



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

แผนงานวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพ

ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Biodiversity and Utilization of Biological Resources

in Mae Wong National Park

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (กบง./2556-33)

ปีที่พิมพ์ 2558

รายชื่อโครงการวิจัยย่อยและคณะผู้วิจัย

- ชีววิทยาของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* (Hexapoda: Coleoptera: Lampyridae) ที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์
รองศาสตราจารย์ ดร. วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 1
และผู้อำนวยการแผนงานวิจัย
นายวิญญู พันธุ์เมืองมา ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่ 1
นายสรศักดิ์ นาคเอี่ยม ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่ 1
- ความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย สุมประดิษฐ์ หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 2
รองศาสตราจารย์ ดร. รสริน ว่องวิไลรัตน์ ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่ 2
- การศึกษาดัชนีทางสังคมของนกเพื่อการจัดการและการอนุรักษ์ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ์ หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 3
- ความหลากหลายของชนิดปลาน้ำจืดที่พบในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรศักดิ์ ประสานพันธ์ หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 4
- ความหลากหลายของชนิดแมงมุม (Order Araneae) ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
ดร. อุบลวรรณ บุญฉ่ำ หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 5
- ความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยสิทธิ์ที่หายากจากดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์: เพื่อนำไปสู่การค้นหารสารถือชีวิตใหม่
ดร. นาริลักษณ์ นาแก้ว หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 6
- ความหลากหลายของชนิดรื้อนฝอยทรายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ประเทศไทย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รักษิณา พลสีลา หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 7
- ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพาในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ วิทย์ตะ หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 8
ดร. อัญชลี ฐานวิสัย ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่ 8
- การสำรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ต่อโรคที่เกิดจากการเสื่อม
รองศาสตราจารย์ ดร. กรกนก อิงคนินันท์ หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 9
ดร. ปราณี นางงาม ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่ 9
ดร. ประภาพรณ เต็มกิจถาวร ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่ 9
ดร. หนึ่งฤทัย สุพรม ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อยที่ 9
และนายสุธน เวียงดาว หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

กิตติกรรมประกาศ

แผนงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช โดยอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ที่ได้อนุญาตให้คณะผู้วิจัยเข้าใช้พื้นที่เพื่อทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างความหลากหลายทางชีวภาพ โดยคณะผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์จากนายสุธน เวียงดาว หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์และเจ้าหน้าที่ประจำอุทยานฯ ทุกท่านที่ได้อำนวยความสะดวกและให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิต รวมทั้งการเก็บข้อมูลด้านอื่นๆ ประกอบการวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สามารถดำเนินการลุล่วงไปได้

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเภสัชศาสตร์ สถาบันวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพที่ให้การสนับสนุนในด้านสถานที่ ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ รวมทั้งมหาวิทยาลัยนเรศวรที่อำนวยความสะดวกในการบริหารจัดการงานวิจัย

งานวิจัยเรื่อง **ความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์** ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สัญญาเลขที่ กบง./2556-33

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่
วังก์พบว่าในพื้นที่ที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูงและบางชนิดพันธุ์ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพ
พื้นที่และการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า จากการสำรวจหึ่งห้อยในสกุล
Pygoluciola พบว่ามีจำนวนน้อยลง แต่สามารถเก็บตัวอย่างและนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ตรวจสอบและ
บรรยายลักษณะพบว่า เป็นชนิดที่เคยมีรายงานการค้นพบใหม่ในประเทศไทย พบความหลากหลายชนิดของยีสต์ทั้งใน
พื้นที่ที่เป็นป่าดิบแล้งและป่าเบญจพรรณสูง โดยพบยีสต์ทั้งสิ้น 45 สายพันธุ์ซึ่งจัดเป็นยีสต์ในกลุ่ม
ascomycetous yeasts ส่วนการสำรวจจนพบว่าในพื้นที่มีนกประจำถิ่นมากถึง 113 ชนิดพันธุ์ พบนกที่มีความ
เสี่ยงสูงต่อการถูกคุกคามจนสูญพันธุ์ในธรรมชาติคือ นกหัวขวานใหญ่สีเทา นอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่ป่าดิบเขา
ระดับต่ำเป็นแหล่งทำรังของนกที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์หลายชนิด เช่น นกเงือกคอแดง การสำรวจชนิดของปลา
และการกระจายตัวในลำน้ำแม่วังก์พบปลาน้ำจืดทั้งหมด 17 วงศ์ 27 สกุล 42 ชนิด กลุ่มที่พบมากที่สุดเป็นปลาที่
อยู่ในวงศ์ตะเพียน ชิว สร้อย และพบว่าไม่มีความแตกต่างของชนิดปลาในระหว่างจุดที่ทำการศึกษา แต่จำนวน
ชนิดที่พบมีแนวโน้มที่จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศที่มีผลกระทบต่อปริมาณน้ำ การ
สำรวจแมงมุมในพื้นที่ต่างๆ ของอุทยานฯ พบแมงมุมที่สามารถจำแนกได้ 21 วงศ์ จำนวน 129 ชนิด และคาดว่า
จะเป็นชนิดใหม่ๆของโลกหลายชนิด ผลจากการแยกเชื้อแอกติโนมัยสัทจากดินได้ทั้งหมด 166 ไอโซเลท จัดอยู่ใน
3 genus จากการทดสอบพบว่าเชื้อแอกติโนมัยสัท *Micromonospora* MW1103 มีความสามารถในการสร้าง
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้และ *Microbispora* MW1102 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์และพบว่าเชื้อไอโซ
เลท MW501 และ MW503 อาจจัดเป็นเชื้อแอกติโนมัยสัทชนิดใหม่ซึ่งทั้งสองไอโซเลทมีความสามารถในการ
สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นกัน การสำรวจชนิดและความหนาแน่นของรึ้นฝอยทรายโดยการวางกับดักแสง
ไฟ พบรึ้นฝอยทรายจำนวน 34,113 ตัว โดยมีสัดส่วนเพศผู้ 1.4 ต่อเพศเมีย 1) จำแนกได้ 2 สกุล คือ
Phlebotomus และ *Sergentomyia* จำนวน 11 ชนิด ช่วงที่พบรึ้นฝอยทรายมากที่สุดคือ เดือนมิถุนายน
(33.34%) รองลงมาคือเดือนกรกฎาคม (20.82%) และน้อยที่สุดคือเดือนมกราคม (2.48%) การสำรวจและคัด
แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 สกุล คือ *Heterorhabditis* และ *Steinernema*
และพบแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาที่สามารถระบุสกุลได้ 10 ไอโซเลท บางไอโซเลทยังไม่เคยมีรายงานใน
ประเทศไทย และพบข้อมูลที่ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย คือไส้เดือนฝอย *H. zealandica* และแบคทีเรีย
X. japonica และ *P. temperata* subsp. *Temperate* จากการสำรวจพืชสมุนไพรในพื้นที่นำมาทดสอบฤทธิ์
ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส พบว่าส่วนเถาของ *Entada rheedii* Spreng. (สะบ้า) มีฤทธิ์สูงสุด พืชที่มี
ประสิทธิภาพในการสร้างต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ *Caesalpinia digyna* Rottler (ชะเลียด, ใบและกิ่ง),
Harrisonia perforata (Blanco) Merr. (สีพันคนทา, ผล) และ *Entada rheedii* Spreng. (สะบ้า, เถา) และ
ส่วนรากของตัว *Cratogeomys cochinchinense* (Lour.) Blume) และรากของแกลบหมู (*Desmodium*
teres Wall. ex Benth) สามารถยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเตอเรสไฟว์ (PDE5) ได้สูง

คำสำคัญ

ความหลากหลายทางชีวภาพ, อุทยานแห่งชาติแม่วังก์, ทรัพยากรชีวภาพ

Abstract

The surveys and collection of some group of living organisms in Mae Wong National Park area found that in the area there were high levels of diversity of organisms. Some taxa were affected by environmental and climate change during the period of study. Our surveys showed lower number of firefly in the genus *Pygoluciola*. However, samples were collected and reared in the laboratory. These samples were identified and described as *Pygoluciola* sp.1 which has been reported as new recorded to Thailand. There was a high diversity of yeast species in mixed deciduous and the dry evergreen forests with the total of 45 species were isolated. They were classified as ascomycetous yeasts. The surveys of species and number of birds revealed 113 species of local birds. Great Slaty Woodpecker was classified as "Vulnerable", high risk of being extinct in nature. It was also recorded that in lower montane rain forest served as nesting sites for several endangered bird species such as Rufous-necked hornbill. The diversity of freshwater fish in Mae Wong River been reported in 17 families, 27 genus, 42 species. Fish in the genus Cyprinidae were recorded as the most founded taxon. There no differences in fish numbers and species among sampling sites. However, the number and species of fish trend to decrease as the changing of climate and water level. We found 21 families and 129 species of spiders in several areas of the national park. Some species might be a new recorded to Thailand. The isolations of actinomycetes from soil found 166 isolates within 3 genera. Some isolates were effectively produce bioactive compounds i.e. *Micromonospora* MW1103 produces bioactive compounds while *Microbispora* MW1102 can produce enzymes. In addition, isolates MW501 and MW503 may be classified as new species with capability to produce bioactive compounds. The abundances of sand fly were recorded with total of 34,113 individual, by using light traps. The male female ration was 1.4: 1. Samples were classified into the genera *Phlebotomus* and *Sergentomyia*. They were found most abundance in June (33.34%), followed by July (20.82%) and January (2.48%). The surveys and insolated of entomopathogenic nematodes form soil found 2 genera; *Heterorhabditis* and *Steinernema* and 10 isolations of symbiotic bacteria. *H. zealandica* earthworms and bacteria *X. japonica* and *temperata* P. subsp. *Temperate* have not been reported in Thailand. Some medicinal plants collected from the study sites were found to have acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity, i.e. *Entada rheedii* Spreng (Saba, vine). *Caesalpinia digyna* Rottler (Cha loaed, leaves and twigs), *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. (Si Fun Kon Tha, fruits) and *Entada rheedii* Spreng (Saba, vines) were found to have the free radical scavenging activity. Phosphodiesterase5 (PDE5) inhibitory activity were obtained from the root extracted of *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume and *Desmodium teres* Wall. ex Benth,

Key words

Biodiversity, Mae Wong National Park, Biological Resources

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

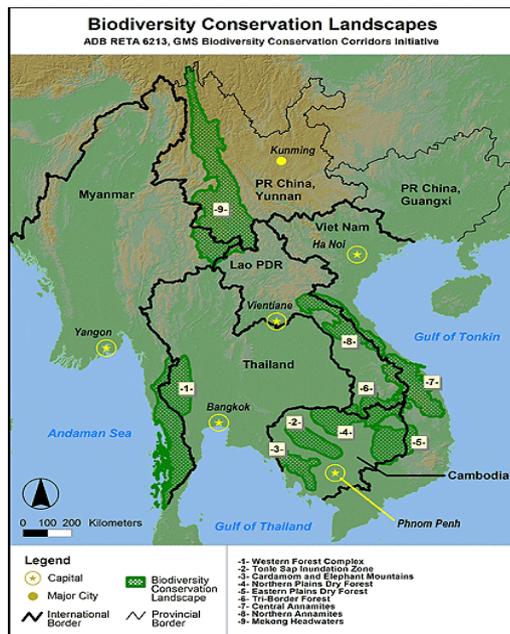
ความหลากหลายทางชีวภาพเป็นทรัพยากรที่มีผลกระทบโดยตรงต่อความอยู่รอดของมนุษย์ ปัญหาต่างๆที่กำลังคุกคามต่อโลกไม่ว่าจะเป็นภาวะโลกร้อน ภาวะน้ำท่วม ฝนแล้งหรือพิบัติภัยต่างๆ ส่วนหนึ่งเกิดจากการกระทำของมนุษย์ที่รุกรานความสมดุลของทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพ ผลกระทบต่างๆนอกเหนือจากการก่อให้เกิดการสูญพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเร็วกว่าที่ควรจะเป็นแล้วยังมีผลต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ซึ่งเราไม่สามารถปฏิเสธได้ว่าการดำรงชีวิตของมนุษย์นั้นยังต้องอยู่บนพื้นฐานของการพึ่งพาทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพ

ในประเทศไทยได้มีการสำรวจและศึกษาด้านความหลากหลายทางชีวภาพมาไม่ต่ำกว่า 200 ปี แต่ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยชาวตะวันตก ซึ่งนอกเหนือจากการที่องค์ความรู้ต่างๆ จะถูกเผยแพร่เฉพาะในประเทศต่างๆ ในแถบตะวันตกโดยชาวไทยไม่สามารถรับรู้หรือเข้าถึงองค์ความรู้ต่างๆ นั้นแล้ว ยังก่อให้เกิดปัญหาของการเข้ามาใช้ประโยชน์จากทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพของไทยอย่างไม่ยุติธรรมอีกด้วย ภาวะคุกคามเหล่านี้เป็นสาเหตุหนึ่งที่นักวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้ตระหนักถึงความรับผิดชอบที่เราจะต้องดำเนินการวิจัยทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งสอดคล้องกับแนวนโยบายของรัฐบาลทางด้านยุทธศาสตร์การพัฒนามาตรฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555 – 2559) โดยมียุทธศาสตร์ที่ 6 ว่าด้วยการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน ซึ่งมีเป้าหมายของการพัฒนาคือ 1) เพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของฐานทรัพยากรและความหลากหลายทางชีวภาพให้เพียงพอกับการรักษาระบบนิเวศและการใช้ประโยชน์อย่างสมดุล 2) เพิ่มประสิทธิภาพการบริหารจัดการและการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่าและเป็นธรรม และ 3) สร้างขีดความสามารถในการปรับตัวเพื่อรับมือและลดผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ ปกป้องและลดการสูญเสียพื้นที่เสี่ยงภัยทางเศรษฐกิจและระบบนิเวศ โดยมีแนวทางการพัฒนาที่เกี่ยวข้องกับแผนงานวิจัยที่เสนอขอรับการสนับสนุน คือ การอนุรักษ์ พันธุ์และสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และยังเป็นดำเนินการที่เป็นไปตามพันธกรณีระหว่างประเทศตามอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (Convention on Biological Diversity, CBD) ที่มีเป้าหมายหลักในการลดอัตราการสูญเสียดังกล่าวของทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพ รักษาสมดุลของระบบนิเวศ และปกป้องความรู้ดั้งเดิมและ/หรือภูมิปัญญาพื้นบ้าน

การจัดการการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายอย่างยั่งยืนนั้น ต้องมีฐานข้อมูลทรัพยากรความหลากหลายในพื้นที่หรือท้องถิ่นนั้นอย่างชัดเจนเป็นวิทยาศาสตร์ เพื่อการใช้ประโยชน์ที่เหมาะสม ต้องมีฐานข้อมูลความหลากหลายทางชนิดพันธุ์และหน้าที่ของชนิดพันธุ์ (บัญชีความหลากหลายทางชีวภาพ) ลักษณะและโครงสร้างทางสังคม และสถานภาพทางสูญพันธุ์ของชนิดพันธุ์ในพื้นที่/ท้องถิ่น (เช่นมีสถานภาพประปราย, VU หรือ มีสถานะภาพไม่น่าเป็นห่วง, LC เป็นต้น) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ได้มาจากการวิจัยทางนิเวศวิทยาและชีววิทยา

ทั้งสิ้น ข้อมูลเหล่านี้จะช่วยให้การกำหนดนโยบาย และมาตรการเอื้อต่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

ผืนป่าตะวันตกของประเทศไทยเป็นผืนป่าที่ทอดตัวยาวครอบคลุมพื้นที่ทางทิศตะวันตกของประเทศไทย และทิศตะวันออกของประเทศเมียนมาร์ ผืนป่านี้ได้รับการยอมรับว่าเป็น 1 ใน 9 แห่งของพื้นที่อนุรักษ์ในอนุภูมิภาคลุ่มน้ำโขง ซึ่งประกอบไปด้วยประเทศไทย ลาว กัมพูชา พม่า เวียดนาม และมณฑลยูนนานทางตอนใต้ของสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยพื้นที่อนุรักษ์ของอนุภูมิภาคลุ่มน้ำโขงได้รับการยกย่องว่าเป็นภูมิทัศน์ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity conservation landscape) ซึ่งได้กำหนดพื้นที่อนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity conservation corridors) ไว้ 9 แห่ง เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาที่ยั่งยืนของระบบนิเวศในอนุภูมิภาคลุ่มน้ำโขงและผืนป่าตะวันตก (western forest complex) (ภาพที่ 1) ได้ถูกกำหนดให้เป็นพื้นที่อนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพแห่งหนึ่งในพื้นที่อนุรักษ์ในอนุภูมิภาคลุ่มน้ำโขง ผืนป่าแห่งนี้ในส่วนของประเทศไทยประกอบด้วยอุทยานแห่งชาติและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า 19 แห่ง ที่เป็นแหล่งทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพที่สำคัญแห่งหนึ่งของประเทศไทย หนึ่งในพื้นที่ป่าตะวันตกที่มีความสำคัญคือ อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งครอบคลุมพื้นที่แถบเทือกเขาถนนธงชัยในทิศตะวันตกของประเทศไทย



ภาพที่ 1 แผนที่อนุภูมิภาคลุ่มน้ำโขง

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีเนื้อที่ประมาณ 557,750 ไร่ หรือ 894 ตารางกิโลเมตร ครอบคลุมอำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร อำเภอแม่วงก์และกิ่งอำเภอแม่เปิน จังหวัดนครสวรรค์ (ภาพที่ 2) โดยมีเขตติดต่อกับป่ามรดกโลกห้วยขาแข้ง-ทุ่งใหญ่นเรศวร ได้รับการจัดตั้งขึ้นเป็นอุทยานแห่งชาติ เมื่อ พ.ศ. 2530 สภาพภูมิประเทศเป็นเทือกเขาสูงสลับซับซ้อนตามเทือกเขาถนนธงชัยและลดหลั่นกันลงมาจนถึงพื้นราบ โดยยอดที่สูงที่สุด

คือยอดเขาโมโกจูซึ่งสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,964 เมตร เป็นยอดเขาที่สูงเป็นอันดับต้นๆ ในเขตผืนป่าตะวันตกของประเทศไทยและเป็นแหล่งต้นน้ำที่สำคัญ ได้แก่ แม่น้ำแม่งกในพื้นที่จังหวัดนครสวรรค์ ทำให้เกิด



ภาพที่ 2 อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

พื้นที่ราบบริเวณริมแม่น้ำสำหรับการเกษตรกรรมในจังหวัดกำแพงเพชรและนครสวรรค์ สภาพป่าโดยทั่วไปของเขตอุทยานประกอบด้วย ป่าดิบเขาประมาณ 0.88 % ป่าดิบแล้งประมาณ 21.85 % ป่าดิบแล้งผสมป่าเบญจพรรณขึ้นประมาณ 9.24% ป่าเบญจพรรณประมาณ 59.05 % ป่าเต็งรังประมาณ 6.77 % และทุ่งหญ้าหรือไร่ร้าง ประมาณ 2.21 % ซึ่งเกิดจากการบุกรุกถางป่าของประชาชนก่อนการประกาศจัดตั้งเป็นอุทยานแห่งชาติ

พื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์เป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและเป็นพื้นที่เก็บรักษาแหล่งพันธุกรรมของความหลากหลายทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 57 ชนิด 26 วงศ์ สัตว์จำพวกนก 305 ชนิด 53 วงศ์ สัตว์เลื้อยคลาน 22 ชนิด 11 วงศ์ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 7 ชนิด 4 วงศ์ และปลาน้ำจืด 68 ชนิด 14 วงศ์ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวอาจจะไม่ครอบคลุมพื้นที่เปราะบางของเขตอุทยานที่มีความเสี่ยงต่อการถูกบุกรุกทำลายเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ ทั้งนี้พบว่าพื้นที่บางส่วนโดยรอบอุทยานมีความเสี่ยงที่จะถูกบุกรุกเพื่อใช้เป็นพื้นที่ทางการเกษตร และการบุกรุกเพื่อใช้ประโยชน์อื่นๆ โดยเฉพาะการเปิดเป็นอุทยานแห่งชาติจะมีโอกาสถูกรบกวนจากมนุษย์มากกว่า เนื่องจากเป็นแหล่งท่องเที่ยวทางธรรมชาติที่มนุษย์สามารถเข้าใช้ประโยชน์ได้ การรบกวนพื้นที่จะอยู่ในรูปของการเข้ามาท่องเที่ยวอย่างถูกกฎหมายและการลักลอบเข้ามาตัดไม้ทำลายป่า การล่าสัตว์และเก็บของป่าอย่างผิดกฎหมาย รวมทั้งการจัดการที่ไม่เหมาะสม จากนโยบายล่าสุดที่คณะรัฐมนตรีได้อนุมัติในหลักการให้มีการสร้างเขื่อนในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์โดยมีระยะเวลาดำเนินการ 8 ปี ซึ่งจะทำให้ผืนป่ามากกว่า 11,000 ไร่ถูกทำลายและจะต้องสูญเสียทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพไปเป็นจำนวนมากเนื่องจากพื้นที่ที่ถูกทำลายเป็นพื้นที่ที่เป็นแหล่งอาศัยของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น

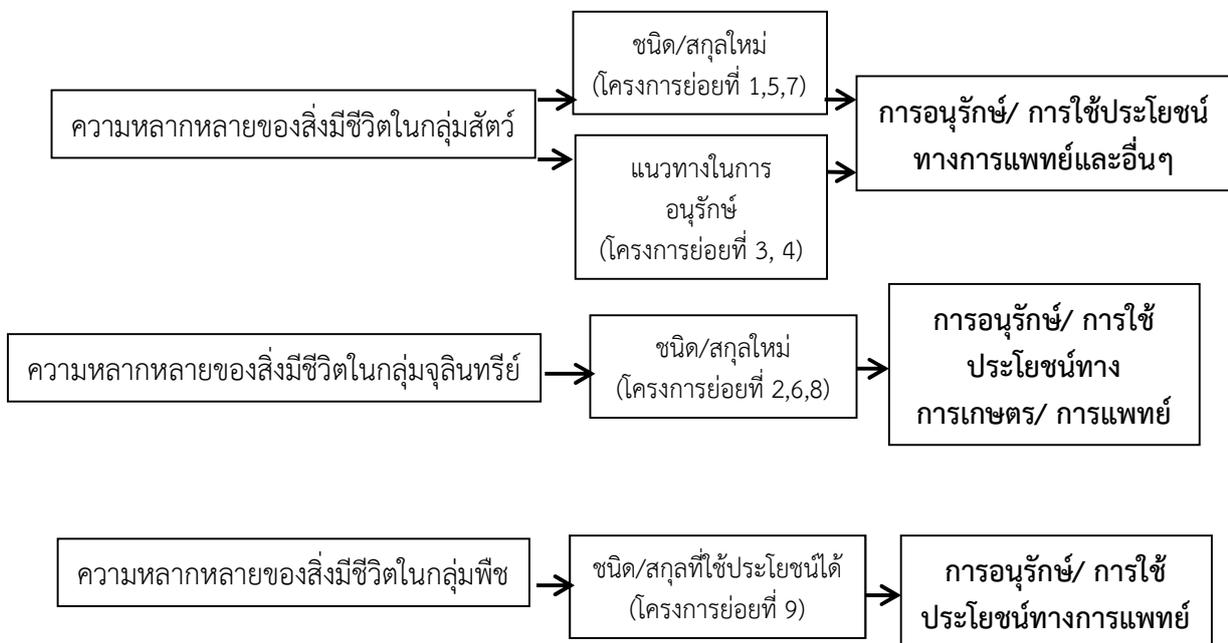
มหาวิทยาลัยนเรศวรซึ่งเป็นสถาบันการศึกษาที่มีความพร้อมในการศึกษาค้นคว้าทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ มีนักวิจัยที่มีประสบการณ์การทำงานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในกลุ่ม

สิ่งมีชีวิตต่างๆ และมีความร่วมมือที่ดีกับหน่วยงานอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ และมีปัจจัยที่เอื้อต่อการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งสถาบันยังตั้งอยู่ในพื้นที่ที่ใกล้เคียงกับผืนป่าตะวันตก จึงมีปัจจัยเกื้อหนุนหลายประการในการดำเนินงานวิจัย ด้วยเหตุดังกล่าวมหาวิทยาลัยนครสวรรค์จึงได้เสนอแผนงานวิจัยเพื่อศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของทรัพยากรชีวภาพในพื้นที่แม่วงก์ซึ่งถือว่าเป็นพื้นที่เปราะบางทางระบบนิเวศแห่งหนึ่งจึงเป็นเรื่องเร่งด่วนที่ควรได้รับการสนับสนุน ทั้งนี้เพื่อเป็นการส่งเสริมองค์ความรู้พื้นฐานสำหรับการอนุรักษ์และการตัดสินใจที่จะเข้าไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่โดยไม่เป็นการทำลายคุณประโยชน์ของทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพ นอกจากนี้องค์ความรู้ที่ได้ยังสามารถนำไปใช้ในการจัดการการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืน และยังเป็นการสร้างจิตสำนึกของประชาชนในการที่จะช่วยกันอนุรักษ์ทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพไว้ให้แกชาวไทยรุ่นหลัง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต 3 กลุ่มหลัก คือ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร และจังหวัดนครสวรรค์ เพื่อให้ได้องค์ความรู้พื้นฐานด้านความหลากหลายของทรัพยากรชีวภาพในพื้นที่เขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ รวมทั้งสถานภาพของสิ่งมีชีวิตบางกลุ่ม สำหรับเป็นข้อมูลในการดำเนินการด้านการอนุรักษ์ทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพและสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการวิจัยเพื่อการใช้ประโยชน์ทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพเหล่านั้นในด้านต่างๆ อย่างยั่งยืน

รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย



สรุปผลการวิจัย

จากการสำรวจความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ระหว่างเดือนกันยายน 2557 – เดือนสิงหาคม 2558 คณะผู้วิจัยได้ทำการสำรวจในพื้นที่ต่างๆ ของอุทยานฯ พบความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มต่างๆ ดังรายงาน (ตาราง) และบางกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาพบจะเป็นรายงานการค้นพบครั้งใหม่ในประเทศไทย (หิ่งห้อย แมงมุม แอคติโนมัยสิท ไล้เดือนฝอยศัตรูแมลง) รวมทั้งบางชนิดเป็นชนิดพันธุ์ที่เสี่ยงต่อการถูกคุกคาม (นก) หรือการลดจำนวนลงของปลาน้ำจืดที่สำรวจในลำน้ำแม่วงก์ ความหลากหลายและความชุกชุมของริ้นฝอยทราย สามารถนำไปเป็นข้อมูลชี้วัดแนวโน้มของการนำโรคมานสู่คนและการเฝ้าระวังการเกิดโรคในอนาคต และจากการศึกษาความสามารถในการนำมาใช้ประโยชน์ของสมุนไพรพบว่าหลายชนิดมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสมุนไพรที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ได้ โดยมีรายละเอียดการสรุปผลดังตาราง

