. ใส่ใน ขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอ่านด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer

2.3.2 การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนาง

บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของว่านจูงนางแต่ละกลุ่ม ดังนี้

1. ความสูงของลำต้นวัดจากโคนต้นจนถึงยอด (เซนติเมตร)
2. ความยาวและความกว้างของใบ (เซนติเมตร)
3. จำนวนใบต่อต้น
4. วันที่ดอกแรกบานจนกระทั่งดอกสุดท้ายเหี่ยว
5. จำนวนดอกต่อช่อและความยาวช่อดอก

ข้อมูลที่ได้นำมาศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลสัณฐานวิทยาของว่านจูงนางที่พบในพื้นที่ศึกษา วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนกล้วยไม้ดินที่พบและจำนวนดอกของกล้วยไม้ดินกับข้อมูลทางกายภาพและข้อมูลทางชีวภาพ ศึกษาความสัมพันธ์เชิงสถิติระหว่างตัวแปรอิสระหลายตัวต่อตัวแปรตาม โดย

กำหนดตัวแปรอิสระ คือ ความสูงต้น พื้นที่ใบ และจำนวนใบ โดยมีตัวแปรตาม คือ จำนวนดอกต่อต้น เพื่อนำผลการศึกษาความสัมพันธ์ที่ได้ไปประมาณค่าหรือพยากรณ์จำนวนดอกต่อต้นของกล้วยไม้ดินแต่ละชนิดในพื้นที่ศึกษา

การทดลองที่ 3 ศึกษาปัจจัยทางชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนางในสภาพธรรมชาติ

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.
2. หลอดทดลอง (test tube)
3. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
4. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 10 100 และ 500 มล.
5. บีกเกอร์ (beaker)
6. ตะเกียงแอลกอลฮอล์
7. ช้อนตักสาร(spatula)
8. ปากคีบ (forceps)
9. เข็มเขี่ย (needle)
10. สำลี
11. กระดาษทิชชู
12. พาราฟิล์ม
13. ถุงพลาสติก
14. ยางรัด
15. กรรไกร
16. มีดผ่าตัด
17. ปากกาเขียนแก้ว
18. ไฟแช็ค
19. ตะกร้า
20. เครื่องชั่งสาร
21. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ
22. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
23. เตาแก๊ส

24. เตาไมโครเวฟ
25. ตู้ถ่ายเชื้อ
26. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
27. ตู้อบ (hot air oven)
28. ตู้บ่มเชื้อ
29. สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ (slides and cover slips)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10 % (NaClO)
2. เอทานอล 95 %
3. น้ำกลั่น
4. ยาปฏิชีวนะ Streptomycin sulfate
5. น้ำตาล dextrose
6. วุ้น (agar)
7. Rose Bengal
8. น้ำยาทาเล็บ

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ในรากกล้วยไม้ดินว่านจูงนาง ตามขั้นตอนดังนี้

1) ทดสอบวิธีฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ของรากกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนาง

ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยดัดแปลงจากวิธี Masuhara and Katsuya method (Athipunyakom *et al*., 2004) โดยแช่ในแอลกอลฮอล์ 70 % โซเดียมไฮโปคลอไรท์และน้ำกลั่น ตามลำดับ เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อที่ผิวรากของว่านจูงนางที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์ โดยนำตัวอย่างรากของว่านจูงนางมาล้างผ่านน้ำไหล 1 ชั่วโมง ผึ่งลมให้แห้ง ใช้มีดผ่าตัดตัดรากให้มีความยาวประมาณ 1 ซม. นำตัวอย่างรากมาฆ่าเชื้อที่ผิว ใช้ความเข้มข้น 2 3 และ 5 % และใช้เวลาในการแช่ 1 3 และ 5 นาที ซับชิ้นรากบนกระดาษทิชชูที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำชิ้นพืชวางบนอาหาร PDA โดยวาง 4 ชิ้น ต่อ 1 จานอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการเจริญของเชื้อออกจากผิวรากเพื่อวิเคราะห์ระยะเวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เหมาะสมต่อการแยกราเอนโดไฟท์

2) การแยกราเอนโดไฟท์จากรากกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนาง

สุ่มเก็บตัวอย่างรากของกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนางแต่ละชนิดในพื้นที่ศึกษา โดยเก็บตัวอย่างละ 5 ต้น จำนวน 5 ราก แยกราเอนโดไฟท์ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของสุกัญญา (2545) ทำความสะอาดพื้นที่ผิวราก (surface sterilization) ด้วย 70% แอลกอฮอล์นาน 1 นาที จากนั้นแช่ ใน 3 % โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOHCl) นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ซับชิ้นส่วนด้วยกระดาษชำระที่นึ่งฆ่าเชื้อ ตัดชิ้นตัวอย่างให้หนาประมาณ 1 มล. วางบนอาหาร PDA ที่เติม rose bengal 0.05 g/l และ streptomycin 100 mg/l ทำการบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3-7 วันจึงตัดปลายเส้นใยเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยเชื้อที่บริสุทธิ์ถูกเก็บในหลอดอาหารเอียง (PDA slant) เพื่อใช้เป็น stock culture สำหรับการศึกษาต่อไป

3) การระบุสกุลของราเอนโดไฟท์

ระบุชนิดของราที่บริสุทธิ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะเส้นใย การสร้างสปอร์และลักษณะของสปอร์ โดยการเตรียมอาหาร PDA ในจานอาหารให้หนาประมาณ 0.2 มล. ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยของราจากหลอดอาหารเอียง มาไว้ตรงกลางจานอาหาร PDA บ่มไว้ที่ตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด เมื่อราเจริญเต็มจานอาหาร นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและแบบเลนส์ประกอบ ใช้คีมปลายแหลมคีบเส้นใยและสปอร์ของรามาวางบนสไลด์ที่มีน้ำกลั่นหยดอยู่ วางกระจกปิดสไลด์ทับลงไปโดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศ ซับน้ำกลั่นส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชู แล้วผนึก (seal) ด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใส จากนั้นตรวจดูลักษณะของสปอร์และเส้นใยของราเอนโดไฟท์ เพื่อการจำแนกในระดับสกุล (genus) โดยอ้างอิงจากหนังสืออนุกรมวิธานรา ได้แก่ Carmichael *et al.* (1980), Ellis (1971, 1976), Sutton (1971) และ Von Arx (1981)

4) การคำนวณอัตราการเกิดกลุ่มราในแต่ละชิ้นตัวอย่าง (Isolation rate) เปอร์เซ็นต์การเกิดกลุ่มราในชิ้นราก (Colonization rate (%)) และดัชนีชี้วัดความหลากหลายของแชนนอนและวีเนอร์ (Shannon–Wiener Index)

บันทึกจำนวนชิ้นรากที่มีราเอนโดไฟท์เจริญออกมา สำหรับคำนวณค่าอัตราการเกิดโคโลนีเพื่อหาอัตราการเกิดของกลุ่มราในชิ้นราก โดยทั่วไปแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (Petrini *et al.*, 1982) และการคำนวณอัตราของราที่แยกได้แสดงอัตราการเกิดของราในแต่ละชิ้นตัวอย่าง วิเคราะห์ข้อมูลโดยคำนวณค่าอัตราการเกิดโคโลนีและอัตราของราที่แยกได้ จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{Colonization rate} = \frac{\text{จำนวนชิ้นรากทั้งหมดเกิดรา}}{\text{จำนวนชิ้นรากทั้งหมด}} \times 100\ (\%)$$

$$\text{Isolation rate} = \frac{\text{จำนวนไอโซเลตของราทั้งหมด}}{\text{จำนวนชิ้นรากทั้งหมด}}$$

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตหมายถึง การศึกษาจำนวนและความหลากชนิด (species) ภายในกลุ่มประชากรนั้นๆ โดยใช้ ดัชนีวัดความหลากหลายของแชนนอนและวีเนอร์ (Shannon – Wiener Index) และดัชนีความคล้ายคลึงกันของชนิด (Similarity Index) เป็นดัชนีวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ โดยใช้ข้อมูลจำนวนไอโซเลตที่จัดจำแนกในระดับสกุลมาคำนวณดัชนีความหลากหลายทั้ง 2 ดัชนีนี้

ดัชนีวัดความหลากหลายของแชนนอนและวีเนอร์ (Shannon – Wiener Index) สามารถคำนวณได้ดังสมการต่อไปนี้ (Smith, 2001)

$$(H') = - \sum_{i=1}^{s} \text{Pi} \log^2 \text{Pi}$$

H’ = ดัชนีความหลากหลาย

S = จำนวนชนิด

Pi = สัดส่วนจำนวนชนิดที่ i ต่อจำนวนทั้งหมด

5) ปัจจัยที่ส่งผลต่อการพบราในรากกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนางแต่ละชนิด

จากการบันทึกผลการพบและไม่พบราชนิดต่าง ๆ ในกล้วยไม้ดินสกุลว่านจูงนางแต่ละชนิดของพื้นที่ศึกษาทั้งสามแห่งและทุกช่วงฤดูกาลนำข้อมูลไปสร้างเดนโดรแกรมด้วยวิธี Hierarchical Cluster Analysis โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 15