โครงการวิจัย	สรุปผลการวิจัย
<p>1. ชีววิทยาของหิ่งห้อยในสกุล <i>Pygoluciola</i> (Hexapoda: Coleoptera: Lampyridae) ที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์</p>	<p>พบตัวอย่างหิ่งห้อยระยะตัวอ่อนในสกุล <i>Pygoluciola</i> ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ในช่วงที่สภาพอากาศเย็น อุณหภูมิต่ำ และมีความชื้นสัมพัทธ์สูง สภาพพื้นที่ที่อาศัยของตัวอ่อนหิ่งห้อยสกุลนี้จะต้องเป็นสภาพที่มีความชุ่มชื้น มีแหล่งน้ำขนาดเล็กและมีต้นไม้ขนาดเล็กปกคลุมพื้นที่ ส่วนตัวเต็มวัยจะพบในช่วงที่อุณหภูมิสูงขึ้นคือเดือนมีนาคม แต่ไม่พบหิ่งห้อยในทุกระยะการเจริญเติบโตในช่วงที่เป็นฤดูร้อนและสภาพอากาศแห้งแล้ง หิ่งห้อยจะอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีความสูงมากกว่า 1,200 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล และมีสภาพเป็นป่าดิบเขาต่ำ อย่างไรก็ตาม พื้นที่ที่เคยสำรวจพบหิ่งห้อยสกุลนี้มาก่อนหน้านั้นได้มีการปรับเปลี่ยนสภาพพื้นที่ ต้นไม้ แหล่งน้ำและสภาพที่อาศัยเปลี่ยนแปลงไป จึงพบตัวอย่างหิ่งห้อยจำนวนไม่มากนัก ตัวอ่อนหิ่งห้อยที่นำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงส่วนใหญ่มีระยะตัวอ่อนยาวนานกว่า 9 เดือน ส่วนตัวเต็มวัยมีอายุค่อนข้างสั้น ได้บรรยายลักษณะของตัวอ่อน ดักแด้และตัวเต็มวัย จากการตรวจสอบลักษณะของตัวที่เลี้ยงจนเจริญเป็นตัวเต็มวัยและตัวเต็มวัยที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน โดยมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ผู้วิจัยได้บรรยายและตีพิมพ์ผลงานไปแล้ว แต่ยังไม่มีการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์แก่หิ่งห้อยชนิดนี้ จึงให้เป็นชนิด <i>Pygoluciola</i> sp.1 ซึ่งเป็นสกุลและชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย</p>
<p>2. ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์</p>	<p>จากการคัดแยกยีสต์จากดินตัวอย่างสามารถคัดแยกยีสต์ได้จากดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้งจำนวน 16 และ 29 สายพันธุ์ตามลำดับ ยีสต์ทั้ง 45 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในศึกษานี้เป็น</p>

	<p>ascomycetous yeasts จากการพิสูจน์เพื่อระบุชื่อยีสต์ทั้ง 45 สายพันธุ์ ตามหลักการ phylogenetic identification โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ LSU rDNA พบว่ายีสต์ทั้งหมดถูกจัดอยู่ในสกุล <i>Candida</i>, <i>Debaryomyces</i>, <i>Geotrichum</i>, <i>Hanseniaspora</i>, <i>Kazachstania</i>, <i>Kloeckera</i>, <i>Millerozyma</i>, <i>Pichia</i>, <i>Saccharomyces</i>, <i>Tetrapisispora</i> และ <i>Yarrowia</i> โดยความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณน้อยกว่าความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าดิบแล้ง</p>
<p>3. การศึกษาดัชนีทางสังคมของนกเพื่อการจัดการและการอนุรักษ์ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์</p>	<p>เก็บข้อมูลความหลากหลายของนกใน 2 พื้นที่คือป่าเบญจพรรณ ที่ความสูง 300-370 เมตร (เส้นทางไปโมโกจู) และป่าดิบเขาระดับต่ำ บริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ แม่วงก์ (ช่องเย็น) ที่ความสูง 1190 -1172 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล นกที่พบในเส้นทางไปโมโกจูมีจำนวน 92 ชนิดพันธุ์ จัดอยู่ใน 11 อันดับ 43 วงศ์ และสำหรับป่าดิบเขาระดับต่ำบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่วงก์ (ช่องเย็น) มีจำนวนนก 86 ชนิดพันธุ์ จัดอยู่ใน 12 อันดับ 34 วงศ์ ทั้งสองพื้นที่มีดัชนีความเหมือนของชนิดพันธุ์ (Jaccard index) เท่ากับ 21.08 % แสดงถึงการมีนกที่พบอาศัยหากินได้ทั้งสองพื้นที่มีประมาณร้อยละ 20 ของนกที่ปรากฏทั้งหมด นกทั้งหมดที่ปรากฏเป็นนกประจำถิ่น 113 ชนิดพันธุ์ (76.87%) เป็นนกอพยพและประจำถิ่นในบางพื้นที่ 19 ชนิดพันธุ์ (12.92%) และเป็นนกอพยพแต่ไม่สร้างรัง 15 ชนิดพันธุ์ (10.20%) นกทั้งหมดนี้ 146 ชนิดพันธุ์ มีสถานภาพด้านการถูกคุกคามในระดับ “ไม่น่าเป็นห่วง (Least concern, LC)” ทั้งสองพื้นที่มีนกที่เป็นเอกลักษณ์ของพื้นที่ หรือเฉพาะเจาะจงต่อภูมิศาสตร์ของพื้นที่อย่างมาก เกือบร้อยละ 50 จากการวิจัยถึงแม้ว่าระดับความชุกชุมของนกในสองพื้นที่มีค่าในระดับ “ไม่ธรรมดา” เป็นส่วนมาก แต่ในการปรากฏแต่ละครั้งมีจำนวนนกประชากรต่ำ 1-5 ตัวเป็นส่วนมาก แสดงถึงจำนวนประชากรมีแนวโน้มเข้าใกล้ความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์มากขึ้นทั้งสองเส้นทาง พบนกที่มีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ในระดับ “Vulnerable ,VU” คือมีความเสี่ยงสูงต่อการถูกคุกคามจนสูญพันธุ์ในธรรมชาติหนึ่งชนิดคือ นกหัวขวานใหญ่สีเทา นอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่ป่าดิบเขาระดับต่ำนี้เป็นแหล่งทำรังของนกที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์หลายชนิด เช่น นกเงือกคอแดง จึงควรมีการบริหารจัดการอย่างมีประสิทธิภาพและเอาใจใส่อย่างใกล้ชิด</p>

<p>4. ความหลากหลายของชนิดปลาน้ำจืดที่พบในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์</p>	<p>จากการศึกษาชนิดของปลาและการกระจายตัวในลำน้ำแม่วงก์พบปลาน้ำจืดทั้งหมด 17 วงศ์ 27 สกุล 42 ชนิด โดยกลุ่มที่พบมากที่สุดเป็นปลาที่อยู่ในวงศ์ตะเพียน ชิว สร้อย (Cyprinidae) เป็นจำนวน 5 สกุล 9 ชนิด และพบว่าไม่มีความแตกต่างของชนิดปลาในระหว่างจุดที่ทำการศึกษา ซึ่งปลาทุกวงศ์สามารถพบได้ในทุกจุดที่ทำการสำรวจ นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างของชนิดปลาในแต่ละฤดูกาล ทั้งนี้เพราะในรอบปีที่ศึกษาไม่พบว่าความแตกต่างระหว่างฤดูน้ำหลากและฤดูน้ำน้อย เนื่องจากฝนทิ้งช่วงยาวนานและมีภาวะแล้งจัด</p>
<p>5. ความหลากหลายของชนิดแมงมุม (Order Araneae) ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์</p>	<p>จากการสำรวจสามารถพบแมงมุมได้ในแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลายและเกือบทุกพื้นที่ในอุทยานฯ สามารถจำแนกตัวอย่างแมงมุมที่พบในพื้นที่สำรวจได้ 21 วงศ์ ได้แก่ Agelenidae, Araneidae, Deinopidae, Gnaphosidae, Hersilia, Linyphiidae, Lycosidae, Nephilidae, Nemesiidae, Oxyopidae, Pholcidae, Pisauridae, Salticidae, Selenopidae, Sparassidae, Tetragnathidae, Theridiidae, Theraphosidae, Thomisidae, Uloboridae, และ Zodariidae แมงมุมในวงศ์ Araneidae พบจำนวนชนิดมากที่สุดถึง 30 ชนิด รองลงมาคือ วงศ์ Tetragnathidae พบ 24 ชนิด และวงศ์ Theridiidae พบ 22 ชนิด และแมงมุมบางชนิดสามารถพบได้เฉพาะบางพื้นที่ เช่น แมงมุมชนิด <i>Gastercantha hasselti</i> และ <i>Gastercantha kuhlii</i> ที่จะพบเฉพาะในป่าไผ่ ป่าเบญจพรรณ สามารถจำแนกได้ในระดับชนิดจำนวน 129 ชนิด และคาดว่าจะมีชนิดใหม่ๆของโลกหลายชนิด และยังคงมีการวิเคราะห์ในเชิงนิเวศวิทยาต่อไป</p>
<p>6. ความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยสิทที่หายากจากดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์: เพื่อนำไปสู่การค้นหายาออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่</p>	<p>ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยสิทจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จำนวน 15 จุด ได้เชื้อแอคติโนมัยสิท 166 ไอโซเลท จัดอยู่ใน 3 genus คือ <i>Streptomyces</i>, <i>Microbispora</i>, <i>Micromonospora</i> จำนวน 54, 8 และ 93 ไอโซเลทตามลำดับ คิดเป็น 33% 5% และ 56% ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด และพบเชื้อที่ยังไม่ทราบชนิดอีก 2 กลุ่ม คิดเป็น 7 % ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด จากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ จำนวน 38 ไอโซเลท พบว่ามีความสามารถในการ</p>

	<p>สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จำนวน 21 ไอโซเลท คิดเป็น 55 % ของเชื้อที่นำมาทดสอบ และจากเชื้อที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดพบว่าเป็นกลุ่มของ non-<i>Streptomyces</i> ซึ่งเป็นแอกติโนมัยสิตที่หายากมากกว่า <i>Streptomyces</i> คิดเป็นร้อยละ 62 และ 38 และเชื้อแอกติโนมัยสิตที่หายากที่น่าสนใจ เช่น <i>Micromonospora</i> MW1103 มีความสามารถในการสร้างสารได้ 4 ชนิดคือ anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, เอนไซม์โปรตีเอส และ เอนไซม์เซลลูเลส , <i>Microbispora</i> MW1102 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ 3 ชนิด ทั้งไอโซเลท MW1103 และ MW1102 แยกได้จากดินบริเวณข้างเส้นทางจากที่ทำการอุทยานไปยังช่องเขันมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ 3 ชนิดคือ เซลลูเลส อะมัยเลส โปรตีเอส และเชื้อไอโซเลท MW501 และ MW503 ซึ่งแยกได้จากบริเวณที่ทำการอุทยานฯ ซึ่งยังไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ จึงอาจจะจัดเป็นเชื้อแอกติโนมัยสิตชนิดใหม่ โดยไอโซเลท MW501 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ส่วน MW503 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้</p>
<p>7. ความหลากหลายของชนิดรื้อนฝอยทรายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ประเทศไทย</p>	<p>สำรวจชนิดและความหนาแน่นของรื้อนฝอยทรายโดยการวางกับดักแสงไฟ พบรื้อนฝอยทรายจำนวน 34,113 ตัว (เพศผู้ 20,146 ตัว : เพศเมีย 13,967 ตัว สัดส่วน 1.4 ต่อ 1) จำแนกได้ 2 สกุล คือ <i>Phlebotomus</i> และ <i>Sergentomyia</i> จำนวน 11 ชนิด คือ <i>Phlebotomus stantoni</i>, <i>P. asperulus</i>, <i>P. philippinensis</i>, <i>gouldi</i>, <i>Sergentomyia anodontis</i>, <i>S. gemmea</i>, <i>S. perturbans</i>, <i>S. quatei</i>, <i>S. indica</i>, <i>S. barraudi</i>, <i>S. silvatica</i>, และ <i>S. iyengari</i> ส่วนที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้คือ unidentified group B, C และ H และชนิดที่พบมากที่สุดคือ <i>S. anodontis</i> (33.02%) รองลงมาคือ <i>S. silvatica</i> (17.24%) เดือนมิถุนายนจะพบความหนาแน่นของรื้อนฝอยทรายสูงสุดในคือ 1,877 ตัวต่อกับดักต่อคืน และความหนาแน่นเฉลี่ยของรื้อนฝอยทรายที่พบตลอดการศึกษาคั้งนี้คือ 75.81 ตัวต่อกับดักต่อคืน ช่วงที่พบรื้อนฝอยทรายมากที่สุดคือ เดือนมิถุนายน (33.34%) รองลงมาคือเดือนกรกฎาคม (20.82%) และน้อยที่สุดคือเดือนมกราคม (2.48%) ซึ่งเป็นสิ่งที่ควรเฝ้าระวังเนื่องจากแมลงชนิดนี้สามารถเป็นพาหะในการนำโรคมานสู่มนุษย์ได้ ดังนั้นการที่มีจำนวนนักท่องเที่ยวในพื้นที่เพิ่มมากขึ้น จึงเป็นการเพิ่มโอกาสของการนำ</p>

	โรคโดยแมลงชนิดนี้มากขึ้น
<p>8. ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพาในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์</p>	<p>เก็บตัวอย่างดินจำนวน 550 ตัวอย่างในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดินพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุล คือ <i>Heterorhabditis</i> และ <i>Steinernema</i> และจากการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 28S rDNA สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล <i>Steinernema</i> และ Internal transcribed spacer (ITS) สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล <i>Heterorhabditis</i> ด้วยการทำ BLASTN เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล <i>Steinernema</i> จำนวน 2 ไอโซเลท และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล <i>Heterorhabditis</i> จำนวน 3 ไอโซเลท สามารถแบ่งเป็น <i>H. zealandica</i> จำนวน 1 ไอโซเลท ส่วนอีก 2 ไอโซเลทเป็น <i>H. baujardi</i> อย่างไรก็ตามยังมีอีก 7 ไอโซเลทที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ สำหรับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาสสามารถระบุสกุลได้ 10 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็น <i>Xenorhabdus</i> จำนวน 3 ไอโซเลท และระบุชนิดได้เป็น <i>X. japonica</i> จำนวน 1 ไอโซเลท และ <i>X. stockiae</i> จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย และ <i>Photorhabdus</i> จำนวน 21 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็น <i>P. luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i> 20 ไอโซเลท และอีก 1 ไอโซเลทเป็น <i>Photorhabdus temperata</i> subsp. <i>temperate</i> ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย คือ <i>H. zealandica</i> และแบคทีเรีย <i>X. japonica</i> และ <i>P. temperata</i> subsp. <i>temperate</i></p>
<p>9. การสำรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ต่อโรคที่เกิดจากการเสื่อม</p>	<p>จากการสำรวจพืชสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร 87 ชนิด ซึ่งอยู่ใน 29 วงศ์ โดยพบพืชในวงศ์ Fabaceae และ Malvaceae มากที่สุด คือ 12 ชนิด และ 6 ชนิด ตามลำดับ นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟดีเอสเทอเรสไฟว์ พบว่าสารสกัดที่มีการยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสสูงที่สุด ได้แก่ ส่วนเถาของ <i>Entada rheedii</i> Spreng. (สะบ้า) โดยยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 60.73 ± 5.41 และมีทั้งหมด 44 ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเลือกสารสกัดที่มี</p>

	<p>ฤทธิ์สูงสุด 10 อันดับแรกมาหาค่า IC₅₀ พบว่า สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดคือ <i>Caesalpinia digyna</i> Rottler (ชะเลียด, ใบและกิ่ง), <i>Harrisonia perforata</i> (Blanco) Merr. (สีพันคนทา, ผล) และ <i>Entada rheedii</i> Spreng. (สะบ้า, เถา) โดยมี IC₅₀ 5.37 ±0.22, 7.74 ±0.38 และ 8.64 ±0.27 µg/ml ตามลำดับ และพบว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเอทานอลจากส่วนรากของตีว (<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume) และรากของแกลบหมู (<i>Desmodium teres</i> Wall. ex Benth) สามารถยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ (PDE5) ได้สูงกว่าร้อยละ 70 (ร้อยละ 78.54±2.45และ 73.20±2.79 ตามลำดับ) และมีสารสกัด 4 ชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 ในระดับกลาง (ร้อยละการยับยั้ง 60-70) คือ สารสกัด <i>Antidesma sootepense</i> Craib (มะเเมา, ลำต้น), <i>Cissus adnata</i> Roxb (น้ำเต้าป๋า, ใบ), <i>Stahlianthus campanulatus</i> Kuntze (ว่านเพชรน้อย, เหง้า) และ <i>Bauhinia viridescens</i> Desv (ส้มเสี้ยวป๋า, ราก) โดยสามารถยับยั้ง PDE5 ได้ร้อยละ 68.54±4.09, 68.23±4.19, 66.30±1.33 และ 66.03±3.37 ตามลำดับ (* หมายเหตุ ผู้วิจัยได้จัดทำหนังสือ “สมุนไพรในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์” เพื่อเผยแพร่แก่ผู้เกี่ยวข้องต่อไป</p>
--	---

ประโยชน์ที่ได้รับ

จากการสำรวจและศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มพืช สัตว์และจุลินทรีย์ในพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์พบความหลากหลายดังตารางสรุปผลการวิจัย ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ดังนี้

1. ฐานข้อมูลชนิดพันธุ์ ผลการศึกษาวิจัยสามารถใช้เป็นข้อมูลชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มต่างๆ ที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ได้แก่ ชนิดพันธุ์หึ่งห้อย (โครงการย่อยที่ 1) ยี่สึด (โครงการย่อยที่ 2) แมงมุม (โครงการย่อยที่ 5) แอคติโนมัยสิท (โครงการย่อยที่ 6) และ ไล่เดือนฝอย (โครงการย่อยที่ 8)
2. ข้อมูลด้านการอนุรักษ์ชนิดพันธุ์สิ่งมีชีวิตที่ถูกคุกคามจากการปรับสภาพพื้นที่และการท่องเที่ยว ได้แก่ นก (โครงการย่อยที่ 3) หึ่งห้อย (โครงการย่อยที่ 1) แมงมุม (โครงการย่อยที่ 5)
3. ข้อมูลด้านผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศและฐานข้อมูลชนิดพันธุ์ที่อาจจะได้รับผลกระทบถ้ามีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม ได้แก่ การลดจำนวนลงของปลาน้ำจืดที่สำรวจพบในลำน้ำแม่วงก์ (โครงการย่อยที่ 4)

4. บทบาทเชิงนิเวศวิทยาของสิ่งมีชีวิตที่เป็นทั้งผู้ล่าและเป็นแหล่งอาหาร แหล่งที่อยู่อาศัยแก่สิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ยีสต์ นก ไล้เดือนฝอย หิงห้อย และแมงมุมในระบบนิเวศป่าไม้

5. การใช้ประโยชน์จากระบบนิเวศ เช่น การนำความหลากหลายของรีนฝอยทรายไปใช้ประโยชน์ทั้งในการเฝ้าระวังการอุบัติของโรคที่มีแมลงเป็นพาหะ การนำไล้เดือนฝอยไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช การใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยสิตที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรต่างๆ ที่มีศักยภาพในการใช้เพื่อการรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อม

ข้อมูลทั้งหมดเป็นทั้งข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปต่อยอดเพื่อใช้ประโยชน์ทั้งในแง่ของการอนุรักษ์ การบริหารจัดการพื้นที่และข้อมูลเพื่อการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจและศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่างๆ ที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ครั้งนี้ ผู้วิจัยพบว่ามีเปลี่ยนแปลงในพื้นที่ที่เคยเป็นแหล่งอาศัยของสิ่งมีชีวิตหลายกลุ่ม โดยการเปลี่ยนแปลงและปรับสภาพพื้นที่เพื่ออำนวยความสะดวกแก่นักท่องเที่ยวซึ่งอาจจะต้องมีการตัดต้นไม้เพื่อปรับสภาพพื้นที่ การกำหนดเส้นทางเดินป่าสำหรับนักท่องเที่ยว พื้นที่พักค้างของนักท่องเที่ยว รวมทั้งกิจกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการเข้ามาใช้พื้นที่ของมนุษย์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความหลากหลายทางชีวภาพทั้งในแง่ของการลดจำนวนชนิด การลดลงของจำนวนประชากร เนื่องจากการดำเนินการต่างๆ ข้างต้นเป็นการรบกวนการดำรงชีวิต รบกวนแหล่งอาหาร แหล่งที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่เดิมในพื้นที่ ซึ่งผู้วิจัยได้สรุปในโครงการวิจัยย่อยที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพื่อเป็นการเฝ้าระวังและการหาแนวทางการอนุรักษ์ที่เหมาะสม

ผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ (climate change) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในพื้นที่ ปัจจัยนี้เป็นลูกโซ่ที่เกิดมาจากการกระทำของมนุษย์ในเบื้องต้น จึงต้องมีการศึกษาและหาทางป้องกันในภาพรวม ซึ่งหากมีการดูแลสภาพแวดล้อมหรืออนุรักษ์สภาพแวดล้อมให้คงไว้ในสภาพเดิม สิ่งมีชีวิตก็จะสามารถดำรงเผ่าพันธุ์และขยายพันธุ์ต่อไปได้

จากผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์เป็นแหล่งทรัพยากรทางชีวภาพที่สำคัญแหล่งหนึ่งของประเทศที่ผู้คนสามารถมาใช้บริการจากระบบนิเวศ (ecological service) ได้ เพียงแต่ต้องมีการควบคุม กำกับ ดูแลการใช้ประโยชน์ เพื่อให้ทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพนี้สามารถที่จะเอื้อประโยชน์ให้แก่ประชาชนในพื้นที่และประเทศชาติได้อย่างยั่งยืน

หน่วยงานที่สามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของกระทรวงสาธารณสุข

2. มหาวิทยาลัยนเรศวรและสถาบันการศึกษาต่างๆ

3. เกษตรกร และหน่วยงานทางด้านการเกษตร

4. หมอพื้นบ้าน อนามัยชุมชนและหน่วยงานทางด้านสาธารณสุข

5. หน่วยงานวิจัยอื่นๆ



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



รายงานการวิจัย

ชีววิทยาของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* (Hexapoda: Coleoptera: Lampyridae) ที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

(Biology of Fireflies in the Genus *Pygoluciola* (Hexapoda: Coleoptera: Lampyridae) found in Mae Wong National Park)

รองศาสตราจารย์ ดร. วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ¹

นายวิญญู พันธุ์เมืองมา¹

นายสรศักดิ์ นาคเอี่ยม¹

นายสุธน เวียงดาว²

1 ภาควิชาชีววิทยา / สถาบันวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปีที่พิมพ์ 2558



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



รายงานการวิจัย

ชีววิทยาของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* (Hexapoda: Coleoptera: Lampyridae) ที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

(Biology of Fireflies in the Genus *Pygoluciola* (Hexapoda: Coleoptera: Lampyridae) found in Mae Wong National Park)

รองศาสตราจารย์ ดร. วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ¹

นายวิญญู พันธุ์เมืองมา¹

นายสรศักดิ์ นาคเอี่ยม¹

นายสุธน เวียงดาว²

1 ภาควิชาชีววิทยา / สถาบันวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปีที่พิมพ์ 2558



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการอนุญาตจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช โดยอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ที่ได้อนุญาตให้คณะผู้วิจัยเข้าใช้พื้นที่เพื่อทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างหึ่งห้อย โดยมีนายสุธน เวียงดาว หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์และเจ้าหน้าที่ประจำอุทยานฯ ทุกท่านที่ได้อำนวยความสะดวกและให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่าง การเก็บข้อมูลด้านสภาพอากาศ ทำให้งานวิจัยนี้สามารถดำเนินการได้

ผู้วิจัยขอขอบคุณนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา นางสาวนฤมล นิมลป นางสาวศิริรัตน์ บุญอินเขียว และนายธนบรรณ ตะทิวี่ รวมทั้งนายอรุณพน พละสมบูรณ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและข้อมูลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์บางส่วน และสถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่สนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งมหาวิทยาลัยนเรศวรที่อำนวยความสะดวกในการบริหารจัดการงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สัญญาเลขที่ กบง./2556-33



บทคัดย่อ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในช่วงเดือน ตุลาคม 2557 – สิงหาคม 2558 พบตัวอย่างหิ่งห้อยในสกุลนี้ในระยะตัวอ่อนในช่วงที่สภาพอากาศเย็น อุณหภูมิในช่วงกลางคืนต่ำกว่า 17°C และมีความชื้นสัมพัทธ์สูง ส่วนตัวเต็มวัยจะพบในช่วงที่อุณหภูมิสูงขึ้น แต่ไม่พบตัวอย่างหิ่งห้อยในทุกกระยะการเจริญเติบโตในช่วงฤดูร้อนที่มีความชื้นน้อย โดยพื้นที่ที่พบหิ่งห้อยจะเป็นพื้นที่ที่มีความสูงมากกว่า 1,200 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล และมีสภาพเป็นป่าดิบเขาต่ำ แต่เนื่องจากการปรับเปลี่ยนสภาพพื้นที่จึงพบตัวอย่างหิ่งห้อยจำนวนไม่มากนัก ตัวอ่อนหิ่งห้อยที่นำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยง ส่วนใหญ่มีระยะตัวอ่อนยาวนานกว่า 9 เดือน ส่วนตัวที่เจริญเป็นตัวเต็มวัยและตัวเต็มวัยที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่สามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 ซึ่งเป็นสกุลและชนิดใหม่ของประเทศไทย

คำสำคัญ

หิ่งห้อย, *Pygoluciola*, อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Abstract

The surveys of firefly in the genus *Pygoluciola* in the Mae Wong National Park have been conducted during October 2014 – August 2015. Most of larvae were collected in the period of low night temperature (lower than 17°C) and high relative humidity. Adults appeared in higher temperature period. However, no fireflies were observed during summer with low humidity. Fireflies inhibited in low montane forest with the elevation higher than 1,200 metre above sea level. During the surveys, the area has been conversed; therefore low numbers of fireflies were collected. Most of larvae reared in rearing room have prolonged larval period up to 9 months. One of emerging adult and collected adult samples were identified as *Pygoluciola* sp.1 which is new genus and new species to Thailand.

Key words

Firefly, *Pygoluciola*, Mae Wong National Park



สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	8
อภิปรายและวิจารณ์ผล	19
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	25
คณะผู้วิจัย	29



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างหิ้งห้อยในสกุล <i>Pygoluciola</i>	7
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และปริมาณน้ำฝน	9
ตารางที่ 3 รายละเอียดการเลี้ยงตัวอ่อนหิ้งห้อยสกุล <i>Pygoluciola</i> ในห้องเลี้ยง	13
ตารางที่ 4 ความกว้างและความยาวของ pronotum ของตัวหนอนหิ้งห้อย <i>Pygoluciola</i> sp.1	14



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 สภาพพื้นที่บริเวณที่ 1 ที่พบตัวอ่อนหิ่งห้อย <i>Pygoluciola</i> sp.1	6
ภาพที่ 2 สภาพพื้นที่บริเวณที่ 2 ที่พบตัวอ่อนหิ่งห้อย <i>Pygoluciola</i>	7
ภาพที่ 3 สภาพพื้นที่บริเวณที่ 3 ที่พบตัวอ่อนหิ่งห้อย <i>Pygoluciola</i>	7
ภาพที่ 4. ตัวอ่อนของหิ่งห้อยชนิด <i>Pygoluciola</i> sp.1 ที่เลี้ยงในห้องเลี้ยง	10
ภาพที่ 5. ตัวเต็มวัยของหิ่งห้อยชนิด <i>Pygoluciola</i> sp.1	11
ภาพที่ 6. ตัวเต็มวัยเพศเมียของหิ่งห้อยชนิด <i>Pygoluciola</i> sp.1	11
ภาพที่ 7. ดักแด้ของหิ่งห้อยชนิด <i>Pygoluciola</i> sp.1 ที่เลี้ยงในห้องเลี้ยง	12
ภาพที่ 8. วิธีการวัดขนาดความกว้าง ความยาวของ pronotum ของตัวหนอนหิ่งห้อย <i>Pygoluciola</i> sp.1	14
ภาพที่ 9. ลักษณะของ aedeagus และ aedeagal sheath ของหิ่งห้อยชนิด <i>Pygoluciola</i> sp.1	16
ภาพที่ 10. ลักษณะของหิ่งห้อยชนิด <i>Pygoluciola</i> sp.1 เพศผู้	16
ภาพที่ 11. ลักษณะของหิ่งห้อยชนิด <i>Pygoluciola</i> sp.1 เพศเมีย	18



บทที่ 1

บทนำ

หิ่งห้อยเป็นแมลงปีกแข็งที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Lampyridae ลักษณะเด่นของแมลงในวงศ์นี้คือ สามารถแปลงแสงได้จากส่วนปลายของปล้องท้องด้านล่าง ส่วนใหญ่หิ่งห้อยเป็นแมลงที่ออกหากินในเวลากลางคืน แต่ในเวลากลางวันมักจะหลบซ่อนตัวอยู่ตามพื้นดิน ไต่ซากใบไม้หรือกิ่งไม้ คาดว่าทั่วโลกมีหิ่งห้อยประมาณ 2,000 ชนิด และมีมากกว่า 100 สกุล ซึ่งส่วนใหญ่แพร่กระจายอยู่ในเขตอบอุ่นของทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ และในเขตร้อนทั้งในทวีปอเมริกากลาง อเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชีย สำหรับในประเทศไทยคาดว่าจะมีหิ่งห้อยอยู่ประมาณ 100 ชนิด และมีรายงาน 33 ชนิดที่ได้ถูกระบุชื่อทางวิทยาศาสตร์แล้ว (McDermott, 1966; Theraphat, 1969; Lloyd *et al.*, 1989; Hutachareon *et al.*, 2007; Napompeth, 2009; Thancharoen, 2001; Thancharoen *et al.*, 2007; Ballantyne and Lambkin, 2009; Brancucci and Geiser, 2009) แต่ยังมีอีกหลายชนิดที่มีความสับสนในการระบุชื่อทางวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง

หิ่งห้อยเป็นแมลงที่สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความอุดมสมบูรณ์ของธรรมชาติได้ เนื่องจากลักษณะการดำรงชีวิตที่จำเป็นต้องอาศัยอยู่ในระบบนิเวศที่ยังมีความสมบูรณ์ และมีการปนเปื้อนของมลพิษต่ำ สามารถพบตัวอ่อนของหิ่งห้อยอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำและบนบก ซึ่งพื้นที่ภายในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ที่ยังคงความอุดมสมบูรณ์ของผืนป่า เป็นแหล่งต้นน้ำและเป็นส่วนหนึ่งของผืนป่าตะวันตก ซึ่งเป็นผืนป่าที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของประเทศไทยและของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อีกด้วย ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นแหล่งอาศัยที่เหมาะสมของหิ่งห้อยหลายสกุลและหลายชนิด

จากการศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายชนิดของหิ่งห้อยในภาคเหนือของประเทศไทยที่ดำเนินการโดย สรศักดิ์ นาคเยี่ยมและวันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ พบว่าหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* เป็นสกุลหิ่งห้อยที่หายากในประเทศไทย เคยมีรายงานว่าหิ่งห้อยสกุลนี้พบได้เฉพาะบนเกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย เกาะมินดาเนา ประเทศฟิลิปปินส์ และบนแผ่นดินใหญ่ของสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนจีนเท่านั้น (Ballantyne, 1968:2008; Ballantyne and Lambkin, 2001; Fu and Ballantyne, 2008; Olivier, 1885) ในประเทศไทยเคยมีการสำรวจพบน้อยครั้งมากและคาดว่าจะมีแหล่งอาศัยในพื้นที่ที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเล ซึ่งพื้นที่ภายในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์บางพื้นที่มีความสูงที่เหมาะสมและคาดว่าจะมีแหล่งอาศัยของหิ่งห้อยในสกุลนี้ รวมทั้งยังมีสภาพแวดล้อมที่อุดมสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามข้อมูลทางด้านชีววิทยาของหิ่งห้อยในสกุลนี้ยังมีอยู่น้อยมากทั้งข้อมูลจากสภาพถิ่นอาศัยและข้อมูลทางด้านวงจรชีวิต และเนื่องจากหิ่งห้อยสกุลนี้ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย และยังขาดผู้เชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธานที่จะระบุชนิดได้อย่างถูกต้อง รวมทั้งยังไม่มีข้อมูลของระยะตัวอ่อนและระยะดักแด้ของหิ่งห้อยชนิดดังกล่าว ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ใช้ประกอบการยืนยันถึงระดับชนิดได้ จึงต้องมีการศึกษารายละเอียดทางชีววิทยาของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ได้แก่ ชีววิทยา วงจรชีวิต ลักษณะทางสัณฐาน และถิ่นที่อยู่อาศัยของหิ่งห้อย *Pygoluciola* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์



วงศ์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการระบุชื่อทางวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ซึ่งนักวิจัยสามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการศึกษาเกี่ยวกับหิ่งห้อยในสกุลนี้และสกุลอื่นๆ เพื่อนำไปสู่การศึกษาเพื่อการอนุรักษ์และการรักษาลึนอาศัยในธรรมชาติของหิ่งห้อยให้คงอยู่ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวงจรชีวิตของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
2. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ
3. เพื่อศึกษาลักษณะถิ่นอาศัยของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
4. เพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์และจัดทำรูปวิธานของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

หิ่งห้อยถูกจัดให้อยู่ในอันดับแมลงปีกแข็ง (Coleoptera Linnaeus, 1758) ซึ่งเป็นอันดับของแมลงที่มีความหลากหลายสูงที่สุด วงศ์หิ่งห้อย (Lampyridae Rafinesque, 1815) ประกอบด้วยวงศ์ย่อยอีก 5 วงศ์ย่อย คือ Amydetinae Olivier, 1907; Lampyrinae Rafinesque, 1815; Luciolinae Lacordaire, 1857; Photurinae Lacordaire, 1857 และ Psilocladinae McDermott, 1964 (Bouchard *et al.*, 2011) ทั่วโลกมีรายงานการบรรยายลักษณะของหิ่งห้อยแล้วมากกว่า 2,000 ชนิด ในกว่า 100 สกุล (Stanger-Hall *et al.*, 2007) หิ่งห้อยเป็นแมลงกลางคืนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง รูปร่างแบนยาว ลำตัวยาวประมาณ 3 – 33 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้าเป็นแบบ elytra แต่จะไม่ใช่ sclerite ที่แข็งมากเช่นที่พบในด้วงปีกแข็งวงศ์อื่น ๆ ในอันดับเดียวกัน แผ่นอกปล้องแรก (pronotum) จะแผ่ออกกว้างปกคลุมบางส่วนของหรือทั้งหมดของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน หนวดมี 11 ปล้องแบบเส้นด้าย (filiform) หรือแบบฟันเลื่อย (serrate) เพศผู้มีตาขนาดใหญ่มาก และขนาดเล็กมากในเพศเมีย อวัยวะเปล่งแสงของหิ่งห้อยเพศผู้ตั้งอยู่บนปล้องท้องปล้องที่ 6 – 7 และเพศเมียพบในปล้องที่ 7 เท่านั้น (David and Ananthakrishnan, 2004) มีทั้งที่มีปีกบินได้ทั้งสองเพศ หรือเพศเมียไม่มีปีกหรือมีปีกขนาดเล็กรูปร่างคล้ายตัวหนอนไม่สามารถบินได้ สามารถเรียงลำดับชั้นอนุกรมวิธานของหิ่งห้อยได้ดังนี้ (Booth *et al.*, 1990; David and Ananthakrishnan, 2004)

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Coleoptera

Suborder: Polyphaga

Superfamily: Elateroidea

Family: Lampyridae

การศึกษาอนุกรมวิธานของหิ่งห้อยได้รับการทบทวนโดยนักกีฏวิทยาหลายท่าน โดยเฉพาะ McDermott (1964) ได้วางแบบแผนการศึกษาอนุกรมวิธานของหิ่งห้อยทั่วโลกไว้อย่างชัดเจน โดยสร้างรูปวิธานของหิ่งห้อยในระดับวงศ์ย่อย (subfamilies) จนถึงระดับเหล่าย่อย (subtribes) ซึ่งเป็นพื้นฐานของการจัดอันดับอนุกรมวิธานของหิ่งห้อยจนมาถึงปัจจุบัน และมีการทบทวนและสร้างรูปวิธานสำหรับหิ่งห้อยหลายสกุลในภูมิภาคเอเชียและออสเตรเลียโดย Ballantyne and McLean (1970) ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาอนุกรมวิธานของหิ่งห้อยในภูมิภาคนี้

การศึกษาหิ่งห้อยทางวิชาการครั้งแรกในประเทศไทยเกิดขึ้นเมื่อวันที่ 7 พฤศจิกายน พ.ศ. 2472 โดยพันตรี W.R.S. Ladell ได้เก็บตัวอย่างหิ่งห้อย *Luciola substriata* (Gorh.) ซึ่งได้รับการจัดจำแนกชนิดโดย G.E. Bryant และปัจจุบันตัวอย่างหิ่งห้อยได้ถูกเก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์แมลง กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร (คณะกรรมการโครงการหิ่งห้อยในพระราชดำริ, 2544) การศึกษาความหลากหลายชนิดของหิ่งห้อยในประเทศ



ไทยได้เริ่มขึ้นอย่างจริงจังภายใต้โครงการศึกษาความหลากหลายและนิเวศวิทยาของหิ่งห้อยในประเทศไทยในพระราชดำริฯ ในสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ และได้รับความร่วมมือจากผู้เชี่ยวชาญด้านแมลงจากสถาบันการศึกษาต่าง ๆ ทั้งสี่ภาคของประเทศ ได้ทำการสำรวจในระหว่างปี พ.ศ. 2540 – 2543 รวมทั้งสิ้น 35 จังหวัด พบว่ามีหิ่งห้อยที่สามารถระบุสกุลได้ 10 สกุล ได้แก่ 1. *Diaphanes*, 2. *Lamprigera*, 3. *Lucidina*, 4. *Luciola*, 5. *Pteroptyx*, 6. *Pyrocoelia*, 7. *Pyrophanes*, 8. *Rhagophthalmus*, 9. *Stenocladus* และ 10. *Vesta* และคาดว่าจะมีมากกว่า 100 ชนิด แต่ส่วนใหญ่ยังไม่สามารถระบุชนิดของหิ่งห้อยได้ (คณะกรรมการโครงการหิ่งห้อยในพระราชดำริ, 2544) ผลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้องค์ความรู้เกี่ยวกับหิ่งห้อยในประเทศไทยได้พัฒนาขึ้นและกระตุ้นให้เกิดการศึกษาหิ่งห้อยในประเทศไทยอย่างกว้างขวางยิ่งขึ้น

จากการศึกษาความหลากหลายของประชากรหิ่งห้อยในอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่และบริเวณที่ราบภาคกลางบางพื้นที่โดย Thancharoen (2001) ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2541 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2543 พบหิ่งห้อยทั้งหมด 14 ชนิด จาก 8 สกุล และมีหิ่งห้อยที่ได้รับชื่อวิทยาศาสตร์แล้วในขณะนั้น 6 ชนิด คือ *Luciola brahmina* (*L. aquatilis* Thancharoen 2007), *L. chinensis*, *L. circumdata*, *Pteroptyx malacca*, *P. valida* และ *Pyrocoelia insidiosa* และในปี พ.ศ. 2547 วิรัตน์ สมมิตรได้ทำการศึกษานิเวศประชากรของหิ่งห้อย *Pyrocoelia praetexta* Olivier ในสวนพฤกษศาสตร์ดอกท้อ อ.แมริม จ.เชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2545 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2546 พบหิ่งห้อยทั้งหมด 7 ชนิด ใน 4 สกุล คือ *Diaphanes* sp., *Luciola ovalis*, *L. substriata*, *L. sp.*, *Pyrophanes indica*, *Pyrocoelia grata* และ *P. praetexta* และจากผลการศึกษาทำให้ทราบถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมในการออกสำรวจหิ่งห้อย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการกำหนดวิธีการศึกษาถึงความหลากหลายชนิดและนิเวศวิทยาของหิ่งห้อย

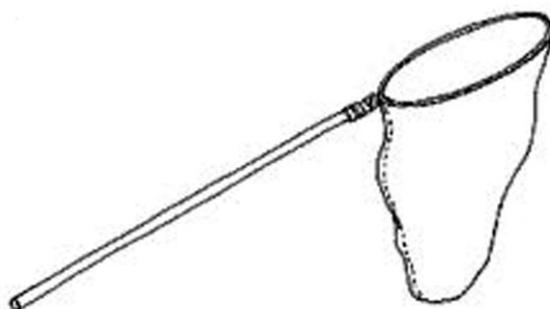
หิ่งห้อยสกุล *Pygoluciola* ถูกตั้งขึ้นโดย Wittmer ในปี ค.ศ.1939 โดยตั้งสกุล *Pygoluciola* นี้ให้กับหิ่งห้อย *P. stylifer* เพียงชนิดเดียวที่เก็บตัวอย่างได้จากเกาะบอร์เนียว เนื่องจากหิ่งห้อยสกุลนี้มีลักษณะของปลายปล้องท้องที่ยื่นยาวออกมาทั้งด้านบนและด้านล่าง แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในหิ่งห้อยสกุลอื่น ต่อมาในปี ค.ศ.1966 McDermott ได้ระบุให้สกุล *Pygoluciola* เป็นเพียงสกุลย่อยของหิ่งห้อยในสกุล *Luciola* เท่านั้น จนกระทั่งในปี ค.ศ.2006 Ballantyne and Lambkin ได้ทำการวิเคราะห์ phylogeny ของหิ่งห้อยวงศ์ย่อย Luciolinae ได้สนับสนุนให้มีการยกหิ่งห้อย *Pygoluciola* กลับขึ้นสู่ระดับสกุลอีกครั้ง ปัจจุบันพบหิ่งห้อยสกุลนี้ที่ถูกระบุชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องแล้วมีทั้งสิ้น 7 ชนิด ประกอบด้วย *P. guigliae* (Ballantyne, 1968), *P. hamulata* (Olivier, 1885), *P. kinabalua* (Ballantyne and Lambkin, 2001), *P. qingyu* (Fu and Ballantyne, 2008), *P. satoi* (Ballantyne, 2008), *P. stylifer* Wittmer, 1939 และ *P. wittmeri* (Ballantyne, 1968) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการค้นพบหิ่งห้อยสกุลนี้ในประเทศไทย จนกระทั่ง ปี 2012 Wandee Wattanachaiyingcharoen and Sorasak Nak-eiam ได้รายงานการค้นพบหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

1.1 การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างหึ่งห้อยสกุล *Pygoluciola* ในพื้นที่ตัวแทนต่าง ๆ ที่เลือกไว้ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2556 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ.2558 เฉลี่ยเดือนละ 1 ครั้ง ด้วยวิธี systematic random sampling (Krebs, 1999) โดยออกเก็บตัวอย่างหึ่งห้อยในพื้นที่ต่าง ๆ ด้วยสวิงจับแมลง (insect sweep net) ตั้งแต่เวลา 18.00 น. จนกระทั่งเวลา 24.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่หึ่งห้อยมีกิจกรรมสูง (วีรัตน์ สมมิตร, 2547) หึ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* แต่ละชนิด จะถูกเก็บเป็นตัวอย่างศึกษาชนิดละ 20 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 15 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว



สวิงจับแมลง (insect sweep net)

1.2 ตัวอย่างหึ่งห้อยที่เก็บได้จะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ 1) เก็บเป็นตัวอย่างที่มีชีวิต โดยจับคู่เพศผู้-เพศเมีย 5 คู่ แยกเลี้ยงในกล่องเลี้ยงแมลง กล่องละหนึ่งคู่ เพื่อนำกลับไปศึกษาวงจรชีวิตและพฤติกรรมในห้องปฏิบัติการ และ 2) เก็บรักษาตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 70 % หรือ 95 % จำนวน 10 ตัว เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการระบุชนิดต่อไป ซึ่งวิธีการระบุชนิดของหึ่งห้อยจะต้องผ่าตัดเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้อย่างน้อย 5 ตัวอย่าง เมื่อระบุชนิดได้แล้วตัวอย่างหึ่งห้อยที่เหลือจากการผ่าตัดจะถูกทำเป็นตัวอย่างแห้งและส่งมอบให้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เพื่อเก็บรักษา

1.3 บันทึกวันที่ เวลา สถานที่เก็บตัวอย่างโดยใช้เครื่องวัดพิกัดบนพื้นโลก (GPS receiver) รวมทั้งบันทึกสภาพอากาศ และลักษณะถิ่นอาศัยรวมทั้งลักษณะทางชีววิทยาอื่นๆ ของตัวอย่างหึ่งห้อยที่ทำการเก็บตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นข้อมูลเชิงนิเวศวิทยา



2. การจำแนกชนิดตัวอย่างหิ่งห้อย

ตัวอย่างหิ่งห้อยจะถูกจัดจำแนกชนิดโดยใช้คู่มืออนุกรมวิธานของหิ่งห้อย และเอกสารอ้างอิงทางวิชาการต่างๆ ได้แก่

Revisional studies of Australia and Indomalayan *Luciolini* (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae). (Ballantyne, 1968).

A new firefly, *Luciola* (*Pygoluciola*) *kinabalua*, new species (Coleoptera: Lampyridae), from Malaysia, with observations on a possible copulation clamp. (Ballantyne and Lambkin, 2001).

A phylogenetic reassessment of the rare S.E. Asian firefly genus *Pygoluciola* Wittmer (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae). (Ballantyne and Lambkin, 2006).

Pygoluciola satoi, a new species of the rare S. E. Asian firefly genus *Pygoluciola* Wittmer (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) from the Philippines. (Ballantyne, 2008).

Taxonomy and behaviour of Lucioline fireflies (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) with redefinition and new species of *Pygoluciola* Wittmer from mainland China and review of *Luciola* LaPorte. (Fu and Ballantyne, 2008).

Systematics of Indo-Pacific fireflies with a redefinition *Atyphella* Olliff, Madagascan *PhoturoLuciola* Pic, and description of seven new genera from the Luciolinae (Coleoptera: Lampyridae). (Ballantyne and Lambkin, 2009).

3. การศึกษาวงจรชีวิตและลักษณะทางสัณฐาน

3.1 นำหิ่งห้อยตัวเต็มวัยที่มีชีวิตเพศผู้และเพศเมียมาจับคู่เลี้ยงไว้ในกล่องเลี้ยงแมลงพลาสติก (กว้างxยาวxสูง = 13x17x6.5 cm) ซึ่งเจาะด้านข้างและด้านบนกล่องเป็นช่องขนาดใหญ่ และปิดช่องด้วยผ้าตาข่ายเพื่อให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก ภายในกล่องปูพื้นด้วยกระดาษชำระ พรมน้ำให้ทั่วพอสมควร และใส่ก้อนสำลีชุ่มน้ำลงไป เพื่อเพิ่มความชื้น จัดวางกล่องเลี้ยงไว้ในสภาวะห้องปฏิบัติการ

3.2 เมื่อหิ่งห้อยเพศเมียได้รับการผสมพันธุ์แล้วจะวางไข่ไว้บนก้อนสำลีหรือกระดาษชำระ จากนั้นนำหิ่งห้อยตัวเต็มวัยออกจากกล่องเลี้ยง และนำกล่องเลี้ยงที่มีไข่วางเลี้ยงในสภาวะเดิมต่อไปจนกว่าจะไข่จะฟักบนที่ระยะเวลา อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่เริ่มจับคู่ผสมพันธุ์จนกระทั่งไข่ฟัก

3.3 ตัวหนอนหิ่งห้อยที่ฟักออกจากไข่แต่ละตัวจะถูกแยกเลี้ยงในกล่องเลี้ยงแมลงขนาดเดิม ที่เตรียมวัสดุเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ให้อาหารตัวหนอนหิ่งห้อยด้วยเนื้อหอยทากสยาม *Cryptozonia siamensis* ในระยะตัวหนอนวัยแรก เปลี่ยนวัสดุเลี้ยงและอาหารทุกวัน เมื่อหนอนหิ่งห้อยวัยแรกลอกคราบแล้ววัดขนาดสัณฐานภายนอกต่าง ๆ ของคราบ และบันทึกจำนวนวันที่ใช้ในการเจริญเติบโตจากระยะไข่ถึงการลอกคราบครั้งที่หนึ่ง เป็นจำนวนวันในการเจริญเติบโตของตัวอ่อนระยะที่ 1



3.4 เลี้ยงตัวหนอนหึ่งห้อยในระยะต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.3 แต่เปลี่ยนการให้อาหารเป็นหอยทากสยามที่มีชีวิตจนกระทั่งหึ่งห้อยเข้าสู่ระยะดักแด้ซึ่งไม่ต้องให้อาหารอีกต่อไป วัดขนาดของลักษณะสัณฐานภายนอกต่าง ๆ ของคราบ และบันทึกจำนวนวันที่ใช้ในการเจริญเติบโตทุกระยะ เมื่อหึ่งห้อยตัวเต็มวัยออกจากระยะดักแด้แล้ว ทำการวัดขนาดลักษณะสัณฐานภายนอกต่าง ๆ ของตัวเต็มวัย และเลี้ยงต่อไปในกล่องเลี้ยง โดยให้อาหารเป็นน้ำผึ้ง 5% ชุบสำลี

3.5 คัดเลือกหึ่งห้อยเพศผู้และเพศเมียที่สมบูรณ์มาจับคู่เพื่อผสมพันธุ์ต่อไป เพื่อยืนยันการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและเพื่อการขยายพันธุ์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างหึ่งห้อยในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างหึ่งห้อยในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ สามารถเก็บหึ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ได้เฉพาะในบริเวณพื้นที่ที่มีความสูงในระดับ 1,200 - 1,300 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล (msl.) โดยเก็บตัวอย่างหึ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ได้จาก 3 บริเวณ ซึ่งพื้นที่ทั้งหมดมีสภาพเป็นแบบป่าดิบเขาต่ำ (lower montane forest) (16°11.30' N, 99°15.50' E, 25.IV.2000) ที่มีพืชพรรณปกคลุมและเป็นพื้นที่ที่มีความชุ่มชื้น พื้นที่ดังกล่าวมีลักษณะกายภาพ ดังนี้

บริเวณที่ 1 (ภาพที่ 1) มีลักษณะเป็นแอ่งน้ำที่ต่อเนื่องมาจากทางน้ำขนาดเล็ก มีต้นไม้ขึ้นโดยรอบ ภายในแอ่งน้ำมีใบไม้ที่หล่นจากต้นไม้ โดยในช่วงที่มีฝนตกจะมีน้ำขังในบริเวณแอ่งดังกล่าว พืชที่พบในบริเวณนี้คือ พญาเสือโคร่ง ปาหนันแม่วงก์ โปบาย ส้มกุ้ง ตีนตุ๊กแก เฟิน บอน

บริเวณที่ 2 (ภาพที่ 2) มีลักษณะเป็นทางลาดลงจากภูเขาที่มีน้ำไหลจากด้านบนลงมาสู่ด้านล่าง มีน้ำขังเป็นระยะๆ โดยเฉพาะในช่วงที่มีฝนตก บริเวณพื้นที่มีต้นไม้ที่มีขนาดเล็กปกคลุม ได้แก่ พญาเสือโคร่ง กัลยป่า ไผ่เลื้อย ไผ่พุ่ม ลำพูป่า

บริเวณที่ 3 (ภาพที่ 3) มีลักษณะเป็นพื้นที่ชุ่มชื้นติดกับเชิงเขา มีแอ่งน้ำขนาดเล็กที่มีน้ำขัง มีต้นไม้เจริญอยู่โดยรอบ โดยพืชที่พบในบริเวณนี้ ได้แก่ กัลยป่า ช้างร้อง บอน แห้วใหญ่ ทองหลางป่า ลำพูป่า พืชตระกูลปอ



ภาพที่ 1 สภาพพื้นที่บริเวณที่ 1 ที่พบตัวอย่างหึ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola*



ภาพที่ 2 สภาพพื้นที่บริเวณที่ 2 ที่พบตัวอ่อนหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola*



ภาพที่ 3 สภาพพื้นที่บริเวณที่ 3 ที่พบตัวอ่อนหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola*

จากการสำรวจหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ทั้งสิ้น 11 ครั้ง สามารถเก็บตัวอย่างหิ่งห้อยในระยะที่เป็นตัวอ่อนจำนวน 26 ตัว และพบหิ่งห้อยในระยะตัวเต็มวัยจำนวนหนึ่งที่พบบินในระดับสูง จึงสามารถเก็บตัวอย่างได้เฉพาะเพศผู้ จำนวน 4 ตัว บริเวณที่พบการแพร่กระจายตัวของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ส่วนใหญ่จะเป็นพื้นที่ที่มีความลาดชันสูง มีแหล่งน้ำไหลตามธรรมชาติขนาดเล็กและมีสภาพค่อนข้างชื้น และจะพบหิ่งห้อยในสกุลนี้อยู่ในพื้นที่ร่วมกับหิ่งห้อยในสกุลและชนิดอื่น (sympatric) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ครั้งที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ระยะเวลาเจริญของหิ่งห้อยที่พบ	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	รายละเอียด
1	11 ตุลาคม 2557	ตัวอ่อน	1	มีน้ำขังในบริเวณที่ 1 และ 2 และสามารถเก็บตัวอ่อนหิ่งห้อยสกุล <i>Pygoluciola</i> ได้จำนวน 1 ตัว
2	18 ตุลาคม 2557	-	-	มีน้ำขังในบริเวณที่ 1 และ 2 แต่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างหิ่งห้อยในสกุล <i>Pygoluciola</i> ได้
3	8 พฤศจิกายน 2557	ตัวอ่อน	4	มีฝนตกเล็กน้อย และมีน้ำขังในบริเวณที่ 1 ส่วนในบริเวณที่ 2 มีน้ำไหล พบตัวอ่อนหิ่งห้อยสกุล <i>Pygoluciola</i> ทั้งในบริเวณที่ 1 และ 2 จำนวน 4 ตัว อยู่ร่วมกับตัวอ่อนหิ่งห้อยในสกุล <i>Abscondita</i> และในบริเวณใกล้เคียงกันพบตัวอ่อนหิ่งห้อยสกุล <i>Diaphanes</i> และสกุล <i>Pyrocoelia</i> รวมทั้งตัวเต็มวัยเพศผู้ของหิ่งห้อยสกุล <i>Lamprigera</i>
4	19 พฤศจิกายน 2557	ตัวอ่อน	9	บริเวณที่ 1 น้ำแห้ง แต่ในบริเวณที่ 2 ยังพบว่ามีน้ำไหล เก็บตัวอ่อนหิ่งห้อยสกุล <i>Pygoluciola</i> ในบริเวณที่ 2 ได้จำนวน 9 ตัว โดยอยู่ร่วมกับตัวอ่อนหิ่งห้อยในสกุล <i>Abscondita</i> และในบริเวณใกล้เคียงยังพบตัวอ่อนหิ่งห้อยสกุล <i>Diaphanes</i> และ <i>Pyrocoelia</i>
5	8 ธันวาคม 2557	ตัวอ่อน	2	บริเวณที่ 1 น้ำแห้ง แต่มีน้ำไหลในบริเวณที่ 2 พบตัวอ่อนหิ่งห้อยสกุล <i>Pygoluciola</i> ในบริเวณที่ 2 จำนวน 2 ตัว และในบริเวณใกล้เคียงพบตัวอ่อนหิ่งห้อยสกุล <i>Diaphanes</i> และ <i>Pyrocoelia</i> และพบตัวเต็มวัยเพศผู้ของหิ่งห้อยสกุล <i>Diaphanes</i> และ <i>Pyrocoelia</i>



ครั้งที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ระยะการเจริญของหิ่งห้อยที่พบ	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	รายละเอียด
6	21 ธันวาคม 2557	-	-	บริเวณที่ 1 น้ำแห้ง และในบริเวณที่ 2 ไม่มีน้ำไหล อากาศค่อนข้างแห้งแล้ง และไม่พบตัวอ่อนของหิ่งห้อยทั้งในสกุล <i>Pygoluciola</i> และหิ่งห้อยสกุล/ชนิดอื่น
7	4 มีนาคม 2558	ตัวอ่อน	5	เป็นช่วงฤดูแล้ง พบว่าในบริเวณที่ 1 และ 2 สภาพแห้ง ไม่มีน้ำขัง และไม่พบตัวอ่อนหิ่งห้อย แต่สามารถพบตัวอ่อนหิ่งห้อยในสกุล <i>Pygoluciola</i> ในบริเวณที่ 3 จำนวน 5 ตัว
8	19 มีนาคม 2558	ตัวอ่อน	5	บริเวณที่ 1 และ 2 มีสภาพแห้งแล้ง ไม่มีน้ำขัง และไม่พบตัวอ่อนหิ่งห้อยในพื้นที่ดังกล่าว แต่สามารถเก็บตัวอย่างหิ่งห้อยสกุล <i>Pygoluciola</i> ในระยะตัวอ่อนได้จากบริเวณที่ 3 จำนวน 5 ตัว
9	27 มีนาคม 2558	หิ่งห้อยตัวเต็มวัยเพศผู้	4	พบหิ่งห้อยตัวเต็มวัยในสกุล <i>Pygoluciola</i> ในบริเวณที่ 1 บินอยู่ตามขอบชายป่า ประมาณ 10-15 ตัว (แต่สามารถเก็บตัวอย่างได้เพียง 4 ตัว) หิ่งห้อยจะเริ่มออกบินตั้งแต่วันที่ประมาณ 1 ทุ่ม จนถึงเวลาประมาณ 4 ทุ่ม จากนั้นจะเริ่มลงเกาะตามกิ่งไม้ ใบไม้ของพืชที่อยู่ในบริเวณนั้น
10	6 มิถุนายน 2558	-	-	สภาพพื้นที่มีความแห้งแล้ง ไม่มีแหล่งน้ำขัง พบตัวอ่อนของหิ่งห้อยที่อยู่ในวงศ์ย่อย <i>Luciolinae</i> แต่ไม่ทราบชนิด และไม่พบหิ่งห้อยในสกุล <i>Pygoluciola</i>
11	12 สิงหาคม 2558	-	-	สภาพพื้นที่แห้งแล้ง ไม่มีแหล่งน้ำขัง พบตัวอ่อนหิ่งห้อยในสกุล <i>Lamprigera</i> แต่ไม่พบหิ่งห้อยในสกุล <i>Pygoluciola</i>
	รวม	ตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศผู้	26 4	

จากการเก็บตัวอย่างหึ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ในช่วงเดือนตุลาคม 2557 จนถึงเดือนสิงหาคม 2558 สามารถเก็บตัวอย่างหึ่งห้อยในสกุลนี้ที่อยู่ในระยะตัวอ่อนได้ตั้งแต่ช่วงเดือนพฤศจิกายน – เดือนมีนาคม ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำ โดยพื้นที่ที่สำรวจพบหึ่งห้อยสกุลนี้มีความชื้นสัมพัทธ์สูงตลอดเวลาถึงแม้ว่าจะไม่มีรายงานฝนตกในช่วงดังกล่าวก็ตาม และอุณหภูมิในช่วงเวลาที่สามารถพบตัวอย่างหึ่งห้อยในสกุลนี้คือ อุณหภูมิต่ำสุดในช่วงกลางคืน (18.00-06.00 น.) ต่ำกว่า 18 °C และ อุณหภูมิสูงสุดในช่วงกลางวันจะไม่สูงเกินกว่า 30 °C และในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์จะพบหึ่งห้อยสกุลนี้ในระยะที่เป็นตัวเต็มวัยได้ในช่วงเดือนมีนาคมซึ่งเป็นช่วงที่อุณหภูมิเริ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และปริมาณน้ำฝนในบริเวณพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2557 ถึงเดือนกรกฎาคม 2558

ลักษณะทางกายภาพ		พ.ศ. 2557			พ.ศ. 2558					
		ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.
กลางวัน (06.00 - 18.00)	ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิสูงสุด (°C)	22.7	24.27	24.63	N/A	29.53	26.38	26.44	25.28	23.75
	ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิต่ำสุด (°C)	19.2	18.39	15.9	13.5	18.32	18.52	19.77	19.92	19.57
	ค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด (%)	96	89.97	N/A	93	81.48	81.17	90.19	92.00	95.94
	ค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุด (%)	89	74.13	N/A	N/A	48.68	56.07	67.19	75.03	83.94
กลางคืน (18.00 - 06.00)	ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิสูงสุด (°C)	22.5	23.40	22.49	21.1	25.33	24.72	23.41	23.21	21.16
	ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิต่ำสุด (°C)	19.5	18.03	16.34	13.1	17.51	18.84	19.42	19.15	19.01
	ค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด (%)	98	87.30	84.14	91	78.68	81.97	90.16	93.73	96.26
	ค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุด (%)	90	73.93	69.63	60	56.94	62.73	72.90	80.00	90.84
ปริมาณ น้ำฝน	ปริมาณน้ำฝนสูงสุด (ม.ม.)	N/A	35	N/A	N/A	0	0	0	32	18
	ปริมาณน้ำฝนต่ำสุด (ม.ม.)	N/A	0	N/A	N/A	0	0	0	5	5

2. การเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

หึ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ในระยะตัวอ่อนที่เก็บมาจากพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ทั้ง 26 ตัว ถูกนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยให้หมายเลขของแต่ละตัวเพื่อความสะดวกในการบันทึกข้อมูล (ตารางที่ 3) โดยจัดให้ห้องเลี้ยงมีอุณหภูมิเฉลี่ย 22-28 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 40-70% และการให้แสง มีด : สว่าง เท่ากับ 12:12 ตัวอ่อนจะถูกเลี้ยงในกล่องพลาสติกใสที่รองด้านล่างของกล่องด้วยกระดาษซับความชื้นและให้ความชื้นที่เพียงพอแต่ไม่มากเกินไป มีการเปลี่ยนกระดาษซับความชื้นที่รองกล่องและให้อาหารตามความต้องการของหึ่งห้อยอาหารที่ให้คือ หอยทากสยาม (*Cryptozonia siamensis* (Pfeiffer, 1856))

ตัวอ่อนส่วนใหญ่ที่นำมาเลี้ยงจะมีพฤติกรรมที่ว่องไวในช่วงต้นของการเลี้ยง โดยมีการกินอาหารและเคลื่อนไหวตามปกติ แต่จะมีบางส่วนที่ตายไปภายหลังจากการเลี้ยงไประยะหนึ่ง ส่วนหนึ่งห้อยที่เหลืออีก 10 ตัว (หมายเลข 1, 2, 4, 6, 11, 16, 17, 19, 21, 22) (ตารางที่ 3) หยุดการเคลื่อนไหวและหยุดกินอาหารไปในระยะเวลาประมาณ 3 - 4 เดือน (เดือนเมษายน - เดือนสิงหาคม) ซึ่งตัวที่มีอายุการเลี้ยงมากที่สุด เป็นระยะเวลา 9 เดือน (หมายเลข 1, 2, 4 และ 6) แต่ยังคงตอบสนองเมื่อมีการรบกวน และพบว่าตัวอ่อนเหล่านี้กลับมากินอาหารอีกครั้งเมื่อเดือนสิงหาคม

พฤติกรรมการกินอาหารของหิ่งห้อยจะเป็นแบบผู้ล่า (predator) โดยการมุดตัวเข้าไปกินตัวหอยที่อยู่ภายในเปลือก เมื่อกินอาหารไปแล้วจะหยุดนิ่ง บางครั้งอาจหยุดนิ่งไปหลายวัน ก่อนที่จะ active และเริ่มกินอาหารอีกครั้ง ในระหว่างการเลี้ยงมีหิ่งห้อยบางส่วนตายไป (ตารางที่ 3) แต่มีตัวอ่อนหมายเลข 13 ที่เก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 19 พฤศจิกายน 2557 และถูกนำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยง สามารถเจริญเติบโตจนกระทั่งออกมาเป็นตัวเต็มวัยเมื่อวันที่ 5 มีนาคม 2558 โดยเป็นตัวเต็มวัยเพศเมีย (ภาพที่ 4) แต่มีช่วงอายุสั้นมากเพียง 11 วัน โดยตายไปเมื่อวันที่ 16 มีนาคม 2558 และเนื่องจากในช่วงดังกล่าวไม่สามารถหาตัวเต็มวัยเพศผู้ให้มาผสมพันธุ์ได้ จึงไม่สามารถเลี้ยงจนครบวงจรชีวิต เป็นที่น่าสังเกตว่า ช่วงเวลาที่หิ่งห้อยที่เลี้ยงในห้องเลี้ยงออกมาเป็นตัวเต็มวัยนั้น (เดือนมีนาคม) เป็นช่วงเวลาใกล้เคียงกับที่พบตัวเต็มวัยของหิ่งห้อยชนิดนี้ในพื้นที่อุทยานฯ นอกจากนี้ยังมีตัวอ่อนหิ่งห้อยอีก 1 ตัว (หมายเลข 14) ที่สามารถเข้าดักแด้ (เมื่อวันที่ 18 มิถุนายน 2558) แต่ไม่สามารถลอกคราบออกมาเป็นตัวเต็มวัยได้และตายไปเมื่อวันที่ 20 มิถุนายน 2558



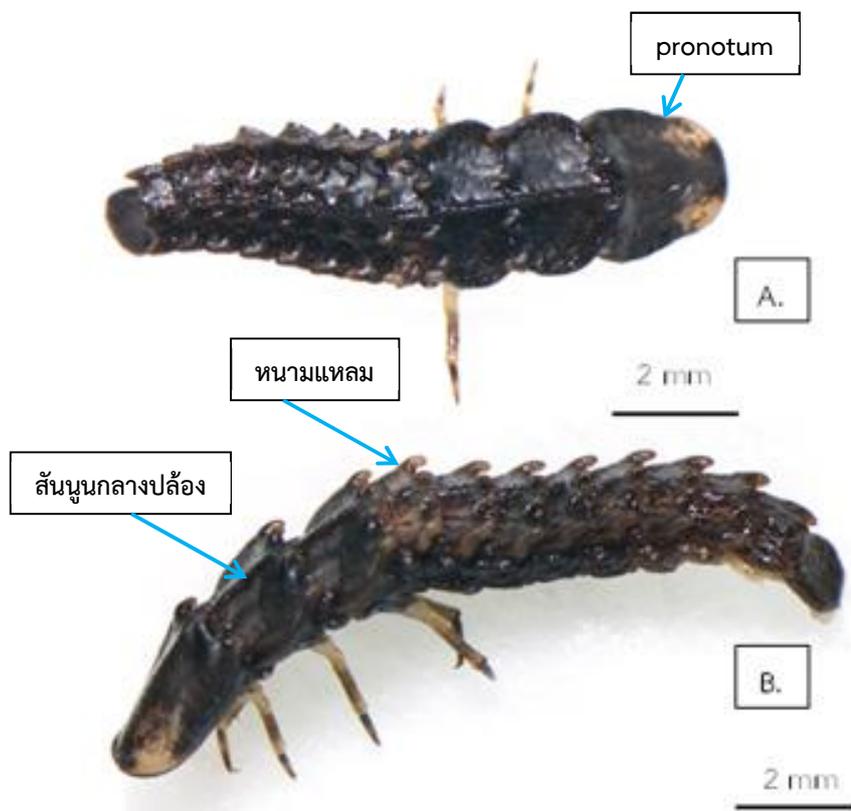
ภาพที่ 4. ตัวเต็มวัยของหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 เมื่อออกมาจากดักแด้ใหม่ๆ

ตารางที่ 3 รายละเอียดการเลี้ยงตัวอ่อนหึ่งห้อยสกุล *Pygoluciola* ในห้องเลี้ยง

ตัวที่	ชนิด	วันที่เก็บ ตัวอย่าง	วันที่ ลอกคราบ	วันที่เข้า ตักแต่	วันที่เป็น ตัวเต็มวัย	วันที่ตาย
1	<i>Pygoluciola</i> sp.1	8-พ.ย.-57	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
2	<i>Pygoluciola</i> sp.1	8-พ.ย.-57	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
3	<i>Pygoluciola</i> sp.1	8-พ.ย.-57	8-พ.ย.-57			7-มี.ค.-58
4	<i>Pygoluciola</i> sp.1	8-พ.ย.-57	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
5	<i>Pygoluciola</i> sp.1	11-ต.ค.-57	-			19-ก.ค.-58
6	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-พ.ย.-57	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
7	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-พ.ย.-57	-			25-เม.ย.-58
8	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-พ.ย.-57	-			20-เม.ย.-58
9	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-พ.ย.-57	-			11-มี.ค.-58
10	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-พ.ย.-57	-			9-ก.ค.-58
11	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-พ.ย.-57	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
12	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-พ.ย.-57	-			21-ก.ค.-58
13	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-พ.ย.-57	-	-	5-มี.ค.-58	16-มี.ค.-58
14	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-พ.ย.-57	-	18-มิ.ย.-58		20-มิ.ย.-58
15	<i>Pygoluciola</i> sp.1	8-ธ.ค.-57	-			19-ก.ค.-58
16	<i>Pygoluciola</i> sp.1	8-ธ.ค.-57	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
17	<i>Pygoluciola</i> sp.1	4-มี.ค.-58	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
18	<i>Pygoluciola</i> sp.1	4-มี.ค.-58	-			11-ส.ค.-58
19	<i>Pygoluciola</i> sp.1	4-มี.ค.-58	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
20	<i>Pygoluciola</i> sp.1	4-มี.ค.-58	-			2-เม.ย.-58
21	<i>Pygoluciola</i> sp.1	4-มี.ค.-58	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
22	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-มี.ค.-58	-	ยังอยู่ในระหว่างการเลี้ยง		
23	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-มี.ค.-58	-			1-มิ.ย.-58
24	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-มี.ค.-58	-			26-ก.ค.-58
25	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-มี.ค.-58	-			5-มิ.ย.-58
26	<i>Pygoluciola</i> sp.1	19-มี.ค.-58	-			26-ก.ค.-58

ลักษณะทางสัณฐานของตัวอ่อนและดักแด้หิ่งห้อย

ตัวอ่อนหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ที่นำมาเลี้ยง มีลำตัวสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำ ส่วนหัวซ่อนอยู่ภายใต้อกปล้องแรก แผ่นแข็งด้านบนของอกปล้องแรก (pronotum) มีขนาดใหญ่ปกคลุมส่วนหัวมิด ปลายขอบปล้องด้านหลังทั้งสองข้างมีลักษณะเป็นหนามแหลมยื่นออกมาเล็กน้อย (ภาพที่ 5) ซึ่งลักษณะการมีหนามดังกล่าวนี้พบในทุกปล้องอกและปล้องท้อง ตรงกลางของปล้องอกและลำตัวมีลักษณะเป็นสันนูน ดักแด้เป็นแบบ exarate pupa (ภาพที่ 6.) ที่มีส่วนขายื่นออกมาจากลำตัวและสามารถมองเห็นได้ จะเห็นตุ่มปีก (wing pad) และส่วนของ mandible ที่ยื่นออกมาจากส่วนหัวชัดเจน



ภาพที่ 5. ตัวอ่อนของหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 ที่เลี้ยงในห้องเลี้ยง A. ภาพด้านหลังของตัวอ่อน, B. ภาพด้านข้างของตัวอ่อน



ภาพที่ 6. ดักแด้ของหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 ที่เลี้ยงในห้องเลี้ยง A. ภาพด้านท้องของตัวอ่อน, B. ภาพด้านหลังของตัวอ่อน

ในการศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานของตัวอ่อนหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 ที่เลี้ยงในห้องเลี้ยงได้ทำการวัดขนาดของอกปล้องแรก (pronotum) ทำการวัดความกว้างและความยาวของปล้องอก (ภาพที่ 7.) โดยทำการวัดจากหิ่งห้อยที่ยังมีชีวิตอยู่ พบว่าความกว้างของ pronotum อยู่ระหว่าง 2.3 – 2.68 มิลลิเมตร และความยาวของ pronotum อยู่ระหว่าง 2.2 – 2.95 มิลลิเมตร โดยตัวอ่อนหมายเลข 19 และ 22 มีขนาดเล็กที่สุด (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 7. วิธีการวัดขนาดความกว้าง ความยาวของ pronotum ของตัวอ่อนหิ่งห้อย *Pygoluciola* sp.1

ตารางที่ 4 ความกว้างและความยาวของ pronotum ของตัวหนอนหึ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ที่เลี้ยงในห้องเลี้ยง

ตัวอย่างที่	ความกว้างของ pronotum (มิลลิเมตร)	ความยาวของ pronotum (มิลลิเมตร)
1	2.587	2.659
2	2.681	2.951
4	2.623	2.659
6	2.682	2.735
11	2.663	2.783
16	2.406	2.557
17	2.410	2.741
19	2.335	2.196
21	2.588	2.799
22	2.306	2.660

เมื่อนำตัวอย่างหึ่งห้อยที่เลี้ยงในห้องเลี้ยง (หมายเลข 13) ที่สามารถเจริญเติบโตจนกระทั่งเข้าดักแด้ (ภาพที่ 6.) และลอกคราบออกมาเป็นตัวเต็มวัยเพศเมีย (ภาพที่ 8.) ไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานภายนอกและจำแนกชนิดโดยใช้คู่มืออนุกรมวิธานของหึ่งห้อยและเอกสารอ้างอิงทางวิชาการ โดยผลการวินิจฉัยพบว่าเป็นหึ่งห้อยดังกล่าวอยู่ในสกุล *Pygoluciola* แต่ยังไม่สามารถระบุชื่อได้ จึงกำหนดให้เป็น *Pygoluciola* sp. 1 ซึ่งมีลักษณะภายนอกดังภาพที่ 8.



ภาพที่ 8. ตัวเต็มวัยเพศเมียของหึ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 ที่เลี้ยงได้จากห้องเลี้ยง



จากการเปรียบเทียบตัวอย่างหิ่งห้อยตัวเต็มวัยที่เก็บจากพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์เมื่อวันที่ 27 มีนาคม 2558 และตัวอย่างที่เลี้ยงในห้องเลี้ยงจนเจริญเป็นตัวเต็มวัย (ตัวอย่างหมายเลข 13) โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานและนำมาวินิจฉัยชื่อโดยใช้คู่มือและเอกสารทางวิชาการ คือ

Revisional studies of Australia and Indomalayan *Luciolini* (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae). (Ballantyne, 1968).

A new firefly, *Luciola (Pygoluciola) kinabalua*, new species (Coleoptera: Lampyridae), from Malaysia, with observations on a possible copulation clamp. (Ballantyne and Lambkin, 2001).

A phylogenetic reassessment of the rare S.E. Asian firefly genus *Pygoluciola* Wittmer (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae). (Ballantyne and Lambkin, 2006).

Pygoluciola satoi, a new species of the rare S. E. Asian firefly genus *Pygoluciola* Wittmer (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) from the Philippines. (Ballantyne, 2008).

Taxonomy and behaviour of Lucioline fireflies (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) with redefinition and new species of *Pygoluciola* Wittmer from mainland China and review of *Luciola* LaPorte. (Fu and Ballantyne, 2008).

Systematics of Indo-Pacific fireflies with a redefinition *Atyphella* Olliff, Madagascan *Photuroluciola* Pic, and description of seven new genera from the Luciolinae (Coleoptera: Lampyridae). (Ballantyne and Lambkin, 2009).

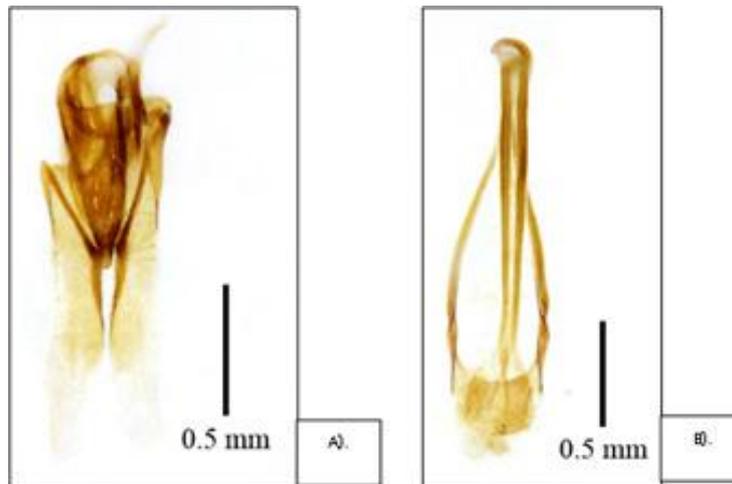
โดยเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานพบว่าหิ่งห้อยชนิดนี้เป็นชนิดเดียวกับที่ผู้วิจัยได้เคยรายงานไว้ในผลงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์ไว้ในปี 2012 (Wandee Wattanachaiyingcharoen and Sorasak Nak-eiam. (2012). First record of the firefly genus *Pygoluciola* Wittmer (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) in Thailand. *Lampyrid*, 2, 24-30.) ซึ่งเป็นการรายงานการพบหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย โดยหิ่งห้อยสกุลนี้พบครั้งแรกและตั้งชื่อชนิดจากหิ่งห้อยที่พบในเกาะบอร์เนียวและมีการค้นพบเพิ่มเติมจากหมู่เกาะใกล้เคียง จนกระทั่งมีการพบชนิดใหม่คือ *P. qingyu* จากประเทศจีน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการอธิบายลักษณะของหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 ไว้บางส่วน (สรศักดิ์ นาคเอี่ยม, 2558) ดังนี้

สกุล *Pygoluciola* Wittmer 1939

(Type species. *Pygoluciola stylifer* Wittmer (1939))

การวินิจฉัยเบื้องต้น : หิ้งห้อยในสกุลนี้จะมี sternite ของ aedeagal sheath ที่มีลักษณะแคบยาวตลอดความยาวและขยายออกในช่วงปลาย ส่วนของ aedeagus จะมี lateral lobe (LL) ที่แบนยาวและมีความยาวเกินกว่า median lobe (ML) ทั้ง aedeagal sheath และ aedeagus เป็นแบบสมมาตร (ภาพที่ 9)

***Pygoluciola* sp.1:** หิ้งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 มีลักษณะเช่นเดียวกับ *Pygoluciola qingyu* โดยไม่มีส่วนของ median posterior margins ของปล้องท้อง ventrite ที่ 7 และ 8 ซึ่งต่างจากหิ้งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ชนิดอื่นๆ แต่หิ้งห้อย *Pygoluciola* sp.1 มีความแตกต่างจาก *P. qingyu* โดย LL ของ aedeagus มีขนาดสั้นมากและมี LL ที่มีลักษณะแบนและยาว ส่วนของอวัยวะเปล่งแสง (light organ) จะคลุม anteromedian ของ ventrite ที่ 7 แต่ไม่ยาวไปจนถึงขอบด้านข้างและด้านหลัง



ภาพที่ 9. ลักษณะของ aedeagus และ aedeagal sheath ของหิ้งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 A). aedeagus (ventral view) B). aedeagal sheath (ventral view) (ภาพโดย สรศักดิ์ นาคเอี่ยม)

เพศผู้ของหิ้งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1: ตัวเต็มวัยมีความยาวของลำตัว 8.20 – 9.60 มิลลิเมตร ความกว้างของลำตัว 3.80 – 4.00 มิลลิเมตร (ภาพที่ 10)

ส่วนหัว : ส่วนหัวทั้งหมดมีสีดำ ส่วนของ vertex จะลดต่ำลง ตามีขนาดใหญ่ ส่วนของหัวถูกปกคลุมด้วยแผ่นอกปล้องแรก (pronotum) และสามารถหดส่วนหัวเข้าไปในช่องของอกปล้องแรกได้เล็กน้อย หนวดเป็นแบบ filiform ประกอบด้วย 11 ปล้อง ส่วนปากพัฒนาไปอย่างดีและมีเส้น clypeolabral suture เป็นแผ่นขนาดใหญ่ ริมนิปลากกลางมีรูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้า mandible มีขนาดยาวและปลายแหลม ส่วนของ maxillary palp ประกอบด้วย 4 ปล้องและมีขนาดใหญ่กว่า labial palp ที่มีเพียง 3 ปล้อง



ภาพที่ 10. ลักษณะของหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 เพศผู้ A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (ภาพโดย สรศักดิ์ นาคเอี่ยม)

ส่วนอก : ออกปล้องแรก (pronotum) มีความกว้าง 2.80 มิลลิเมตรและความยาว 1.50 มิลลิเมตร มีสีเหลืองและอาจจะมีสีชมพูซึ่งเกิดจากสีของ fat body ที่อยู่ด้านใต้และสามารถมองเห็นผ่าน cuticle ของ pronotum และ pronotum มีลักษณะเป็นแผ่นขวางโค้งออกไปทางด้านข้าง ด้านบนของ pronotum มีลักษณะเป็นจุด และมีร่องตรงกลางตามความยาว ขอบด้านล่างของ pronotum มีลักษณะเป็นรอยเว้า

ปีกคู่หน้า (elytra) : ปีกยาวคลุมส่วนท้อง มีความกว้าง 2.00 มิลลิเมตร และความยาว 8.20 มิลลิเมตร มีสีเหลืองอมน้ำตาลอ่อนและมีเข็มเกือบดำที่ปลายปีกและเป็นแบบ semi-transparent มีขอบปีกทุกด้านสีอ่อน เนื้อปีกมีจุดกระจายอยู่ทั่วไป

ขา : ขาเป็นแบบขาเดิน ส่วนของ coxa, tibia และ tarsi ของขาคู่สุดท้ายจะมีสีน้ำตาลเข้ม ในขณะที่ trochanter, femur ทั้งหมดและ coxa ของขาคู่แรกและคู่ที่ 2 มีเหลืองปนน้ำตาล

ส่วนท้อง (abdomen) : ส่วนท้องทั้งด้าน ventrite และ tergite มีสีน้ำตาลเข้มยกเว้นบริเวณที่เป็น light organ สีครีมที่ตั้งอยู่ที่ปล้อง ventrite ที่ 6 และ 7 โดย light organs จะคลุมปล้อง ventrite ที่ 6 ทั้งหมด แต่ ventrite ที่ 7 จะถูกคลุมเพียงบางส่วนจากตรงกลางถึงขอบด้านหน้าเท่านั้น ส่วนของ tergite ที่ 7 - 8 มีสีเหลือง อมน้ำตาลและเป็นแบบ semi-transparent tergite ที่ 8 เป็นแบบสมมาตรและมีขอบด้านท้ายค่อนข้างกลม

Aedeagal sheath: มีความกว้าง 0.60 มิลลิเมตรและความยาว 2.00 มิลลิเมตร เป็นแบบสมมาตรที่ประกอบด้วย sheath sternite เป็นแผ่นแคบและยาวแต่ตรงปลายจะบานออกเป็น lobe แบนและโค้งขึ้น

เล็กน้อย ส่วน tegite ของ sheath sternite จะกว้างกว่า sternite ด้านหน้าของ sheath tergite มีลักษณะกลมและกว้างแต่ส่วนปลายตัด ขอบด้านข้างของ sheath tergite จะขนานไปกับด้านท้ายแต่บานออกทางด้านหน้า

Aedeagus: มีความกว้างประมาณ 0.56 มิลลิเมตร และยาว 1.63 มิลลิเมตร ส่วนของ basal piece aedeagus (BP) เป็นแบบไม่สมมาตรและมีลักษณะแคบกว่าความกว้างของ aedeagus และสั้นกว่าความยาวของ median lobe โดยปลายของ median lobe จะบานออกเป็นรูปกลม ขอบด้านหน้าของ median lobe จะเป็นปลายตัดและความยาวของ median lobe จะสั้นกว่าความยาวของ lateral lobe ถ้ามองจากด้านข้าง ปลายของ median lobe จะโค้งลง lateral lobe จะมีขนาดเล็ก บางและขยายออกด้านข้าง ส่วนปลายจะกลมและบิดตรงปลายเล็กน้อย

เพศเมียของหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1: ตัวเต็มวัยมีความยาวของลำตัว 9.50 มิลลิเมตร ความกว้างของลำตัว 3.20 มิลลิเมตร มีปีกยาวคลุมลำตัวและสามารถบินได้ เพศเมียมีสีลำตัวและสีของขาเช่นเดียวกับเพศผู้ แต่ light organ จะมีอยู่เฉพาะที่ปล้อง ventrite ที่ 6 เท่านั้นและคลุมหมดทั้งปล้อง ventrite ที่ 7 – 8 มีสีเหลือง ส่วนของขอบด้านท้ายของ ventrite ที่ 7 มีรอยเว้ากว้าง ด้านข้างของ ventrite ที่ 8 จะโค้งกลม ส่วนหัวและตาของเพศเมียจะมีขนาดเล็กกว่าเพศผู้ ในขณะที่เกาะพักเพศเมียจะสามารถหดส่วนหัวเข้าไปภายในช่องว่างของ pronotum ได้ทั้งหมด (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11. ลักษณะของหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 เพศเมีย A. ด้านหลัง B. ด้านท้อง (ภาพโดย สรศักดิ์ นาคเอี่ยม)

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผล

หิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์จะพบอาศัยอยู่เฉพาะในพื้นที่ที่มีความชื้นเพียงพอและอาจจะต้องมีแหล่งน้ำไหลขนาดเล็กเพื่อให้มีความชื้นสม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามจากการสำรวจอย่างต่อเนื่องพบว่าพื้นที่ดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม โดยการปรับพื้นที่เพื่อสร้างเป็นเส้นทางในการเดินทางสำหรับนักท่องเที่ยว มีการตัดต้นไม้บางส่วนออก ทำให้สภาพพื้นที่เปลี่ยนแปลงไป ประกอบกับในช่วงปีที่ทำการวิจัยเกิดสภาพแห้งแล้งทั่วทั้งพื้นที่ ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* นี้ จากการสังเกตพบตัวเต็มวัยบางส่วนเคลื่อนย้ายไปยังพื้นที่ที่มีสภาพเป็นป่ารกทึบมากขึ้นและมีความลาดชันสูง ผู้วิจัยจึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้

เมื่อหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 มาเลี้ยงในห้องเลี้ยงอาจจะทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหิ่งห้อย จึงพบว่าหิ่งห้อยบางส่วนลดพฤติกรรมต่างๆ ลงและตายในที่สุด ถึงแม้ว่าจะไม่ได้ข้อมูลเพียงพอในการบันทึกการเจริญเติบโตของหิ่งห้อยชนิดนี้ แต่ทำให้ทราบว่าหิ่งห้อยชนิดนี้มีการไว (sensitive) ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม โดยสังเกตจากการลดจำนวนลงเมื่อทำการสำรวจในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ เนื่องจากการปรับสภาพพื้นที่รวมทั้งสภาพอากาศที่แห้งแล้ง ความชื้นในแหล่งที่อยู่อาศัยลดน้อยลง และการไม่สามารถอยู่รอดได้ในสภาพการตัดแปลงการเลี้ยงในห้องเลี้ยง ซึ่งส่วนหนึ่งอาจจะมาจากการที่หิ่งห้อยเป็นแมลงผู้ล่า (predator) จึงอาจจะต้องหาพื้นที่สำหรับการเคลื่อนย้ายเพื่อหาอาหาร ซึ่งสภาพการเลี้ยงที่ต้องอยู่ในกล่องพลาสติกอาจจะเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่ง ข้อจำกัดดังกล่าวอาจเกิดขึ้นกับแมลงที่มีความสามารถในการปรับตัวได้ยากเช่นหิ่งห้อย ทั้งนี้ ทั่วโลกมีรายงานถึงการลดลงของประชากรของแมลงในวงศ์นี้ เช่น ในประเทศสหราชอาณาจักร Tyler (2002; อ้างอิงใน Picchi *et al.*, 2013) รายงานการลดลงของประชากรหิ่งห้อย *Lampyrus noctiluca* ตั้งแต่ช่วงปี 1900 เป็นต้นมา ปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อประชากรของหิ่งห้อยคือ การทำการเกษตรที่เพิ่มขึ้น และในการทำการเกษตรสมัยใหม่จะมีการใช้สารเคมีเป็นอย่างมาก การปรับเปลี่ยนพื้นที่แหล่งน้ำ เช่น ห้วย หนอง เพื่อเพิ่มพื้นที่ปลูก (Gardiner, 2009; Shinsaku *et al.*, 2012) รวมทั้งการทำการเกษตรกรรม เช่น การกำจัดวัชพืชทั้งหมดในพื้นที่ปลูก ส่งผลต่อการลดลงของพืชอาศัย เนื่องจากแมลงในกลุ่มนี้มีเฉพาะเจาะจงต่อแหล่งอาศัยรวมทั้งพืชอาศัย เช่น หิ่งห้อยชนิด *Pteroptyx tener* Olivier ในระยะไข่และตัวอ่อนจะพบเป็นจำนวนมากบนต้น *Nypa fruticans* และ *Rhizophora* spp. ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ตามริมฝั่งแม่น้ำ Sepetang บริเวณป่าชายเลนของประเทศมาเลเซีย แต่ในระยะที่เป็นตัวเต็มวัยสามารถเคลื่อนย้ายได้จึงพบบนต้นพืชได้มากขึ้นดีกว่า ดังนั้นการลดลงของพืชอาศัยจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อประชากรของหิ่งห้อย (Jusoh *et al.*, 2010) นอกจากนี้การเข้าใช้พื้นที่โดยมนุษย์เป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของหิ่งห้อย การใช้แสงไฟที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการขยายตัวของพื้นที่อาศัยหรือชุมชนเมืองที่ขยายพื้นที่เข้าไปในแหล่งอาศัยของหิ่งห้อยส่งผลกระทบต่อความสามารถในการขยายพันธุ์ของหิ่งห้อย (Thancharoen *et al.*, 2008; Tyler, 2002 อ้างอิงใน Picchi *et al.*, 2013) จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ประชากรของหิ่งห้อยลดน้อยลง

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตในระยะตัวอ่อนของหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 ที่เก็บตัวอย่างได้จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์จะอยู่ในช่วงที่อุณหภูมิค่อนข้างต่ำและมีความชื้นสัมพัทธ์ค่อนข้างสูง สภาพดังกล่าวจะพบได้เฉพาะในพื้นที่สูง (highland) ของอุทยานฯ ดังนั้นหิ่งห้อยชนิดนี้อาจจะเป็นหิ่งห้อยที่พบเฉพาะถิ่น (endemic species) ซึ่งเคยมีการสำรวจเบื้องต้นพบว่าในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีหิ่งห้อยชนิดนี้อยู่ในปริมาณหนึ่ง แต่เนื่องจากสภาพแวดล้อมในช่วงปีที่ทำการสำรวจมีความแห้งแล้งเป็นอย่างมากจึงพบจำนวนตัวอย่างน้อยมาก ซึ่งความชื้นจะมีผลต่อการดำรงชีวิตของหิ่งห้อยหลายๆ ชนิดรวมทั้งหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 ที่จากการสำรวจจะพบเฉพาะในช่วงที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในพื้นที่และสภาพพื้นดินมีน้ำขัง แต่ไม่พบตัวอ่อนเลยในช่วงที่สภาพแวดล้อมแห้งแล้ง และในขณะเดียวกันหิ่งห้อยที่เลี้ยงในห้องเลี้ยงยังคงอยู่ในระยะตัวอ่อนโดยไม่มีการลอกคราบหรือการเปลี่ยนแปลงใดๆ โดยมีอายุอย่างน้อย 9 เดือน ส่วนใหญ่จะพักนิ่ง ไม่มีการเคลื่อนไหว และตอบสนองถ้ามีการรบกวน ซึ่งจากข้อมูลของหิ่งห้อยชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้พบว่าหิ่งห้อยเป็นแมลงที่มีระยะตัวอ่อนยาวนาน หิ่งห้อยบางชนิดเช่น *Luciola parvula* ซึ่งเป็นหิ่งห้อยบกใช้เวลาในช่วงตัวอ่อนนานถึง 1-3 ปี แต่ตัวเต็มวัยมีอายุเพียง 7-10 วันเมื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ((Ohba 2004b และ Yasuoka 2010 อ้างอิงใน Kakehashi *et al.*, 2014) จึงเป็นไปได้ที่หิ่งห้อยชนิดนี้อ่อนไหวต่อการปรับเปลี่ยนสภาพจากสภาพธรรมชาติมาเป็นสภาพการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จึงมีการยืดอายุการเป็นตัวอ่อนยาวนานขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Kakehashi และคณะ (2014) ที่ศึกษาพฤติกรรมในการออกล่าอาหารของหิ่งห้อยชนิด *Luciola parvula* ในประเทศญี่ปุ่นพบว่าหิ่งห้อยชนิดนี้ในระยะตัวอ่อนจะมีความทนทานต่อการอดอาหารมาก โดยจะไม่ออกหาอาหารในช่วงเวลาที่สภาพแวดล้อมมีความแห้งแล้ง จึงจะยังคงสภาพในระยะที่เป็นตัวอ่อนในวัยต่างๆ อย่างยาวนาน

อย่างไรก็ตามจากการที่มีหิ่งห้อยที่เก็บมาเลี้ยงจำนวน 1 ตัวที่สามารถเจริญเติบโตจนเป็นตัวเต็มวัยได้ และเมื่อนำมาวินิจฉัยแล้วพบว่า เป็นหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* ซึ่งผู้วิจัยได้เคยรายงานไว้ในปี 2012 แล้วว่าเป็นการบันทึกการพบหิ่งห้อยสกุลนี้ในประเทศไทยเป็นครั้งแรก (Wandee Wattanachaiyingcharoen and Sorasak Nak-eiam, 2012) และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะกับหิ่งห้อยชนิดอื่นๆ ที่มีการอธิบายลักษณะไว้แล้วพบว่ามีความแตกต่างจากชนิดอื่นทุกชนิด แต่ยังไม่สามารถให้ชื่อวิทยาศาสตร์ จึงให้ชื่อว่า *Pygoluciola* sp.1 หิ่งห้อยในสกุลนี้เดิมมีรายงานพบเฉพาะในหมู่เกาะในทะเลจีนใต้ ได้แก่ เกาะบอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย ซึ่งเป็นหิ่งห้อยตัวแรกที่ Wittmer ในปี ค.ศ.1939 ได้ตั้งสกุล *Pygoluciola* นี้ให้กับหิ่งห้อย *P. stylifer* เพียงชนิดเดียวที่เก็บตัวอย่างได้จากเกาะบอร์เนียว เนื่องจากหิ่งห้อยสกุลนี้มีลักษณะของปลายปล้องท้องที่ยื่นยาวออกมาทั้งด้านบนและด้านล่าง ต่อมา มีการพบหิ่งห้อยสกุลนี้บนเกาะมินดาเนา ประเทศฟิลิปปินส์ (Ballantyne, 1968:2008; Ballantyne and Lambkin, 2001) และต่อมา มีการรายงานการพบ *P. qingyu* (Fu and Ballantyne, 2008) ในประเทศจีน ในปัจจุบันหิ่งห้อยในสกุลนี้ที่ถูกระบุชื่อวิทยาศาสตร์แล้วมีทั้งสิ้น 7 ชนิด ประกอบด้วย *P. guigliae* (Ballantyne, 1968), *P. hamulata* (Olivier, 1885), *P. kinabalua* (Ballantyne and Lambkin, 2001), *P. qingyu* (Fu and Ballantyne, 2008), *P. satoi* (Ballantyne, 2008), *P. stylifer* Wittmer, 1939 และ *P. wittmeri* (Ballantyne, 1968) แต่ยังคงจำเป็นต้องศึกษาชีววิทยาและข้อมูลทางด้านอื่นเพิ่มเติมเพื่อเป็นหลักฐานในการให้ชื่อวิทยาศาสตร์ของหิ่งห้อยชนิดใหม่นี้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างหิ่งห้อยในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ตลอดช่วง 11 เดือนที่ผ่านมาพบหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 พบเฉพาะในพื้นที่บริเวณช่องเย็นของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่ที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 1,300 เมตร สภาพของดินอาศัยเป็นป่าดิบเขาต่ำและพืชพรรณมีความแตกต่างจากพื้นที่อื่น และจากข้อมูลที่คณะผู้วิจัยได้ทำการวิจัยด้านความหลากหลายของหิ่งห้อยในพื้นที่ภาคเหนือของไทยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้อาจสรุปได้ว่าหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 เป็นหิ่งห้อยเฉพาะถิ่น (endemic species) เนื่องจากไม่พบหิ่งห้อยที่มีลักษณะเช่นเดียวกันนี้ในพื้นที่อื่น นอกจากนี้จากเดิมที่ผู้วิจัยเคยรายงานการค้นพบหิ่งห้อยในสกุล *Pygoluciola* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย (Wandee Wattanachaiyingcharoen and Sorasak Nak-eiam, 2012) เมื่อทำการวินิจฉัยชนิดของหิ่งห้อยที่เก็บตัวอย่างและจากการเลี้ยงในห้องเลี้ยงพบว่าชนิด *Pygoluciola* sp.1 ซึ่งมีความแตกต่างจากหิ่งห้อยในสกุลเดียวกันนี้ที่พบในพื้นที่อื่นของภาคเหนือของประเทศไทย (สรศักดิ์ นาคเอี่ยม, 2558) และหิ่งห้อยในสกุลเดียวกันที่มีรายงานจากส่วนอื่นๆ ของโลก (Olivier, 1885; Ballantyne, 1968; Ballantyne and Lambkin, 2001; Ballantyne, 2008; Fu and Ballantyne, 2008) ดังนั้นหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 จึงจัดเป็นหิ่งห้อยชนิดใหม่ที่ผู้วิจัยจะมีการให้ชื่อและรายงานต่อไป

อย่างไรก็ตาม การเข้ามาใช้พื้นที่และการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ประชากรของหิ่งห้อยลดลง Picchi และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนเป็นชุมชนเมืองในพื้นที่ของเมือง Turin ต่อความชุกชุมของหิ่งห้อยชนิด *Luciola italica* L. โดยการศึกษานี้อาศัยความร่วมมือจากประชาชนในท้องถิ่นในการร่วมสำรวจ พบว่า จำนวนพื้นที่สีเขียวของชุมชนส่งผลต่อความชุกชุมของประชากรหิ่งห้อย โดยพื้นที่เหล่านี้จะต้องประกอบด้วยต้นไม้และป่าอย่างเพียงพอ โดยพื้นที่เหล่านี้ควรจะเป็นพื้นที่ที่เชื่อมต่อกันและปัจจัยที่สำคัญคือการจำกัดการใช้แสงไฟในพื้นที่ โดยได้แนะนำว่าแสงไฟที่ใช้ในสวนพื้นที่สีเขียวไม่ควรมีความเข้มแสงเกิน 0.2 ลักซ์ ซึ่งจากการสำรวจในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์อย่างต่อเนื่อง ผู้วิจัยพบว่ามี ความเปลี่ยนแปลงในพื้นที่ที่เคยเป็นแหล่งอาศัยของหิ่งห้อยชนิด *Pygoluciola* sp.1 โดยพื้นที่บางส่วนถูกปรับสภาพไปเป็นถนนและพื้นที่อำนวยความสะดวกแก่นักท่องเที่ยว และพบว่ามียุงที่เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง การเข้ามาของนักท่องเที่ยวจะมีการพักค้าง การกางเต็นท์รวมทั้งมีกิจกรรมต่างๆ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อวงจรชีวิตของหิ่งห้อยทุกชนิดรวมทั้งสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อย่างแน่นอนนอกเหนือจากปัจจัยทางด้านความแห้งแล้งของสภาพภูมิอากาศในช่วงที่มีการสำรวจ ดังนั้น ควรมีการพิจารณาให้มีการจัดการพื้นที่ที่เหมาะสมเพื่อให้พื้นที่สามารถเป็นที่รองรับการท่องเที่ยวได้อย่างถูกต้องและไม่รบกวนสิ่งแวดล้อม แต่ที่สำคัญที่สุดคือการทำพื้นที่เหล่านี้ยังจะต้องเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของหิ่งห้อยและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ต่อไป ดังนั้นควรมีการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในพื้นที่อย่างต่อเนื่องเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการเฝ้าระวังและการหาแนวทางการอนุรักษ์ที่เหมาะสมต่อไป



บทที่ 7

บรรณานุกรม

- คณะกรรมการโครงการหิ่งห้อยในพระราชดำริ. (2544). **หิ่งห้อยในประเทศไทย**. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์.
- วิรัตน์ สมมิตร. (2547). **นิเวศประชากรของหิ่งห้อย *Pyrocoelia praetexta* Olivier ในสวนพฤกษศาสตร์ดอกท้อ**. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์). บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 59 หน้า.
- Ballantyne, L. A. (1968) Revisional Studies of Australian and Indomalayan *Luciolini* (Coleoptera, Lampyridae, Luciolinae). **University of Queensland Papers**. Department of Entomology, University of Queensland Press II no 6, 103–139.
- Ballantyne, L. A (2008) *Pygoluciola satoi*, a new species of the rare S. E. Asian firefly genus *Pygoluciola* Wittmer (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) from the Philippines. **Raffles Bulletin of Zoology**. 56(1), 1–9.
- Ballantyne, L.A. and Lambkin, C. (2001). A new firefly, *Luciola* (*Pygoluciola*) *kinabalua*, new species (Coleoptera: Lampyridae), from Malaysia, with observations on a possible copulation clamp. **The Raffles Bulletin of Zoology**. 49(2): 363-377.
- Ballantyne, L.A. and Lambkin, C. (2006). A phylogenetic reassessment of the rare S.E. Asian firefly genus *Pygoluciola* Wittmer (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae). **The Raffles Bulletin of Zoology**. 54(1): 21-48.
- Ballantyne, L. A. and Lambkin, C. (2009). Systematics of Indo-Pacific fireflies with a redefinition of Australasian *Atyphella* Olliff, Madagascan *PhoturoLuciola* Pic, and description of seven new genera from the Luciolinae (Coleoptera: Lampyridae). **Zootaxa**. 1-188.
- Ballantyne, L.A. and McLean, M.R. (1970). Revisional studies on the firefly genus *Pteroptyx* Olivier (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae: Luciolini). **The Transactions of American Entomological Society**. 96: 223-305.
- Booth, R.G., Cox, M.L. and Madge, R.B. (1990). **IIE Guidea to Insect of Importance to Man. 3 Coleoptera**. Wallingford, Oxon: CAB International. 384 pp.



- Bouchard, P., Bousquet, Y., Davies, A.E., Alonso-Zarazaga, M.A., Lawrence, J.F., Lyal, C.H.C, Newton, A.F., Reid, C.A.M., Schmitt, M., Ślipiński, S.A. and Smith, A.B.T. (2011). Family-group names in Coleoptera (Insecta). **ZooKeys**. 88: 1–972.
- Brancucci, M. and Geiser, M. (2009). A revision of the genus *Lamellipalpus* Maulik, 1921 (Coleoptera, Lampyridae). **Zootaxa**. 2080: 1–20.
- David, B.V. and Ananthakrishnan, T.N. (2004). **General and Applied Entomology**. Tata McGraw-Hill publishing company limited. New Delhi.
- Fu, X. H. and Ballantyne, L. A. (2008). Taxonomy and behaviour of Lucioline fireflies (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) with redefinition and new species of *Pygoluciola* Wittmer from mainland China and review of *Luciola* LaPorte. **Zootaxa**. 1733, 1-44.
- Gardiner T. (2009). **Glowing, glowing, gone? The plight of the glow-worm in Essex**. British Naturalists' Association.
- Hutacharern, C., Tubtim, N. and Dokmai, C. (2007). **Checklists of Insects and Mites in Thailand**. Department of National Parks.
- Kohei Kakehashi, Ryoichi B. Kuranishi and Naoto Kamata. (2014). Estimation of dispersal ability responding to environmental conditions: larval dispersal of the flightless firefly, *Luciola parvula* (Coleoptera: Lampyridae). **Ecol Res**. 29: 779–787, DOI 10.1007/s11284-014-1156-z.
- Krebs, C.J. (1999). **Ecological Methodology**. Benjamin/Cummings. Menlo Park, CA.
- Lloyd, J. E., Wing, S. R. and Hongtrakul, T. (1989). Ecology, flashes and behavior of congregating Thai fireflies. **Biotropica**. 21, 373-376.
- Malayka Samantha Picchi, Lerina Avolio, Laura Azzani, Orietta Brombin and Giuseppe Camerini (2013). Fireflies and land use in an urban landscape: the case of *Luciola italica* L. (Coleoptera: Lampyridae) in the city of Turin. **J Insect Conserv**. 17:797–805, DOI 10.1007/s10841-013-9562-z
- McDermott, F.A. (1966). **Lampyridae Pars. 9. Coleopterum Catalogus (Junk- Schenkling)** (Ed. Sec): 1-149.



- Napompeth, B. (Ed.). (2009). **Diversity and conservation of fireflies**. Proceedings of the international symposium on diversity and conservation of fireflies. Chiang Mai: Queen Sirikit botanic garden.
- Olivier, E. (1885). Catalogue des Lampyrides faisant partie des collections du Musée Civique de Gênes. **Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova** (2a) 2, 333–374.
- Shinsaku K, Nakamura A, Nakamura K. (2012). Demography of the Heike firefly *Luciola lateralis* (Coleoptera: Lampyridae) a representative species of Japan's traditional agricultural landscape. **J Insect Conserv.** 16:819–827.
- Sorasak Nakeiam (2015). **Taxonomy and species distribution of fireflies (Coleoptera; Lampyridae) in the North of Thailand**. Ph.D. thesis in Biological Sciences, Graduate School of Naresuan University, 270 pp.
- Stanger-Hall, K.F., Lloyd, J.E. and Hillis, D.M. (2007). Phylogeny of North American fireflies (Coleoptera: Lampyridae): Implication for the evolution of light signals. **Molecular Phylogenetics and Evolution.** 45 (2007): 33-49.
- Thancharoen, A. (2001). **Study on Diversity of Firefly Populations in Highland and Lowland Habitats**. M.S. thesis in Environmental Biology. Faculty of Graduate Studies. Mahidol University, 108 pp.
- Thancharoen A., Branham M.A., Lloyd J.E. (2008). Building twilight sensors to study the effects of light pollution on fireflies. **Am Biol Teach.** 2: 6–12.
- Thancharoen, A, Ballantyne, L. A., Branham, M. A & Jeng, M-L (2007) Description of *Luciola aquatilis* sp. nov., a new aquatic firefly (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) from Thailand. **Zootaxa.** 1611, 55–62.
- Theraphat, T. (1969). **A study of the life history, the development, and the photogenic organs in the firefly, *Luciola circumdata* Mots.** Master thesis, M.S., Chulalongkorn University, Bangkok. (in Thai with English abstract).
- Wan Faridah Akmal Wan Jusoh, Nor Rasidah Hashim, Zelina Z. Ibrahim. (2010). Firefly distribution and abundance on mangrove vegetation assemblages in Sepetang estuary, Peninsular Malaysia. **Wetlands Ecol Manage.** 18: 367–373, DOI 10.1007/s11273-009-9172-4.



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

Wandee Wattanachaiyingcharoen and Sorasak Nak-eiam. (2012). First record of the firefly genus *Pygoluciola* Wittmer (Coleoptera: Lampyridae: Luciolinae) in Thailand. **Lampyrid.** 2, 24-30.



คณะผู้วิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
และ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต. ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055 96 3331 มือถือ 081 887 4354
E-mail: wandeew@nu.ac.th
2. นายวิญญู พันธุ์เมืองมา
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต. ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
3. นายสรศักดิ์ นาคเอี่ยม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต. ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
4. นายสุรน เวียงดาว
หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของ
อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Yeast Species Diversity in Soils Collected from the Mixed Deciduous and the
Dry Evergreen Forests in Mae Wong National Park

ผศ.ดร.ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์¹
รศ.ดร.รสริน ว่องวิไลรัตน์¹
นายสุธน เวียงดาว²

1 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีที่พิมพ์ 2558



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของ
อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Yeast Species Diversity in Soils Collected from the Mixed Deciduous and the
Dry Evergreen Forests in Mae Wong National Park

ผศ.ดร.ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์¹
รศ.ดร.รสริน ว่องวิไลรัตน์¹
นายสุธน เวียงดาว²

1 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีที่พิมพ์ 2558

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยมีจุดตั้งทางภูมิศาสตร์ที่เหมาะสมในระหว่างเส้นรุ้งที่ 5 องศา 40 ลิบดา ถึง 20 องศา 35 ลิบดาเหนือ และเส้นแวงที่ 93 องศา 30 ลิบดา ถึง 105 องศา 40 ลิบดาตะวันออก ทำให้สภาพภูมิอากาศของประเทศไทยเกิดขึ้นจากการสร้างสภาวะสมดุลของพลังงานในเขตร้อนกับเขตหนาวในแถบขั้วโลกเหนือ กอปรกับสภาพภูมิประเทศประกอบด้วยเทือกเขาสูงสลับซับซ้อนในภาคเหนือ เป็นที่ราบในตอนกลางของประเทศ และมีแนวสันเขาต่อเนื่องจากซีกตะวันตกลงไปจนสุดภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นที่ราบสูง และลาดลงสู่แม่น้ำโขง ปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดความแปรผันขึ้นในแต่ละพื้นที่ทำให้เกิดสภาพภูมิอากาศเฉพาะถิ่น (micro-climate) ซึ่งเมื่อผนวกกับสภาพของดินที่เกิดจากวัตถุดิบกำเนิด (parent materials) ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของชนิดป่าไม้ในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย

ระบบนิเวศป่าไม้ (Forest Ecosystem) ของประเทศไทยมีความซับซ้อนทางด้านกายภาพและชีวภาพสูง เป็นผลจากความผันแปรของปัจจัยแวดล้อมต่างๆ เช่น ปริมาณน้ำฝนที่เกิดจากลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ลมจากร่องความกดอากาศ และลมใต้ฝุ่น ความชื้นในบรรยากาศ อุณหภูมิ ฤดูกาล สภาพทางธรณีวิทยา และสภาพของไฟป่า ด้วยปัจจัยต่างๆเหล่านี้ทำให้สิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศป่าไม้ของประเทศไทยถูกคาดหวังว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทั้งในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ความหลากหลายของชนิดหรือสปีชีส์ (species diversity) และความหลากหลายของระบบนิเวศ (ecological diversity) จากข้อมูลพื้นฐานของการศึกษาในด้านต่างๆที่เกี่ยวข้องทำให้นักวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพประมาณการว่า จากจำนวนสิ่งมีชีวิตทั้งหมดบนโลกที่มีประมาณ 5 ล้านชนิด จำนวนประมาณ 350,000 ชนิด พบอยู่ในประเทศไทย ดังนั้นประเทศไทยจึงนับได้ว่าเป็นความร่ำรวยอย่างมากในด้านความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในส่วนของจุลินทรีย์คาดว่าจะมีในประเทศไทยถึง 200,000 ชนิด หรือมากกว่า อย่างไรก็ตามประมาณ 1 ใน 10 ส่วนของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่านั้นที่มีการศึกษาและรายงานผลการวิจัยทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ทำให้จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่คาดว่าจะมีในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศป่าไม้ของเมืองไทยที่มีความอุดมสมบูรณ์และถูกกันเป็นพื้นที่อนุรักษ์ ซึ่งกระจายอยู่ตามเขตอุทยานแห่งชาติ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างจริงจัง และไม่มีรายงานการวิจัยเผยแพร่ออกมา ซึ่งเมื่อพิจารณาจากการที่ประเทศไทยมีการสูญเสียพื้นที่ป่าไม้เป็นจำนวนมหาศาล ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบัน เนื่องมาจากสาเหตุสำคัญหลายประการด้วยกัน เช่น การเพิ่มของประชากรทำให้มีการบุกรุกป่าเพิ่มขึ้นเพื่อเป็นที่อยู่อาศัยและทำการเกษตรกรรม การให้สัมปทานป่าไม้ที่ขาดการควบคุมอย่างเพียงพอ การตัดถนนเข้าสู่พื้นที่ป่า การเกษตรเชิงอุตสาหกรรม ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีที่ใช้ในการทำลายป่า และการครอบครองที่ดินเพื่อเก็งกำไร เป็นต้น จากสาเหตุดังกล่าวเหล่านี้ ทำให้อัตราการคุกคามต่อความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย โดยเฉพาะความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์เพิ่มสูงมากขึ้นเรื่อยๆ หากขาดการศึกษาในด้านความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว และเป็นระบบตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง ผลกระทบที่ตามมาคือ ประเทศไทยจะสูญเสียชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายในด้านพันธุกรรมไปอย่างไม่สามารถที่จะประเมินค่าได้ ทั้งที่ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถนำมาศึกษาวิจัยเพื่อประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านการเกษตร อุตสาหกรรม การแพทย์ และสิ่งแวดล้อม อันจะนำมาซึ่งการยกระดับคุณภาพชีวิตของประชากรในประเทศไทยโดยรวมในที่สุด

ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในประเทศไทยได้รับความสนใจอย่างมาก อย่างไรก็ตามโครงการที่ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะความหลากหลายของยีสต์ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์มีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในช่วงที่ผ่านมาเน้นไปที่ culturable strains โดยใช้ culture-dependent technique ดังนั้นการประเมินความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในแหล่งอาศัยต่างๆจึงไม่ครอบคลุมชนิด (species) และจำนวนยีสต์ที่มีอยู่อย่างแท้จริง ประมาณการว่า จำนวนชนิดของ unculturable yeasts อาจสูงมากกว่า ๙๐ เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนชนิดของยีสต์ทั้งหมดที่พบในแหล่งอาศัยนั้นๆ ส่งผลให้ขาดข้อมูลสำคัญอีกด้านที่จำเป็นต่อการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพที่แท้จริงของยีสต์ในแต่ละแหล่งอาศัย ส่งผลให้ขาดการจัดการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมของยีสต์อย่างเป็นระบบเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในอนาคต รวมถึงขาดการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆเพื่อการแยก unculturable yeasts ที่มีอยู่จำนวนมาก และมีความหลากหลายของพันธุกรรมและชนิดสูงจากแหล่งอาศัยดังกล่าว จากปัญหาข้างต้นคณะผู้วิจัยเห็นว่าการนำเอาเทคนิคทันสมัย เช่น เทคนิค Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่า ร่วมกับ culture-dependent method จะทำให้ทราบถึงจำนวน และชนิดของยีสต์ทั้งหมดในแหล่งอาศัยดังกล่าว รวมทั้งสามารถแยก และรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่เป็น culturable yeast strains ซึ่งสามารถนำมาศึกษาถึงการ उपयोगทางการแพทย์ อุตสาหกรรม เกษตรกรรม และสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้การจัดการทรัพยากรพันธุกรรมของยีสต์ที่พบในดินป่าไม้ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ เช่น ป่าอนุรักษ์ในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นระบบมากยิ่งขึ้น อันจะส่งผลต่อการ उपयोगทรัพยากรยีสต์อย่างยั่งยืนในอนาคต สิ่งสำคัญที่สุดในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการบุกเบิกงานวิจัยด้านความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าธรรมชาติที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าของประเทศไทยโดยอาศัยเทคนิคสมัยใหม่คือ เทคนิค DHPLC ร่วมกับ culture-dependent method ซึ่งสามารถทำให้ทราบข้อมูลด้านความหลากหลายชนิดที่แท้จริงของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้ง โดยเฉพาะในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ที่ประกอบด้วยพื้นที่ป่าเบญจพรรณ (๕๙ เปอร์เซ็นต์) และดินป่าดิบแล้ง (๒๒ เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นผืนป่าธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์ในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยเฉพาะจังหวัดนครสวรรค์และกำแพงเพชร ผลของการทราบข้อมูลด้านความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จะทำให้สามารถวิเคราะห์และเข้าใจถึงบทบาทของยีสต์ในดินป่าธรรมชาติที่มีต่อระบบนิเวศป่าไม้ ในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติดังกล่าว ซึ่งจะเป็นองค์ความรู้ใหม่เสริมความรู้ความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับนิเวศวิทยาของยีสต์ที่ส่วนใหญ่เป็นรายงานเกี่ยวกับบทบาทในฐานะยีสต์เป็นผู้ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ในระบบนิเวศ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของวัฏจักรธาตุอาหารหลักและรองที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในระบบนิเวศ นอกจากนี้บทบาทหลักดังกล่าวยีสต์มีความสามารถในการสร้าง growth factors ที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียอาร์เคีย ราและเห็ดที่อาศัยในแหล่งอาศัยต่างๆในระบบนิเวศป่าไม้ รวมทั้งบทบาทยีสต์ในการสร้างฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน (auxin) เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ที่เป็น rhizospheric yeasts ผลจากการศึกษาวิจัยตามโครงการวิจัยที่เสนอในครั้งนี้จะได้รับข้อมูลด้านความหลากหลายชนิดและบทบาทเชิงนิเวศวิทยาของยีสต์ในดินป่าไม้ ซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ด้าน

จุลชีววิทยาป่าไม้ และเป็นฐานข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาความหลากหลายชนิดและบทบาทเชิงนิเวศวิทยาของยีสต์ในระบบนิเวศป่าไม้เป็นอย่างดีในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ป่าอนุรักษ์ในเขตอุทยานแห่งชาติและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าที่มีความสมบูรณ์ของระบบนิเวศป่าไม้

วัตถุประสงค์การวิจัย

๑. เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ด้วยเทคนิค DHPLC ร่วมกับ culture-dependent method

๒. เพื่อให้ได้องค์ความรู้ในด้านความหลากหลายและบทบาทเชิงนิเวศวิทยาของยีสต์ในระบบนิเวศป่าไม้ คือ ป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ (yeast diversity) หมายถึง คุณสมบัติของกลุ่มหรือชนิดของยีสต์ที่มีความหลากหลายในระดับพันธุกรรมหรือยีน (genetic diversity) ความหลากหลายชนิด (species diversity) จนถึงความหลากหลายของแหล่งอาศัยในเชิงนิเวศวิทยา (ecological diversity) ยีสต์เป็นเชื้อราที่เซลล์ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular fungi) พบได้ทั่วไปในแหล่งอาศัยตามธรรมชาติ เช่น ดิน อากาศ น้ำ สัตว์และพืช (do Carmo-Sousa, 1978; Spencer and Spencer, 1997; Luong *et al.*, 2000; Nakase, 2000) ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่น่าสนใจของยีสต์ เนื่องจากดินอุดมไปด้วยสารอาหารมากมายหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์โดยกิจกรรมของแบคทีเรีย อาร์เคีย ราเส้นใยและยีสต์ชนิดต่างๆ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตอื่นในดิน ผลของการใช้สารอาหารดังกล่าวทำให้ยีสต์สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ที่สำคัญ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และก๊าซหลายชนิด เป็นต้น ที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ทั้งกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobes) กลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (anaerobes) และกลุ่มที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) (Reith *et al.*, 2002) นอกจากนี้พบว่ายีสต์ในบางสกุล เช่น *Candida*, *Cerinosterus*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hormonema*, *Hortaea*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula* และ *Trichosporon* มีความสามารถในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ เนื่องจากยีสต์เหล่านี้มีกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) เพคตินเนส (pectinase) โปรตีเอส (protease) และไลเปส (lipase) เป็นต้น (Middelhoven, 1997; Scorzetti *et al.*, 2000; Middelhoven *et al.*, 2001) ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาพบว่า ยีสต์หลายชนิด เช่น *Aureobasidium pullulans*, *Citeromyces matritensis*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis* และ *Sporobolomyces roseus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (McCormack *et al.*, 1994)

ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านกายภาพและชีวภาพของดิน เช่น ชนิด ความอุดมสมบูรณ์ สภาวะความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความชื้น และสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆในดิน (Slavikova and Vadkertiova, 2000) ยีสต์บางชนิด เช่น *Debaryomyces occidentalis*, *Lipomyces starkeyi*, *L. lipofera*, *L. kononenkoae*, *L. tertrasporus*, *L. anomalus*, *Schizoblastosporion starkeyi-henricii*, *Sporobolomyces salmonicolor* และยีสต์หลายชนิดในสกุล *Cryptococcus* และ *Rhodotorula* เป็นยีสต์ที่พบได้ทั่วไปในดิน (Spencer and Spencer, 1997) ในอดีตการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินโดยทั่วไปมักเป็นการศึกษายีสต์ที่อาศัยอยู่ในดินที่เก็บจากแหล่งต่างๆในหลายภูมิภาคของโลก ที่มีความแตกต่างกันในด้านลักษณะของภูมิอากาศและภูมิประเทศ (Goto *et al.*, 1987; van der Walt *et al.*, 1994; Kurtzman, 2001) ในส่วนของการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินที่ทำการเก็บรวบรวมมาจากพื้นที่ป่าอนุรักษ์ยังมีอยู่น้อยมาก เช่น Slavikova and Vadkertiova (2000) ศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในดินของป่าผลัดใบ (deciduous forest) และป่าสน (coniferous forest) ในประเทศสโลวาเกีย พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินของป่าทั้งสองชนิด ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeasts

คือ *Cryptococcus laurentii*, *C. albidus*, *C. macerans*, *C. terreus*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. rubra*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Trichosporon cutaneum* และ *T. pullulans* สำหรับยีสต์ส่วนน้อยที่พบเป็นยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeasts คือ *Candida famata*, *Debaryomyces castellii*, *D. polymorphus*, *Kloeckera apis* และ *Pichia americana* ในปีต่อมา Polyakova et al. (2001) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินที่มีความชื้นสูงที่เก็บในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ในเขต Western Siberia และ Hummocky Tundra Region ที่ Cape Borrow (Alaska) พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินเป็นยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeasts เช่นเดียวกัน โดยชนิดที่พบมาก คือ *Cryptococcus albidus*, *C. gilvescens* และ *Rhodotorula mucilaginosa* สำหรับยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeasts ที่พบ คือ *Candida paludigena* และ *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าของอุทยานแห่งชาติในประเทศออสเตรเลียที่พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินเป็นยีสต์กลุ่ม basidiomycetous yeasts โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Cryptococcus* หลายชนิด (Wuczowski and Prillinger, 2004)

ในประเทศไทยการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินป่าธรรมชาติในเขตอุทยานแห่งชาติ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าของประเทศไทยอย่างเป็นระบบมีรายงานครั้งแรกโดย Sumpradit (2005) ซึ่งศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินที่เก็บจากป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าสนของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว โดยใช้ cultivation-based technique หรือ culture-dependent method โดยเริ่มจากการแยกยีสต์จากดินตัวอย่างโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งมีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญของยีสต์ และมีการเติมสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราเส้นใยที่มีอยู่จำนวนมากในดินตัวอย่างสำหรับการพิสูจน์เพื่อระบุชนิดของยีสต์ ทำโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ซึ่งยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ และมีความจำเพาะในยีสต์แต่ละชนิด ทั้งนี้ยีสต์ต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินโดยใช้ culture-dependent method ดังกล่าวมีข้อด้อยในส่วนที่ไม่สามารถศึกษาสายพันธุ์ที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ จากการประมาณการของนักอนุกรมวิธานของเชื้อรา พบว่ามีเพียง 17 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ (Bridge and Spooner, 2001) และจากจำนวนของยีสต์ที่มากกว่า 1,000 ชนิด ที่ได้รับการค้นพบและมีรายงานการศึกษาในปัจจุบันคิดเป็นจำนวนเพียง 1-10 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ทั้งหมดที่มีอยู่ตามแหล่งที่อยู่อาศัยชนิดต่างๆบนโลก (Fell et al., 2000) ดังนั้นการใช้ culture-dependent method เพียงเทคนิคเดียวในการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดิน โดยเฉพาะในดินของป่าธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ชนิดต่างๆ จึงไม่สามารถทำให้ทราบถึงความหลากหลายชนิดที่แท้จริงของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในดินป่าไม้ ดังนั้นผู้วิจัยเห็นว่าการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าไม้ด้วย DNA-based/culture-independent method คือ Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) ร่วมกับ culture-dependent method จะทำให้ทราบถึงความหลากหลายชนิดที่แท้จริงของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ได้เป็นอย่างดี

สำหรับเทคนิค DHPLC เป็นเทคนิคทันสมัยที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษา microbial communities โดย Barlaan *et al.* (2005) เป็นคณะผู้วิจัยกลุ่มแรกที่ใช้เทคนิคดังกล่าวในการศึกษา bacterial community ของ marine bacteria ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายชนิดของ marine bacteria ซึ่งมี PCR-amplified 16S rDNA ของ marine bacteria หลายชนิดรวมกัน เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DHPLC สามารถพบ distinguishable peaks ที่แต่ละ peak เป็นตัวแทนของ PCR-amplified 16S rDNA ของ marine bacteria ต่างชนิดกัน เทคนิค DHPLC เป็นเทคนิคที่ผสมผสานระหว่างเทคนิค denaturing DNA กับ reversed phase HPLC โดยเทคนิค denaturing DNA เป็นเทคนิคที่อาศัยความร้อนเพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจน ส่งผลให้ดีเอ็นเอสายคู่กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ส่วนเทคนิค reversed phase HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารที่อาศัยส่วนของ stationary phase ในคอลัมน์เป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว และส่วนของ mobile phase เป็นส่วนที่มีขั้ว เมื่อสารตัวอย่างมีความเป็นขั้วสูงจะถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าสารที่มีขั้วน้อยกว่าหรือไม่มีขั้วเลย จึงสามารถแยกสารต่างๆออกจากกันได้ ส่วนเทคนิค DHPLC จะมีส่วนของ stationary phase ที่ประกอบไปด้วยอนุภาค alkylated nonporous polystyrene-divinylbenzene ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 ไมครอน เป็นอนุภาคที่ไม่มีขั้วและมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic ส่วน mobile phase ที่ใช้ได้แก่ Buffer A ประกอบด้วย 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) ในน้ำบริสุทธิ์ ใช้ในการปรับปริมาตรการไหลเข้าของ Buffer B เข้าสู่ระบบ สำหรับ Buffer B ประกอบด้วย 0.1 M TEAA กับ acetonitrile (ปริมาตรสุดท้าย 25 เปอร์เซ็นต์) หน้าที่ของ TEAA นั้นจะเป็นตัวกลางในการจับดีเอ็นเอไว้กับส่วนของ stationary phase ไว้ ซึ่งเรียกคุณสมบัตินี้ว่า ion-pairing reagent โดยประจุบวกบนหมู่ ammonium โมเลกุลของ TEAA จะจับกับประจุลบของหมู่ฟอสเฟตในสายดีเอ็นเอ ในขณะที่เดียวกันด้านที่มี alkyl chain จะไปจับ (interact) กับส่วนที่เป็น hydrophobic บนผิวหน้าของ stationary phase เมื่อมีปริมาณการไหลเข้าของ Buffer B น้อย ปริมาณ acetonitrile ในระบบจะน้อยไปด้วย แรงผลักรวมที่เกิดจากโมเลกุลของ acetonitrile ต่อการผลักรวมด้วยประจุลบของตัวเองของดีเอ็นเอจะน้อย จนไม่สามารถทำลายแรงจับระหว่าง TEAA กับดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอยังคงติดอยู่ในส่วนของ stationary phase แต่เมื่อมีการค่อยๆเพิ่มปริมาณการไหลเข้าของ Buffer B ในระบบ หรือ increasing gradient ของ Buffer B ซึ่งหมายถึง ปริมาณของ acetonitrile ที่เพิ่มขึ้น ทำให้แรงผลักรวมของประจุลบในโมเลกุลของ acetonitrile มากขึ้น จนความเข้มข้นของ acetonitrile ถึงจุดๆหนึ่งซึ่งแรงผลักรวมของ acetonitrile มีแรงผลักรวมมากกว่าแรงจับของดีเอ็นเอกับ TEAA เป็นผลทำให้สายดีเอ็นเอหลุดออกมาจากส่วนของ stationary phase และถูกชะออกจากคอลัมน์ในที่สุด ปัจจัยอีกปัจจัยหนึ่งที่ถือได้ว่ามีบทบาทที่สำคัญที่สุดในการวิเคราะห์สายดีเอ็นเอ โดยเทคนิค DHPLC คือ อุณหภูมิที่อยู่ในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิจะมีผลต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอ ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณ G+C หรือ mol% G+C ของสายดีเอ็นเอที่สนใจ อุณหภูมิจะไปมีผลทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะดีเอ็นเอที่มี mol% G+C ต่ำ จะมีความเสถียร (stable) น้อยกว่า ทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ส่งผลให้แรงจับระหว่างดีเอ็นเอกับ TEAA มีน้อยกว่า สายดีเอ็นเอที่มี mol%G+C สูง เป็นผลทำให้ดีเอ็นเอสายที่มี mol% G+C น้อยกว่าถูกชะออกมาก่อน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสายของดีเอ็นเอที่มาจาก

ต่างสายพันธุ์กันโดยวิธี DHPLC คือ ปริมาณของ acetonitrile ในระบบและอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สนใจ (Sivakumaran *et al.*, 2003) ข้อดีของเทคนิค DHPLC นั้น เป็นวิธีที่ง่าย ไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และใช้ระยะเวลาสั้นในการวิเคราะห์ กล่าวคือ เมื่อเปิดเครื่อง DHPLC และรอให้เครื่องพร้อมทำงาน (equilibrate) ไม่เกิน 30 นาที ก็สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สนใจได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากได้ในคราวเดียวกัน และสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เราสนใจออกจากชิ้นดีเอ็นเออื่น โดยอาศัย fragment collector ซึ่งเป็นเครื่องคัดแยกสายดีเอ็นเอที่สนใจออกมา ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในด้านของการพิสูจน์เพื่อระบุชนิด เพื่อนำดีเอ็นเอที่สนใจนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป (Ogier *et al.*, 2004)

บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

การวางแผนพื้นที่และการเก็บดินตัวอย่าง

กำหนดแปลงพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างจากป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยกำหนดชนิดป่าละ 1 แปลง ทั้งนี้จะพิจารณาจากชนิดพันธุ์ของไม้ในระดับเรือนยอด และพื้นล่างของป่าไม้เป็นหลัก ร่วมกับสภาพทางภูมิประเทศ สภาพภูมิอากาศ ปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพอื่นๆ การวางแผนพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างไม่กระทบกระเทือนหรือทำให้พื้นที่ป่าอนุรักษ์เสียหาย ดินตัวอย่างที่ได้มารวมกันเป็น 12 composite samples เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ต่อไป

การแยกยีสต์จากดินตัวอย่างโดย culture-dependent method

การแยกยีสต์จากดินตัวอย่างทำตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kurtzman and Sugiyama (2001) โดยใส่ดินตัวอย่างในอาหาร acidified yeast extract malt extract broth ที่มีสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโพธิ์โอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 3.7 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-7 วัน จากนั้นทำการแยกยีสต์ที่เจริญในอาหารดังกล่าว โดยใช้ acidified yeast extract malt extract agar ที่มีสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโพธิ์โอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 3.7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-7 วัน เมื่อพบโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร ทำการเลือกเก็บโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค cross streak บนอาหาร yeast extract malt extract (YM) agar และเก็บยีสต์บริสุทธิ์ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาคุณสมบัติทางฟิโนไทป์บางประการ

การศึกษาคุณสมบัติทางฟิโนไทป์บางประการ เช่น cell shapes, colony morphology การทำปฏิกิริยากับสี Diazonium Blue B และการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูริเอส ตามวิธีมาตรฐาน (Kurtzman and Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2000)

การพิสูจน์เพื่อระบุชื่อยีสต์ตามหลักการ Phylogenetic identification

การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเซลล์ยีสต์ 45 สายพันธุ์ตามวิธีการของ Kurtzman and Robnett, 1998; Sumpradit, 2005) เพื่อใช้เป็น DNA templates เตรียม D1/D2 domain ของ 26S ribosomal DNA sequences ตามวิธีของ Kurtzman and Robnett (1998) และทำการตรวจสอบ amplicon ที่ได้โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ร่วมกับการย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นทำการแยก amplicon ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Purification Kit (Qiagen) และนำ amplicon ที่ได้มาทำ cycle-sequencing โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems) ร่วมกับการใช้เทคนิค PCR ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำเอาผลการทดลองมาวิเคราะห์หาลำดับเบสของ D1/D2 domain ของ LSU rDNA (26S rDNA) และนำไปใช้ในการระบุชื่อสปีชีส์ของยีสต์โดยการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ D1/D2 domain ใน database ของ DDBJ (DNA Data Bank of Japan) โดย

ใช้โปรแกรม BLAST บน homepage ดังกล่าว พร้อมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X 1.61

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้งโดยใช้เทคนิค Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

แยกดีเอ็นเอจากดินตัวอย่างโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Xia *et al.* (2006) สารละลายดีเอ็นเอที่แยกได้ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DNA Purification kit วิเคราะห์ DNA yield โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร วิเคราะห์ความบริสุทธิ์โดยการหาค่า OD₂₆₀/OD₂₃₀

การเพิ่มปริมาณของยีนที่ครอบคลุมบริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับคู่ primer ที่เหมาะสมทำการขยายปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ forward primer ITS1FD (5'-GGTCATTTAGWGGAATAA-3') และ reverse primer LR6 (5'-CGCCAGTTCTGCTTACC-3') (Gadanhó and Sampaio, 2004) โดย PCR condition ที่ใช้คือ เริ่มจากการทำ pre-denaturation ที่ 94 °C นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94 °C นาน 1 นาที annealing ที่ 56 °C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72 °C นาน 90 วินาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ ตามด้วย final extension ที่ 72 °C นาน 5 นาที จากนั้นตรวจสอบ PCR products โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ร่วมกับการใช้ DNA size marker เพื่อเป็นการยืนยันว่า PCR products ที่ได้เป็นยีนเป้าหมาย จากนั้นทำการแยก PCR products จากองค์ประกอบอื่นๆในการทำ PCR โดยใช้ QIAquick Purification Kit (Qiagen) PCR products ที่ได้จากนำมาเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค PCR ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Cocolin *et al.* (2002) และ Gadanhó and Sampaio (2004) ซึ่งใช้ GC-clamp forward primer NL1 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGGCGGGGCCATATCAATAAGC-3') และ reverse primer LS2 (5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3') และใช้ LS2-F (5'-GAGTCGAGTTGTTGGGAAT-3') และ GC-clamp primer NL4 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGGCGGGGGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') และนำ GC-clamp amplicons ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Denaturing High-Performance Liquid Chromatography ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Barlaan *et al.* (2005) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 domain ของ LSU rDNA ที่ตรวจพบจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DHPLC ดำเนินการโดย manual fraction collection จากนั้นนำมาทำ cycle-sequencing โดยใช้ BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied, Biosystems) ร่วมกับการใช้เทคนิค PCR ซึ่งใช้ forward primer NL1 และ reverse primer NL4 ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต โดย PCR condition ที่ใช้การทำบริสุทธิ์ cycle-sequencing product ที่ได้ และการพิสูจน์เพื่อบุขนิตของยีสต์ทำตามวิธีข้างต้นที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้

บทที่ 4 ผลการวิจัย

ดินตัวอย่างจากป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ชนิดป่าละ 12 ตัวอย่าง ซึ่งเป็น composite samples ได้กำหนดรหัสดินตัวอย่างเป็น MDF-MW 01-12 และ DEF-MW 01-12 ตัวอย่างดินที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าพีเอชพบว่า ดินตัวอย่างทั้งหมดมีค่าความเป็นกรดแตกต่างกันไป โดยดินป่าเบญจพรรณมีค่าความเป็นกรดในช่วง 4.2-5.6 และดินป่าดิบแล้งมีค่าความเป็นกรดในช่วง 4.0-5.8

จากการคัดแยกยีสต์จากดินตัวอย่างสามารถคัดแยกยีสต์ได้จากดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้ง จำนวน 16 และ 29 สายพันธุ์ ตามลำดับ ยีสต์ทั้งหมดเก็บเป็น working stock ในอาหาร YM agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ long-term preservation stock ในอาหาร YM broth ที่เติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปพิสูจน์เพื่อจัดจำแนกยีสต์โดยใช้ phylogenetic identification รวมทั้งศึกษา phenotypic characteristics ต่อไป

นำยีสต์จำนวน 45 สายพันธุ์มาทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่สำคัญเพื่อระบุว่าเป็นยีสต์กลุ่มแอสโคไมยซีส (ascomycetous yeasts) หรือยีสต์กลุ่มเบสิดิโอไมยซีส (basidiomycetous yeasts) โดยทดสอบการทำปฏิกิริยากับสี Diazonium Blue B และการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส พบว่า ยีสต์ทั้งหมดทุกสายพันธุ์ให้ผลการทดสอบใน 2 การทดสอบเป็นลบ (negative results) แสดงว่า ยีสต์ทั้ง 45 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในการศึกษานี้เป็น ascomycetous yeasts เนื่องจาก ascomycetous yeasts ขาดความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสี Diazonium Blue B และขาดความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Kurtzman and Fell, 1998; Barnett, 2000) และจากการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์พบว่า ยีสต์ทุกสายพันธุ์มีลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่หลากหลาย เช่น กลม (round) รูปไข่ (ovoid) และรี (ellipsoid) เป็นต้น สีของโคโลนี คือ ขาว และครีม เป็นต้น

จากการพิสูจน์เพื่อระบุชื่อยีสต์ทั้ง 45 สายพันธุ์ ตามหลักการ phylogenetic identification โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ LSU rDNA พบความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้ง โดยจัดอยู่ในสกุล คือ *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Kloeckera*, *Millerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Tetrapisispora* และ *Yarrowia* (ตารางที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์เพื่อระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกจากดินป่าเบญจพรรณ

รหัสสายพันธุ์	ชนิดของยีสต์ที่ระบุ	% Sequence similarities
MWM57-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
MWM57-2	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	100
MWM57-3	<i>Candida diversa</i>	100
MWM57-4	<i>Kloeckera apiculata</i>	100
MWM57-5	<i>Candida maltosa</i>	100
MWM57-6	<i>Candida albicans</i>	100
MWM57-7	<i>Tetrapisispora namnaonesis</i>	100
MWM57-8	<i>Millerozyma phetchabunensis</i>	99
MWM57-9	<i>Galactomyces geotrichum</i>	100
MWM57-10	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	100
MWM57-11	<i>Candida diversa</i>	100
MWM57-12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
MWM57-13	<i>Candida diversa</i>	100
MWM57-14	<i>Candida albicans</i>	100
MWM57-15	<i>Pichia kluyveri</i>	100
MWM57-16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100

ตารางที่ 2 ผลการพิสูจน์เพื่อระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกจากดินป่าดิบแล้ง

รหัสสายพันธุ์	ชนิดของยีสต์ที่ระบุ	% Sequence similarities
DEM57-1	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	100
DEM57-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
DEM57-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
DEM57-4	<i>Candida albicans</i>	100
DEM57-5	<i>Candida diversa</i>	100
DEM57-6	<i>Pichia kluyveri</i>	100
DEM57-7	<i>Kloeckera lindneri</i>	100
DEM57-8	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99
DEM57-9	<i>Geotrichum candidum</i>	100
DEM57-10	<i>Galactomyces geotrichum</i>	100
DEM57-11	<i>Tetrapisispora namnaonensis</i>	100
DEM57-12	<i>Kloeckera lindneri</i>	100
DEM57-13	<i>Candida albicans</i>	100
DEM57-14	<i>Tetrapisispora namnaonensis</i>	100
DEM57-15	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	100
DEM57-16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
DEM57-17	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100
DEM57-18	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100
DEM57-19	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99
DEM57-20	<i>Kazachstania humatica</i>	99
DEM57-21	<i>Geotrichum candidum</i>	100
DEM57-22	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	100
DEM57-23	<i>Tetrapisispora namnaonensis</i>	100
DEM57-24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
DEM57-25	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100
DEM57-26	<i>Candida albicans</i>	100
DEM57-27	<i>Kazachstania humatica</i>	99
DEM57-28	<i>Tetrapisispora namnaonensis</i>	100
DEM57-29	<i>Geotrichum candidum</i>	100

การสกัดแยกดีเอ็นเอของยีสต์โดยตรงจากดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ยังไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากคาดว่าเป็นผลของ humic acids และกรดอินทรีย์อื่นๆ ที่พบในดินที่ได้จากการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ ดังนั้นต้องปรับปรุงวิธีการและสถานะที่ใช้ในการสกัดแยก ทั้งนี้ต้องใช้เวลาในการดำเนินการวิจัยอย่างต่อเนื่องอีกประมาณ 12-24 เดือน โดยผลสำเร็จเมื่อปรากฏคณะผู้วิจัยจะนำเสนอในที่ประชุมวิชาการนานาชาติและ/หรือตีพิมพ์ผลงานในระดับชาติและ/หรือนานาชาติต่อไป

บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผล

ป่าธรรมชาติในพื้นที่อนุรักษ์ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยเฉพาะป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้ง เป็นส่วนหนึ่งของผืนป่าตะวันตกของประเทศไทยที่มีความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศป่าไม้ ที่ได้รับการคาดหมายว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทั้งในแง่ของความหลากหลายชนิด ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความหลากหลายของแหล่งอาศัย ทั้งนี้ดินได้รับการคัดเลือกให้เป็นตัวอย่างที่นำมาศึกษาวิจัยเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพโดยเฉพาะความหลากหลายชนิดของยีสต์ซึ่งเป็นเชื้อราเซลล์เดียวที่คาดว่าจะมีความหลากหลายในระดับสูง จากการคัดแยกยีสต์จากดินตัวอย่างที่เก็บจากป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์พบว่า ยีสต์ที่พบมีจำนวนทั้งหมด 17 ชนิดหรือสปีชีส์ ประกอบด้วย *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *C. diversa*, *K. apiculata*, *C. maltosa*, *C. albicans*, *T. namnaonensis*, *M. phetchabunensis*, *Ga. geotrichum*, *P. kluyveri*, *K. lindneri*, *T. phaffii*, *G. candidum*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii*, *H. uvarum* และ *Ka. humatica* ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับความหลากหลายชนิดของยีสต์ที่พบในดินป่าไม้ในพื้นที่กลุ่มป่าแก่งกระจานพบว่ามีความหลากหลายชนิดของยีสต์น้อยกว่า โดยยีสต์ที่พบในดินกลุ่มป่าแก่งกระจาน คือ พบบยีสต์ 28 ชนิด คือ *Asterotremella humicola*, *Blastobotrys mokoensis*, *Candida albicans*, *C. boidinii*, *C. californica*, *C. cylindracea*, *C. diversa*, *C. fukuyamaensis*, *C. maltosa*, *C. pseudolambica*, *C. zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *D. nepalensis*, *D. polymorphus*, *Geotrichum fragans*, *Ge. silvicola*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania humatica*, *Kloeckera lindneri*, *Millerozyma phetchabunensis*, *Pichia galeiformis*, *P. kluyveri*, *P. spartinae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kluyveri*, *S. unisporus*, *Tetrapisispora namnaonensis* และ *Yarrowia lipolytica* รวมทั้งยีสต์ชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ *Candida kaengkachanensis* sp. nov. ซึ่งการระบุชนิดของยีสต์ใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของยีสต์ที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้กับยีนบริเวณเดียวกันของยีสต์ทุกชนิดที่พบในแหล่งอาศัยต่างๆบนโลก ที่ปรากฏในฐานข้อมูลของ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) โดยหากยีนของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบกันมีความเหมือนกันมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป แสดงว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นยีสต์ชนิดเดียวกัน หากยีนของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบกันมีความเหมือนกันน้อยกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ หรือมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์แสดงว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นยีสต์ต่างชนิดกัน (Kurtzman and Robnett, 1998) ความหลากหลายชนิดของยีสต์ที่พบต่างกันนั้นอาจเป็นผลจากหลายปัจจัยทั้งด้านกายภาพ และชีวภาพ เช่น ความอุดมสมบูรณ์/ชนิดและคุณสมบัติของดินตัวอย่าง ความผันแปรของปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพในระบบนิเวศป่าไม้ในเขตพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติและกลุ่มป่า ตลอดจนปัจจัยเกี่ยวพันทางกายภาพและชีวภาพอื่นๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ แหล่งน้ำ แหล่งอาหาร การกระจายพันธุ์ของพืชละสัตว์ในพื้นที่ เป็นต้น ผลการ

วิเคราะห์ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าไม้ในต่างประเทศที่ปรากฏในอดีตมีความแตกต่างจากที่พบในประเทศไทย ดังนี้ Slavikova and Vadkertiova (2000) ศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในดินของป่าผลัดใบ (deciduous forest) และป่าสน (coniferous forest) ในประเทศสโลวาเกีย พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินของป่าทั้งสองชนิด ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeasts คือ *Cryptococcus laurentii*, *C. albidus*, *C. macerans*, *C. terreus*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. rubra*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Trichosporon cutaneum* และ *T. pullulans* สำหรับยีสต์ส่วนน้อยที่พบเป็นยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeasts คือ *Candida famata*, *Debaryomyces castellii*, *D. polymorphus*, *Kloeckera apis* และ *Pichia americana* ในปีต่อมา Polyakova et al. (2001) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินที่มีความชื้นสูงที่เก็บในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ในเขต Western Siberia และ Hummocky Tundra Region ที่ Cape Borrow (Alaska) พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินเป็นยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeasts เช่นเดียวกัน โดยชนิดที่พบมาก คือ *Cryptococcus albidus*, *C. gilvescens* และ *Rhodotorula mucilaginosa* สำหรับยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeasts ที่พบ คือ *Candida paludigena* และ *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าของอุทยานแห่งชาติในประเทศออสเตรเลียที่พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินเป็นยีสต์กลุ่ม basidiomycetous yeasts โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Cryptococcus* หลายชนิด (Wuczowski and Prillinger, 2004) ทั้งนี้ผลการคัดแยกที่ได้ ascomycetous yeasts หรือ basidiomycetous yeasts ขึ้นกับสถานะที่ใช้ในการคัดแยกยีสต์ เช่น ชนิดของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ และระยะเวลาในการบ่ม cultivation/isolating plates เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้โดยใช้ culture-independent approach เพิ่มเติม โดยสกัดดีเอ็นเอของยีสต์จากดินตัวอย่าง ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายที่ใช้เป็น phylogenetic markers เพื่อใช้พิสูจน์เพื่อระบุชนิดของยีสต์โดยใช้การเปรียบเทียบ DHPLC profiles ของ culturable strains ที่ปรากฏในรายงานวิจัยฉบับนี้ ยังมีอุปสรรคในขั้นตอนการสกัดแยกดีเอ็นเอของยีสต์จากดินตัวอย่างที่เป็นผลขัดขวางจากปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินตัวอย่าง โดยเฉพาะกรดฮิวมิกและอนุพันธ์ของกรดฮิวมิก ที่มีมากอันเนื่องจากความอุดมสมบูรณ์ของดินที่ปรากฏผ่านปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินที่สัมพันธ์กับกรดฮิวมิกและอนุพันธ์ของกรดฮิวมิก ทั้งนี้การวิจัยจะดำเนินต่อไปในห้วงปฏิบัติการเป็นระยะเวลาประมาณ 1-2 ปี ภายหลังจากที่ได้ผลงานวิจัยจะนำเสนอต่อไปในการประชุมวิชาการ และวารสารระดับนานาชาติต่อไป

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ความหลากหลายของยีสต์ที่พบในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้ง พื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยการวิเคราะห์ตามหลักการ culture-dependent approach มีจำนวนทั้งหมด 17 ชนิดหรือสปีชีส์ ประกอบด้วย *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *C. diversa*, *K. apiculata*, *C. maltosa*, *C. albicans*, *T. namnaonensis*, *M. phetchabunensis*, *Ga. geotrichum*, *P. kluyveri*, *K. lindneri*, *T. phaffii*, *G. candidum*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii*, *H. uvarum* และ *Ka. Humatica* โดยความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณน้อยกว่าความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าดิบแล้ง

การพัฒนาวิธีการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ทั้งวิธีการสกัดดีเอ็นเอของยีสต์จากดิน การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายที่ใช้เป็น phylogenetic markers เพื่อพิสูจน์ระบุชื่อยีสต์ในระดับชนิดหรือสปีชีส์โดยใช้ DHPLC มีความจำเป็น ซึ่งดินที่มาจาก habitats หรือ ecosystems ที่ต่างกันต้องใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอของยีสต์จากดิน การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายที่ใช้เป็น phylogenetic markers เพื่อพิสูจน์ระบุชื่อยีสต์ในระดับชนิดที่ต่างกัน ทั้งนี้งบประมาณที่จำกัดในการวิจัยไม่สามารถทำได้ดัง goal ที่ตั้งไว้

บรรณานุกรม

- Bai, F.Y., M. Takashima, J.H. Jia and T. Nakase. 2002. *Dioszegia zsoltii* sp. nov., a new ballistoconidium-forming yeast species with two varieties. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 48: 17-23.
- Barlaan, E.A., M. Sugimori, S. Furukawa and K. Takeuchi. 2005. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. **J. Microbiol. Methods.** 61: 399-412.
- Bridge, E. and B. Spooner. 2001. Soil fungi: diversity and detection. **Plant Soil** 232: 147-154.
- Cocolin, L., A. Daniele, M. Manzano, C. Cantoni and G. Comi. 2001. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast population in raw milk. **International Dairy Journal** 12: 407-411.
- Cocolin, L., L.F. Bission and D.A. Mills. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiol. Lett.** 189: 81-87.
- do Carmo-Sousa, L. 1978. Taxonomy and systematics of yeasts, pp. 5-78. In A.H. Rose and J.S. Harrison, eds. **The Yeasts Volume1: Biology of Yeasts.** Academic Press, New York.
- Fell, J.W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti and A. Stazzell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 1351-1371.
- Felske, A., H. Rheims, A. Wolterink, E. Stackebrandt and A.D.L. Akkermans. 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. **Microbiology.** 143: 983-989.
- Fonseca, A., J.W. Fell, C.P. Kurtzman and I. Spencer-Martins. 2000. *Candida tartarivorans* sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast with the capacity to degrade L(+)- and meso-tartaric acid. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 389-394.
- Gadanho, M. and J.P. Sampaio. 2004. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. **FEMS Yeast Res.** 5: 253-261.
- Goto, S., H. Iwasaki, Y. Okuma, Y. Ito and A. Endo. 1987. New species belonging to the genera *Pichia* and *Candida*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 33: 275-286.
- Griffiths, R.I., A.S. Whiteley, A.G. O' Donnell and M.J. Bailey. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. **Applied Environ. Microbiol.** 66: 5488-5491.

- Hirai, A., R. Kano, K. Makimura, E.R. Duarte, J.S. Hamdan, M.A. Lachance, H. Yamaguchi and A. Hasegawa. 2004. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 623-627.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** 16: 111-120.
- Kurtzman, C.P. 2001. Four new *Candida* species from geographically diverse locations. **Antonie van Leeuwenhoek.** 79: 353-361.
- Kurtzman, C.P. and C.J. Robnett. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1216-1233.
- Kurtzman, C.P. and C.J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek.** 73: 331-371.
- Kurtzman, C.P. and J. Sugiyama. 2001. Ascomycetous yeasts and yeastlike taxa, pp. 179-200. In D.J. McLaughlin and P.A. Lemke, eds. **The Mycota VII: Systematics and Evolution Part A.** Springer-Verlag, Berlin.
- Lachance, M.A. 1990. Yeast selection in nature, pp. 21-41. In C.J. Panchal, ed. **Yeast Strain Selection.** Marcel Dekker, Inc., New York.
- Lachance, M.A., J.M. Bowles, W.T. Starmer and S.F. Barker. 1999. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. **Can. J. Microbiol.** 45: 172-177.
- Limtong, S., N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Kawasaki, H. Yurimoto, T. Nakase and N. Kato. 2004. Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp. nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolated in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 119-127.
- Loung, D.T., M. Takashima, P.V. Ty, N.L. Dung and T. Nakase. 2000. Four new species of *Kockovaella* isolated from plant leaves collected in Vietnam. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 46: 279-310.
- Ma, W.K., S.D. Siciliano and J.J. Germida. 2005. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. **Soil Biol. Biochem.** 37: 1589-1597.
- McCormack, P.J., H.G. Wildman and P. Jeffries. 1994. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 927-931.
- Middelhoven, W.J. 1997. Identity and biodegradative abilities of yeasts isolated from plants growing in an arid climate. **Antonie van Leeuwenhoek.** 72: 81-89.
- Middelhoven, W.J., G. Scorzetti and J.W. Fell. 2001. *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the *loubieri/laibachii* group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. **FEMS**

Yeast Res. 1: 15-22.

Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems.

Current Opinion in Microbiology. 2: 317-322.

Muyzer, G. and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology.

Antonie van Leeuwenhoek. 73: 127-141.

Muyzer, G., E.S. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 695-700.

Nakase, T. 2000. Expanding world of ballistosporus yeasts: distribution in the phyllosphere, systematics and phylogeny. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 46: 189-216.

O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives, pp. 225-233. In D.R. Reynolds and J.W. Taylor, eds. **The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiosis and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics.** CAB International, Wallingford.

Prakitchaiwattana, C.J., G.H. Fleet and G.M. Heard. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Res.** 4: 865-877.

Reith, F., H.L. Drake and K. Kusel. 2002. Anaerobic activities of bacteria and fungi in moderately acidic conifer and deciduous leaf litter. **FEMS Microbiol. Ecol.** 41: 27-35.

Scorzetti, G., I. Petrescu, D. Yarrow and J.W. Fell. 2000. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek.** 77: 153-157.

Shin, K.S., Y.K. Shin, J.H. Yoon and Y.H. Park. 2001. *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51, 2167-2170.

Slavikova, E. and R. Vadkertiova. 2000. The occurrence of yeasts in the forest soils. **J. Basic Microbiol.** 40: 207-212.

Spencer, J.F.T. and D.M. Spencer. 1997. *Yeasts in Natural and Artificial Habitats.* Springer-Verlag, Berlin.

Sumpradit, T. 2005. Yeast diversity in soils from hill evergreen, mixed deciduous, dry dipterocarp, and pine forests in Nam Nao National Park. Ph.D. thesis, Kasetsart University.

Thanh, V.N., D.A. Hai and M.A. Lachance. 2003. *Issatchenkia hanoiensis*, a new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha cramerella* Snellen. **FEMS Yeast Res.** 4: 113-117.

Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of

progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Res.** 22: 4673-4680.

van der Walt, J.P., T. Nakase, M. Suzuki, M. Takashima and Y. Yamada. 1994. *Debaryomyces polymorphus* var. *africanus*, a new variety of ascosporogenous yeast found in South Africa. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 40: 331-337.

van Dijken, J.P. and W. Harder. 1974. Optimal conditions for the enrichment and isolation of methanol-assimilating yeasts. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 84: 409-411.

Wuczkowski, M. and H. Prillinger. 2004. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). **Microbiol. Res.** 159: 263-275.

Yarrow, D. 1998. Methods for isolation, maintenance, and identification of yeasts, pp. 77-100. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 4th ed. Elsevier Science, Inc., Amsterdam.



รายงานการวิจัย

การศึกษาดัชนีทางสังคมของนกเพื่อการจัดการและการอนุรักษ์ ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Research in Bird community in management and conservation aspect in
Mae Wong National Park

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธนบุรี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาด้านนี้ทางสังคมของนกเพื่อการจัดการและการอนุรักษ์ อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2557 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณแหล่งทุนไว้ ณ ที่นี้ พร้อมกันนี้ ขอขอบคุณหัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ และเจ้าหน้าที่ป่าไม้ อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนลุล่วงไปด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภลักษณ์ วิรัชพินทุ ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

การศึกษาดัชนีทางสังคมของนกเพื่อการจัดการและการอนุรักษ์ อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ดำเนินการเก็บข้อมูลในสองพื้นที่คือป่าเบญจพรรณ ที่ความสูง 300-370 เมตร (เส้นทางไปโมโกจู) และป่าดิบเขาระดับต่ำ บริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่วงก์ (ช่องเย็น) ที่ความสูง 1,090 -1,172 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ระหว่างเดือนตุลาคม 2557-กันยายน 2558 โดยสำรวจด้วยวิธี point count ในระยะทาง 1.5 กิโลเมตร วิเคราะห์ดัชนีความหลากหลาย บัญชีรายชื่อ ระดับความชุกชุม ดัชนีความเด่นและดัชนีความเหมือนของสองพื้นที่ ผลการวิจัยพบนกทั้งหมด 147 ชนิดพันธุ์ นกในเส้นทางป่าเบญจพรรณ และเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติพบจำนวน 92 ชนิดพันธุ์ 11 อันดับ 43 วงศ์ และ 86 ชนิดพันธุ์ 12 อันดับ 34 วงศ์ ตามลำดับ ทั้งสองพื้นที่มีดัชนีความเหมือนของนก 21.08 % โดยมีนกเฉพาะพื้นที่ทางไปโมโกจูและเฉพาะเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ 61 ชนิดพันธุ์และ 55 ชนิดพันธุ์ตามลำดับ ดัชนีหลากหลายอยู่ระหว่าง 1.50-2.80 nits นกจำนวน 80 ชนิดพันธุ์มีระดับความชุกชุม “ไม่ธรรมดา” 42 ชนิดพันธุ์มีระดับ “ธรรมดาแต่ไม่พบบ่อย” 15 ชนิดพันธุ์มีระดับ “ธรรมดาพบบ่อย” 9 ชนิดพันธุ์มีระดับ “ธรรมดามาก” และ 1 ชนิดพันธุ์มีระดับ “ชุกชุม” นกส่วนมากมีระดับไม่ธรรมดา จึงทำให้ดัชนีความเด่นต่ำ จากการที่พบนกเฉพาะพื้นที่ ข้อมูลนี้แสดงถึงความสำคัญของป่าทั้งสองประเภท อันเป็นถิ่นอาศัยที่มีความเหมาะสมกับสายพันธุ์ของนกต่างกัน จึงมีความจำเป็นต้องบริหารจัดการพื้นที่ทั้งสองแห่งอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อการอนุรักษ์ชนิดพันธุ์นกของทั้งสองพื้นที่ไว้

The bird community indices in Mae Wong National Park were taken place in 2 areas, the first is Mixed deciduous forest at the elevation of 300-370 meters above sea level and the second is the lower montane rain forest at the elevation of 1090-1172 meters above sea level. The data were recorded between October 2014 and September 2015 by Pointing – count method along the 1.5 kilometer- line transects. The results showed 147 species. We found 92 species 11 Order 43 Families, and 86 species 12 Order 34 Families in the mixed deciduous and the lower montane rain forest, respectively. Similarity index in the two areas is 21.08 %, there are 61 species were found only in the first area while 55 species were appeared only at the second. Heterogeneity of the areas were between 1.50-2.80 nits. Abundance of 80 species were uncommon includes 42 fairly common, 15 common frequent, 9 very common and one abundant. Most of species are uncommon, so the index of dominance was low. In the case of some bird species were found in specific habitat, the results suggest the importance of both mixed deciduous and lower montane forests as suitable habitat for various bird species, and the necessity to effectively manage the area of both forests for conservation effort

Keyword : community indices , Mae Wong National Park

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	5
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผลการวิจัย	8
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย ข้อเสนอแนะ และการใช้ประโยชน์จากงานวิจัย	15
รายการอ้างอิง	17
ภาคผนวก	20

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ค่าเฉลี่ยความหลากหลายใน 15 point counts รายเดือน	9
ตารางที่ 2	ค่าเฉลี่ยความหลากหลายรายเดือน และspecies check list	10
ตารางที่ 3	ระดับความชุกชุม 6 ระดับของนก 147 ชนิดพันธุ์	10
ตารางที่ 4	รายชื่อนกที่มีความเด่นและระดับความชุกชุมสูงสุด 10 อันดับแรก	14

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก	ความหลากหลายชนิดของนกในป่าเบญจพรรณ (พื้นที่ 1) และป่าดิบเขาในระดับต่ำ	21
1	(พื้นที่ 2) อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ข้อมูลอนุกรมวิธาน; จำนวนตัวรวมทั้งนับได้ใน 1 ปีที่สำรวจ ในวงเล็บคือabundance ranking, สถานภาพตามฤดูกาล;สถานภาพทางการสูญพันธุ์; พื้นที่ที่ปรากฏ; การกระจายพันธุ์แสดงระดับความสูง	

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	แผนที่ทางอากาศของเส้นสำรวจในป่าเบญจพรรณ (Mixed Deciduous Forest with Bamboo, BB/DF) แสดงจุดนับนก 15 จุด	6
ภาพที่ 2	แผนที่ทางอากาศของเส้นสำรวจในป่าดิบเขา-ระดับต่ำ (Lower Montane Forest, LMF) แสดงจุดนับนก 15 จุด	6

บทที่ 1

บทนำ

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และอุทยานแห่งชาติ เป็นพื้นที่ที่เก็บรักษาแหล่งพันธุกรรมของความหลากหลายทางชีวภาพที่สำคัญของโลก ซึ่งกระจายอยู่เป็นหย่อมๆ ทั่วประเทศไทย และในสภาพการณ์ปัจจุบันนี้ พื้นที่เหล่านี้มีโอกาสดูถูกรบกวนจากมนุษย์และภัยธรรมชาติ ในรูปของการท่องเที่ยวอย่างถูกกฎหมายและการลักลอบอย่างผิดกฎหมาย รวมถึงการจัดการการท่องเที่ยวที่ไม่เหมาะสม (Roe, Leader-Williams, and Dalal-Clayton, 1997); (Christ, Hillel, Matus, and Sweeting, 2003) เป็นเหตุให้เกิดผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพ ดังนั้นส่วนอุทยานฯ ต้องการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานการพัฒนาคุณภาพแหล่งท่องเที่ยวและกิจกรรมท่องเที่ยวในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติอย่างเป็นรูปธรรมที่ชัดเจนและเชื่อถือได้ เพื่อใช้เกณฑ์มาตรฐานดังกล่าวมากำหนดเป็นแนวทางพัฒนาการท่องเที่ยวให้บรรลุถึงมาตรฐานคุณภาพของการท่องเที่ยวที่ยั่งยืน (sustainable tourism) การจัดการ และการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายอย่างยั่งยืน นั้น ต้องมีฐานข้อมูลทรัพยากรความหลากหลายในพื้นที่หรือท้องถิ่นอย่างชัดเจนเป็นวิทยาศาสตร์ เพื่อการใช้ประโยชน์ที่เหมาะสม ต้องมีฐานข้อมูลความหลากหลายทางชนิดพันธุ์และหน้าที่ของชนิดพันธุ์ (บัญชีความหลากหลายทางชีวภาพ) ลักษณะและโครงสร้างทางสังคม และสถานภาพทางการสูญพันธุ์ของชนิดพันธุ์ในพื้นที่/ท้องถิ่น และหน้าที่ทางนิเวศของชนิดพันธุ์ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ได้มาจากการวิจัยทางนิเวศวิทยาและชีววิทยาทั้งสิ้น ข้อมูลเหล่านี้จะช่วยให้การกำหนดนโยบาย และมาตรการเอื้อต่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์แห่งนี้ มีข้อมูลเพียงการคาดประมาณจำนวนความหลากหลายทางชีวภาพเท่านั้น ยังไม่มีการทำวิจัยจนได้ฐานข้อมูลที่สมบูรณ์ ยกเว้นสิ่งมีชีวิตบางกลุ่ม เช่น กล้วยไม้ และพืชบางกลุ่ม ยังไม่มีข้อมูลที่ระบุชัดถึงชนิดพันธุ์ และโครงสร้างทางสังคมของนก แหล่งที่อยู่อาศัยของนกที่อาจเป็นกลุ่มเปราะบาง แต่พื้นที่นี้กลับมีการเข้าใช้ประโยชน์ทั้งถูกกฎหมายและผิดกฎหมายมานานแล้ว และมีการเข้าท่องเที่ยวตั้งแต่ครั้งก่อตั้งอุทยานฯ ในปี พ.ศ. 2526 และได้รับการประกาศในปี พ.ศ. 2530 (โครงการจัดการระบบฐานข้อมูลทรัพยากรในเขตอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. 2005; IUCN, 2015) ดังนั้น การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพเกี่ยวกับนก ที่ควรดำเนินการเป็นอันดับแรกคือ การศึกษาโครงสร้างสังคมของนก ได้แก่ ด้านความหลากหลายชนิด (species richness) ความหลากหลาย (Shannon-Weiner index, H') ชนิดพันธุ์ตามหน้าที่ (guild) และความชุกชุม (Abundance) ซึ่งอาจมีชนิดพันธุ์ที่ถูกคุกคาม หรือเปราะบาง (Vulnerable species) เพื่อให้ข้อมูลที่แสดงคุณภาพของแหล่งที่อยู่อาศัยของนก โดยผู้วิจัยคาดว่า จะพบโครงสร้างสังคมของนกที่มีความหลากหลายสูงในพื้นที่บริเวณทางเดินศึกษาธรรมชาติที่ชองเย็นมากกว่าพื้นที่ทำการอุทยานฯ ซึ่งผลงานวิจัยได้ให้ข้อมูลเชิงประจักษ์ในเรื่องนี้

การทำวิจัยเรื่องการศึกษาดัชนีทางสังคมของนกเพื่อการจัดการและการอนุรักษ์ในอุทยานแห่งชาติแม่
วังก์ จึงเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการจัดการและอนุรักษ์ โดยวัตถุประสงค์ด้านการอนุรักษ์จะบรรลุผล
ได้นั้น ต้องการความร่วมมือจากหลายฝ่าย อันได้แก่ผู้ดูแลพื้นที่ หน่วยงานต้นสังกัดคือ กรมอุทยานฯ
และผู้ปฏิบัติหน้าที่คือเจ้าหน้าที่ป่าไม้ นอกจากนี้ ผู้เข้าใช้ประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อม อันได้แก่
นักท่องเที่ยว และชุมชนที่อาศัยบริเวณโดยรอบหรือชุมชนผู้ต้องการทรัพยากรชีวภาพ ซึ่งทุกปัจจัยมี
ผลกระทบอย่างมากต่อความหลากหลายทางชีวภาพนี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ให้ข้อเสนอแนะไว้ในรายงานการ
วิจัยฉบับนี้แล้ว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อให้ได้ข้อมูลดัชนีโครงสร้างสังคมของนก บริเวณป่าเบญจพรรณ(เส้นทางไปโมโกจู) และป่าดิบเขา
ระดับต่ำบริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่วังก์ (ช่องเย็น)

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ได้รับการจัดตั้งขึ้นในปี พ.ศ. 2526 และได้รับการแต่งตั้งเป็นอุทยานแห่งชาติ ในปี พ.ศ. 2530 (โครงการจัดการระบบฐานข้อมูลทรัพยากรในเขตอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2005; IUCN, 2015) และได้รับความสนใจจากนักท่องเที่ยวนับเป็นอันดับต้นๆ โดยมียอดเขา “โมโกจู” เป็นพื้นที่ที่นักท่องเที่ยวจากทั่วประเทศนิยมเดินป่าเพื่อพิชิตยอดเขานั้น ปัจจุบัน อุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีนักท่องเที่ยวเข้าพื้นที่มากที่สุดในช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน ถึงกุมภาพันธ์) (ส่วนศึกษาและวิจัยอุทยานแห่งชาติ สำนักอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2555) ซึ่งมีกิจกรรมหลายประเภท เช่นการท่องเที่ยวนันทนาการ เดินป่า ศึกษาดูงาน ดอกไม้ ฝึกลูก และกิจกรรมนันทนาการอื่นๆ เช่น ปั่นจักรยาน เสือภูเขา (Bird Conservation Society of Thailand Records Committee, 2012) ดังนั้นมีโอกาสนักท่องเที่ยวนอกพื้นที่อนุรักษ์จะเกิดผลกระทบอย่างไม่อาจหลีกเลี่ยงได้ โดยจะส่งผลกระทบต่อดิน แหล่งน้ำ พืชพรรณ และการดำเนินชีวิตของสัตว์ป่าที่มีความอ่อนไหวสูง (Christ, Hillel, Matus, and Sweeting, 2003) และต่อโครงสร้างสังคมของนก ซึ่งมักพบว่าความหลากหลายของนกต่ำลงในบริเวณที่มีการท่องเที่ยวมาก ดังรายงานของ Auttpol, *et al.* (2008); Kangas, *et al.* (2010); Laiolo and Rolando (2004); Singh and Upadhyay (2011)

ความหลากหลายทางชีวภาพ (bird diversity) อันเป็นดัชนีหนึ่งของโครงสร้างสังคมของนก (bird community) จะแสดงถึงคุณภาพและสถานภาพของพื้นที่ ว่ามีความอุดมสมบูรณ์เพียงใด หรือมีการถูกรบกวนจนเป็นสภาพเมืองหรือไม่ เนื่องจากนกสามารถเคลื่อนที่ได้ มีปฏิกริยาตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงถิ่นอาศัยทุกประเภทอย่างรวดเร็ว นกจึงถูกใช้เป็นตัวชี้วัดที่มีชีวิตที่ใช้ตรวจสอบสุขภาพของสิ่งแวดล้อม (Butler, 2013); (Bombaci and Korb., 2010) และนักนิเวศวิทยาเสนอว่า ข้อมูลที่ต้องพิจารณา มิใช่เพียงรายชื่อชนิดของนก (species checklist) แต่ต้องพิจารณาร่วมกับ ความชุกชุมรายตัว (abundance) (IUCN, 2010)

การศึกษาโครงสร้างของนก เป็นงานวิจัยทางนิเวศวิทยาและปักษีวิทยา โดยทั่วไปมักเป็นการสำรวจบนเส้นสำรวจ (line transect) ที่มีความยาวเหมาะสม กล่าวคือ 50 เมตรขึ้นไป จนถึงประมาณ 4-5 กิโลเมตร ความกว้างของเส้นสำรวจขึ้นอยู่กับลักษณะของพื้นที่ป่า (โล่ง หรือ รกทึบ) โดยใช้ตั้งแต่ 25 - 50 เมตร และนิยมนับนกในรัศมีโดยรอบ (point-count method) ซึ่งรัศมีของแต่ละจุดนับ ต้องไม่ซ้อนทับกัน จำนวนครั้งที่สำรวจอาจห่างกัน 2-4 สัปดาห์ หรือประมาณ 1-3 ครั้งต่อเดือน การวิจัยครั้งนี้จะใช้รัศมีโดยรอบตั้งแต่ 25-50 เมตรขึ้นอยู่กับสภาพป่า โดยเดินไปข้างหน้าบนเส้นสำรวจ เพื่อลดการสำรวจซ้อนทับ การสำรวจบนเส้น

สำรวจโดยวิธี point-count เป็นวิธีมาตรฐานของการวิจัยความหลากหลายของนกหรือการศึกษาโครงสร้างทางสังคมของนกทั้งในและต่างประเทศ (ดังเช่น Bibby *et al.* (2000); Krebs (2001); Singh and Upadhyay (2011); Miller *et al.* (1998); Auttapol *et al.* (2008); Gan, *et al.* (2007), Kenneth *et al.* (2005); Bibby, John and Marsden.(1998))

โครงสร้างทางสังคมของนก นอกจากบัญชีรายชื่อ (species check list) และ ความหลากหลายชนิด (species richness) แล้ว ยังนิยมใช้สมการความหลากหลาย (diversity index) ในการศึกษาครั้งนี้จะบันทึกชนิดพันธุ์และจำนวนรายตัวของนกที่พบเห็นในพื้นที่ และใช้สมการของ Shannon-Wiener's Index ซึ่งเกี่ยวข้องกับสัดส่วนของจำนวนรายตัวต่อจำนวนรายตัวทั้งหมด (ระดับความชุกชุม, Abundance ของนก) ค่าความหลากหลายจึงเหมาะสมสำหรับการระบุคุณภาพของพื้นที่ และอธิบายควบคู่กับค่า Relative abundance ของชนิดพันธุ์

การใช้นกเป็นดัชนีชี้วัดสภาพแวดล้อมและระบบนิเวศ มักพิจารณาจากบทบาททางนิเวศของชนิดพันธุ์นกในท้องถิ่น ตามความสามารถในการแข่งขันและความเด่นของชนิดพันธุ์นกในสังคมถิ่นอาศัยร่วมกัน และวิเคราะห์ได้จากดัชนีความสำคัญทางนิเวศของชนิดพันธุ์นก (Important Value Index, IVI) ซึ่งค่านี้ได้จากผลรวมของค่าระดับความชุกชุมตามสถานภาพการปรากฏ (abundance) กับค่าความถี่ relative frequency

ระดับความชุกชุมฯ ของนกใช้วิธีตาม Bull (1974) ซึ่งใช้ข้อมูลจำนวนตัวที่ปรากฏในหนึ่งวัน โดยแบ่งเป็น 6 ระดับ ดังนี้ ระดับที่ 1 ชุกชุมมาก (very abundant), ระดับที่ 2 ชุกชุม (abundant) ระดับที่ 3 ธรรมดามาก (very common), ระดับที่ 4 ธรรมดา (common frequent), ระดับที่ 5 ธรรมดา แต่ค่อนข้างพบไม่บ่อย (fairly common) และ ระดับที่ 6 ไม่ธรรมดา (uncommon) โดยการปรากฏตัวของนกทั้ง 6 ระดับ เรียงดังนี้ ระดับที่ 1 มากกว่า 1000 ตัว, ระดับที่ 2, 200-1000 ตัว ระดับที่ 3 51-200 ตัว, ระดับที่ 4 21-509 ตัว, ระดับที่ 5 7-20 ตัว และระดับที่ 6 1-6 ตัว

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 พื้นที่ในการวิจัย คืออุทยานแห่งชาติแม่วงก์

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ พิกัด 16.0397° N, 99.2344° E ครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 894 ตารางกิโลเมตร มีอาณาเขตติดต่อกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง-ทุ่งใหญ่นเรศวร และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าอัมผาง โดยพื้นที่ทำวิจัย ป่าดิบเขาระดับต่ำ คือบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติแม่วงก์ ซึ่งเคยเป็นเส้นทางเพื่อความมั่นคงที่เชื่อมติดต่อกันระหว่างแม่วงก์และอัมผาง แต่ได้ยกเลิกการใช้งานไปแล้วประมาณ 50 ปีที่ผ่านมา จึงทำให้ระบบนิเวศฟื้นคืนความหลากหลายและได้รับความคุ้มครองจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งมีความสูงที่สุด 1,340 เมตร และความสูงเฉลี่ยของพื้นที่วิจัย ระหว่าง 1,090-1,172 เมตร และพื้นที่วิจัยอีกแห่งหนึ่งคือ ป่าเบญจพรรณ ซึ่งเป็นเส้นทางไปหน่วยพิทักษ์ป่าแม่กระสา ซึ่งจะเดินเท้าต่อไปยัง “โมโกจู” อันเป็นเส้นทางเดินป่าที่มีชื่อเสียงระดับประเทศของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

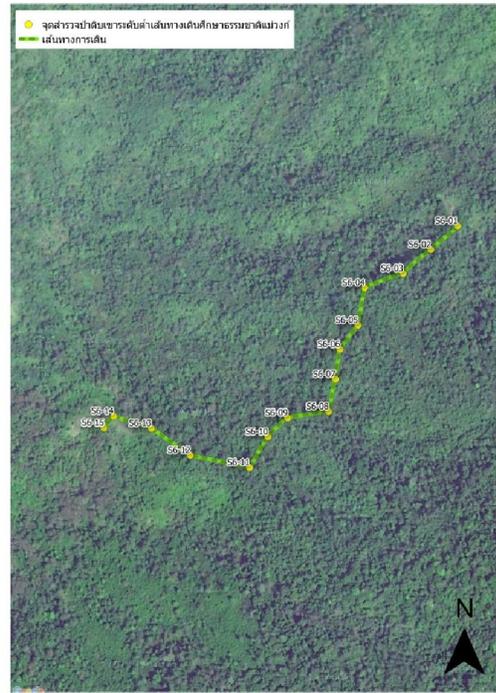
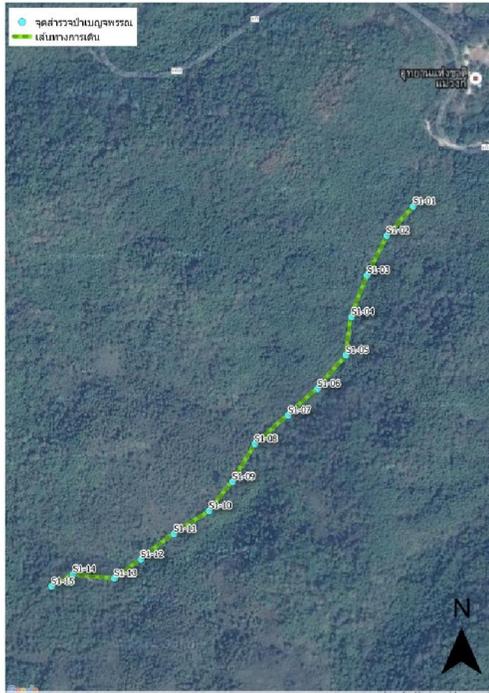
ทำการเก็บข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ดัชนีทางสังคมในสองพื้นที่ โดยแบ่งเป็น

ก. พื้นที่บริเวณที่ทำการ (Head Quarter) อันเป็นจุดที่มีกิจกรรมการท่องเที่ยวของผู้คนเข้ามาในทุุกฤดูกาล เป็นจุดสำหรับกางเต็นท์ในฤดูหนาวและช่วงเทศกาลสงกรานต์ และกิจกรรมจักรยานเสือภูเขา บริเวณนี้จึงมีวิวทิวทัศน์พาหนะ และนักท่องเที่ยวจำนวนมาก ป่าโดยรอบเป็นป่าเบญจพรรณผสมป่าไผ่ ทำการเก็บข้อมูลในเส้นทางเข้าไปหน่วยพิทักษ์ป่าแม่กระสา เพื่อพิชิตยอดเขาโมโกจู โดยวางจุดนับนกเริ่มต้น (point 1-1) ห่างจากปากทางเส้นทางนี้ประมาณ 100 เมตร นับนกบนเส้นทางถนนดินผ่านเข้าไปในป่าเป็นระยะทาง 1,500 เมตร พื้นที่ป่ารอบเส้นทางโดยทั่วไปเป็นป่าเบญจพรรณที่ เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติผสมป่าปลูกซึ่งเป็นพื้นที่ฟื้นฟูป่า เนื่องจากเป็นพื้นที่ต่ำ มีไฟป่าเข้าทุกปีจึงทำให้ไม้ยืนต้นขึ้นกระจายกว้างๆ ไม่หนาแน่นมากนัก ไม้เด่นที่พบ คือ สัก (*Tectona grandis*) ประดู่ป่า (*Pterocarpus macrocarpus*) แดง (*Xylia xylocarpa*) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบไม้วงศ์ยาง เช่น ยางนา (*Dipterocarpus alatus*) ยางแดง (*Dipterocarpus turbinatus*) ซึ่งมีขนาดใหญ่โดดเด่นขึ้นกระจายห่างๆอีกด้วย ไม้ชั้นรองลงมาค่อนข้างกระจายตัวน้อย ไม่หนาแน่นและโดดเด่นมากนัก ทำให้แสงแดดส่องถึงพื้นล่างที่เป็นพื้นที่โล่งได้มาก จึงมักพบหญ้ากระจายเป็นไม้คลุมดินปกคลุมพื้นที่เป็นส่วนใหญ่ บางพื้นที่มีสภาพเป็นป่าไผ่ธรรมชาติที่สมบูรณ์ โดยเฉพาะบริเวณใกล้ลำธารขนาดเล็กในหุบซึ่งไหลลาะเกือบตลอดแนวสำรวจ แต่น้ำจะแห้งในช่วงฤดูแล้ง มีกล้วยป่ากระจายทั่วไป และบางส่วนของเส้นทางเป็นป่าเต็งรัง มีต้นไม้ที่ให้ผลไม้ป่า ซึ่งพบสังคมไม้เป็นพืชเด่น เส้นทางสำรวจ เป็นถนนดินลูกรังผ่านเข้าไปในผืนป่า ซึ่งเป็นเส้นทางไปหน่วยพิทักษ์ป่าแม่กระสา พื้นที่ได้รับการปรับเปลี่ยนเป็นแปลงปลูกไม้สักและมีการปรับผิวถนนและความกว้างของถนนใน พ.ศ. 2557-2558 การวิจัยเรียกชื่อป่านี้ว่า ป่าผสมผลัดใบที่มีไผ่ หรือป่าเบญจพรรณ (Mixed deciduous Forest with Bamboo,

BB/DF) พิกัด 16°02' ถึง 16°01' N และ 99°13' ถึง 99°13' E พื้นที่วิจัยนี้มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเล ประมาณ 300-377 เมตร (ภาพที่ 1)

ข. พื้นที่ในการท่องเที่ยวทางนิเวศ คือ บริเวณ “ช่องเย็น” ห่างจากที่ทำการฯ ประมาณ 30 กิโลเมตร ซึ่งเป็นบริเวณที่มีป่าอุดมสมบูรณ์มาก และใกล้พื้นที่มรดกทางธรรมชาติของโลก (เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง-อุ้มผาง) เป็นบริเวณที่คนนิยมขึ้นไปค้างแรมสัมผัสความหนาวเย็น ดูนก ชมธรรมชาติ และถ่ายรูปโดยใช้เหยื่อล่อมากที่สุด บริเวณที่ทำการเก็บข้อมูลคือ “เส้นทางศึกษาธรรมชาติแม่วงก์” ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ห้ามยานพาหนะเข้าไป อนุญาตให้เดินเท้าศึกษาธรรมชาติ

สภาพป่าโดยทั่วไปเป็นไม้ยืนต้นใหญ่ขึ้นกระจายหนาแน่น มีกล้วยป่า พืชชิงช้า หัสคำ เฟิร์น ดินตุ๊กแก มอส ขึ้นบนผิวดินและในหุบเขาและข้างทางตลอดเส้นทางที่สำรวจ ไม้ยืนต้นเด่น ได้แก่ ยมหอม (*Toona ciliata*) กำลังเสือโคร่ง (*Betula alnoides*) ลำพูป่า (*Duabanga grandiflora*) ทะโล้ (*Schima wallichii*) ค่าหุด (*Engelhardtia spicata*) ก่อหุยม (*Castanopsis argyrophylla*) เป็นต้น โดยเรือนยอดเจริญแผ่ชนกันทำให้แสงส่องลงสู่พื้นล่างได้น้อย จึงทำให้มีไม้ยืนต้นขนาดกลางและขนาดเล็กไม่มากนัก ส่วนใหญ่เป็นไม้พุ่มและไม้คลุมดิน เช่น ห้อมช้าง (*Phlogacanthus curviflorus*) ไช้ปลา (*Debregeasia longifolia*) สาบหมา (*Ageratina adenophora*) เทียนดอย (*Impatiens violaeiflora*) เป็นต้น พืชคลุมดินนี้ มักถูกตัดฟันโดยเจ้าหน้าที่เป็นระยะ เพื่ออำนวยความสะดวกให้แก่นักท่องเที่ยวเดินเท้าเข้าชมเส้นทาง การวิจัยได้กำหนดจุดนับนกที่ 1 ห่างจากต้นทาง (บริเวณลานกางเต็นท์ช่องเย็น) เป็นระยะห่าง 1 กิโลเมตร ซึ่งในระยะห้าร้อยเมตรสุดท้ายของพื้นที่สำรวจเป็นป่าหญ้า และมีความแห้งแล้ง มีต้นไม้ใหญ่น้อยมาก ความสูงของพื้นที่ที่สำรวจจากจุดที่ 1 ถึงจุดที่ 15 อยู่ระหว่าง 1,172 เมตรและลาดเอียงลงถึง 1,090 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ระบุชนิดของป่าเป็น ป่าดิบเขาระดับต่ำ (Hill Evergreen Forest) หรือ Lower Montane Forest, LMF [6] พิกัด 99°06' 01.2" ถึง 99°05' 01.2" E และ 16°05' 43.4" ถึง 16°05' 27.1" N (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 แผนที่ทางอากาศของเส้นสำรวจในป่าเบญจพรรณ (Mixed Deciduous Forest with Bamboo, BB/DF) แสดงจุดนับนก 15 จุด

ภาพที่ 2 แผนที่ทางอากาศของเส้นสำรวจในป่าดิบเขา-ระดับต่ำ (Lower Montane Forest, LMF) แสดงจุดนับนก 15 จุด

3.2 วิธีการการเก็บข้อมูลภาคสนามเรื่องโครงสร้างทางสังคมของนก

การเก็บข้อมูลโครงสร้างสังคมของนก ดำเนินการสำรวจโดยวิธี point count (50 M- fixed width radius) บนเส้นสำรวจ สองบริเวณคือ บริเวณป่าเบญจพรรณ (เส้นทางไปโมโกจู) และทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่จังก์ (ช่องเย็น)

ทำการเก็บข้อมูลเดือนละ 1 ครั้ง ทำการสำรวจในช่วงเวลาเช้า 06.00-12.00 น. และช่วงบ่าย 13.00-16.00 น. ด้วยนักวิจัย 2 คน และเพื่อลดผลกระทบจากการนับซ้ำซ้อนและชายขอบซ้อนทับกัน แต่ครั้งบันทึกข้อมูลจำนวนตัวและชนิดพันธุ์ของนกด้วยวิธี 25-50-m-fixed radius ตลอดเส้นสำรวจ เป็นจำนวน 15 จุด (points) รวมเส้นสำรวจจะประมาณ 1,500 เมตร และประยุกต์ตามวิธีของ Krebs (2001); Bibby. et al, (2000) ; Butler, (2013) ซึ่งไม่รวมนกกลางคืนและประเมินว่า 92 % ของนกที่ตรวจพบไม่อยู่นอกหรือเกินรัศมี 50 เมตรตามวิธีของ Bombaci and Korb (2010) สำหรับนกที่ได้ยินเสียงร้องและเห็นบินผ่านที่ไม่เกินรัศมี 50 เมตร ถ้าจำแนกได้ถูกต้องจะบันทึกด้วย

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลโครงสร้างทางสังคมของนก

ข้อมูลภาคสนาม จะนำมาวิเคราะห์ดัชนีทางสังคม ดังนี้

ก. species richness แสดงข้อมูลตามหลักอนุกรมวิธาน

ข. ดัชนี heterogeneity index, Shannon- Weiner index , $H' = \sum_{i=1}^n (P_i)(\ln P_i)$

(ซึ่งใช้ ln และมีหน่วยของ H' เป็น nits แต่รายงานวิจัยส่วนมากไม่แสดงหน่วย)

ค. ความชุกชุมสัมพัทธ์ (relative abundance) ตาม Bull (1974)

ซึ่งใช้ข้อมูลจำนวนตัวที่ปรากฏในหนึ่งวัน โดยแบ่งเป็น 6 ระดับ และแต่ละระดับคาดประมาณการปรากฏเป็นจำนวนตัว ดังต่อไปนี้

ระดับที่ 1 ชุกชุมมาก (very abundant; VA) มากกว่า 1000 ตัว

ระดับที่ 2 ชุกชุม (abundant; A) 200-1000 ตัว

ระดับที่ 3 ธรรมดา (very common; VC), 51-200 ตัว

ระดับที่ 4 ธรรมดา (common frequent; CF), 21-50 ตัว

ระดับที่ 5 ค่อนข้างธรรมดา พบไม่บ่อย (fairly common; FC) 7-20 ตัว

ระดับที่ 6 ไม่ธรรมดา (uncommon; UC) 1-6 ตัว

ง. Index of dominance of species i, $C = \sum_{i=1}^n \left(\frac{n_i}{N}\right)^2$

เมื่อ n_i = จำนวนตัวของนกสปีชีส์ i และ N = จำนวนตัวของนกทุกสปีชีส์

บทที่ 4

ผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

ดัชนีทางสังคมของนกในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ได้แก่ ดัชนีความหลากหลาย heterogeneity, H' บัญชีรายชื่อตามหลักอนุกรมวิธาน ดัชนีความเหมือน ดัชนีความเด่น (index of dominance) ระดับความชุกชุม abundance โดยวิเคราะห์จากจำนวนตัวของชนิดพันธุ์ ซึ่งบันทึกจากภาคสนามเป็นเวลา 1 ปี (ระหว่างเดือนตุลาคม 2557 ถึงเดือนกันยายน 2558) มีผลการวิจัยดังนี้

- ก. ค่าความหลากหลาย (H') ในการเก็บข้อมูลภาคสนามแบบ pointing count จำนวน 15 จุดนับนก (point-counts) ในสองพื้นที่ พบว่านกที่ปรากฏในแต่ละจุดนับนก จะมีจำนวนไม่เกิน 10 ชนิดพันธุ์ จึงทำให้ค่า H' มีค่าต่ำมาก กล่าวคือเส้นทางไปโมโกจู มีค่าอยู่ระหว่าง 0.146-0.842 nits และเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติอยู่ระหว่าง 0.208-0.745 nits (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนมาก จะรายงานค่าความหลากหลายของนกในพื้นที่ที่สำรวจที่ได้จากวิธีวิจัยแบบ point count ร่วมกับ line transect ดังเช่น Auttpol *et al* (2008) ซึ่งรายงาน H' ของนกในอุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง ในป่าผสมผลัดใบ เท่ากับ 3.9507 และในป่าผลัดใบและไม่ผลัดใบเท่ากับ 3.6387 และ 3.6025 ตามลำดับ

สำหรับการวิจัยครั้งนี้ เป็นการเก็บข้อมูลภาคสนามแบบ pointing count วิธีเดียว ซึ่งให้ความหลากหลายเป็น point count ต่ำมาก ดังนั้นจึงทำการรวมรายตัวและวิเคราะห์ความหลากหลายเฉลี่ยเป็นรายเดือน ค่าความหลากหลายดังตารางที่ 2 พบว่า นกในป่าเบญจพรรณบริเวณทางไปโมโกจู มีค่า H' อยู่ระหว่าง 2.497 -2.904 nits และป่าเส้นทางศึกษาธรรมชาติ อยู่ระหว่าง 1.577-2.896 nits ค่าความหลากหลายรวมของรายเดือนต่างๆ อยู่ในระดับปกติของป่าธรรมชาติทั่วไป โดยที่รายเดือนนั้นพบนกปรากฏทั้งหมดมากกว่า 10 ชนิดพันธุ์ขึ้นไป ดังแสดงจำนวนรายชนิดพันธุ์รวม (species checklist) รายเดือนไว้ในตารางที่ 2

ค่าความหลากหลาย สามารถแสดงได้ทั้งบัญชีรายชื่อ (species check list) และค่าดัชนีความหลากหลาย ซึ่งมีหลายสมการ ได้แก่ heterogeneity , H' ; Simpson index, D หรือสมการอื่นๆ สำหรับบัญชีรายชื่อ จะอธิบายได้ในเบื้องต้นถึงความหลากหลายของนก โดยแปรความหมายจากตัวเลขมีค่าแสดงถึง จำนวนชนิดพันธุ์ที่ปรากฏในพื้นที่มาก แสดงถึงความหลากหลาย ซึ่งในป่าเบญจพรรณ บัญชีรายชื่อชนิดพันธุ์เฉลี่ยรายเดือน เท่ากับ 21.92 ชนิด ขณะที่ป่าดิบเขาระดับต่ำ มีค่าเฉลี่ยชนิดพันธุ์เท่ากับ 22.75 ชนิดพันธุ์ พื้นที่ป่าดิบเขาหรือเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ มีความหลากหลายของนกมากกว่า เป็นไปตามที่คาดไว้ แต่เมื่อพิจารณาที่ค่า ความหลากหลาย H' พบว่าป่าเบญจพรรณกลับมีค่าเฉลี่ยสูงกว่า พื้นที่เส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ ซึ่งไม่เป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ ทั้งนี้เป็นเพราะค่า H' เป็นค่าที่มีความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนชนิดพันธุ์ กับสัดส่วนความชุกชุมของนกรายชนิดพันธุ์กับนกทั้งหมด (Krebs, 2001) หมายถึง มีการนำความชุกชุมของนกมาพิจารณาด้วย และมีอิทธิพลต่อค่าความหลากหลายนี้ ดังจะยกตัวอย่าง ข้อมูลของเดือนที่มีบัญชีรายชื่อเท่ากัน

เช่นเดือน ตุลาคม มีจำนวนชนิดพันธุ์ เท่ากับ 23 ชนิดเท่ากัน แต่ค่าความหลากหลายเฉลี่ย กลับต่างกัน เนื่องจากอิทธิพลของความสม่ำเสมอในความชุกชุมนั่นเอง จึงจะเห็นว่า ค่าความหลากหลายของนกในป่าเบญจพรรณเท่ากับ 2.871 nits และในป่าดิบเขาระดับต่ำเท่ากับ 2.676 nits ทั้งที่มีจำนวนชนิดพันธุ์เท่ากัน อิทธิพลของความชุกชุมรายตัวของนกนี้เองที่มีผลต่อความหลากหลาย (H')

ป่าดิบเขาระดับต่ำจะมีจำนวนชนิดพันธุ์เฉลี่ย มากกว่า แต่ความสม่ำเสมอในความชุกชุมต่ำกว่า เป็นเพราะว่า มีนกบางชนิดพันธุ์มีจำนวนตัวในแต่ละเดือนสูงมาก และปรากฏรวมฝูงกันกินน้ำหวาน ซึ่งมีต้นไม้ที่ให้น้ำหวานในเส้นทางนั้นพอดี ทำให้ค่าของ H' ต่ำลง จึงทำให้เดือนที่มีนกมากชนิด และมีความสม่ำเสมอในความชุกชุมสูง จะมีดัชนี H' สูงกว่าเดือนที่ความชุกชุมไม่สม่ำเสมอ ดังเช่นในเดือนกุมภาพันธ์ ที่มีค่า H' เท่ากับ 1.577 nits ทั้งที่มีความหลากหลายชนิดนกถึง 30 ชนิดพันธุ์

นกที่มีพฤติกรรมรวมฝูงกันนี้ พบมากในเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติช่องเย็น มากกว่าป่าเบญจพรรณ ได้แก่ นกภูหงอนหัวลาย แวนตาขาว นกกระจี๊ด นกปรอดชนิดต่างๆ นกแซงแซวหงอนขน แตนนกชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่แล้ว มีความสม่ำเสมอในความชุกชุม โดยจำนวนตัวต่ำ 1-5 ตัวเป็นส่วนใหญ่ และไม่มีพฤติกรรมรวมฝูง นกที่พบในพื้นที่ใดๆ มักจะเป็นนกประจำถิ่น และเมื่อถึงฤดูหนาว จะมีนกอพยพเข้ามาในพื้นที่ด้วย ดังนั้น โดยทั่วไปแล้ว ในสองพื้นที่นี้ ควรจะมีค่า H' สูงขึ้นในช่วงฤดูหนาว เนื่องจากมีชนิดพันธุ์ของนกอพยพ เช่นเดือน มกราคม – กุมภาพันธ์ มีนกอพยพเข้ามาในพื้นที่มาก ขณะเดียวกัน มีบางชนิดพันธุ์รวมฝูงกันหากินเนื่องจากปริมาณของอาหารที่มีมากในช่วงนั้น ทำให้ค่าความหลากหลายต่ำกว่าเดือนอื่นๆ

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความหลากหลายใน 15 point counts รายเดือน ของป่าสองประเภทคือป่าเบญจพรรณ (เส้นทางไปโมโกจู) และป่าดิบเขาระดับต่ำ (เส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ช่องเย็น))

H'	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.57	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
	57	57		58	58	58	58	58	58	58	58	58
เส้นทางเบญจพรรณ(ทางไปโมโกจู)	0.522	0.601	0.360	0.282	0.465	0.461	0.146	0.598	0.820	0.842	0.693	0.793
เส้นทางศึกษาธรรมชาติแม่วงก์ (ช่องเย็น)	0.330	0.345	0.601	0.662	0.745	0.491	0.399	0.269	0.448	0.570	0.434	0.208

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความหลากหลายรายเดือน (H') และ species check list ในป่าเบญจพรรณ (ทางไปโมโกจู) และป่าดิบเขาระดับต่ำ (ทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่วงก์ ช่องเย็น)

เดือน	ความหลากหลาย heterogeneity , H'		Species check list	
	พื้นที่ 1 ป่าเบญจพรรณ	พื้นที่ 2 ป่าดิบเขาระดับต่ำ	พื้นที่ 1 ป่าเบญจพรรณ	พื้นที่ 2 ป่าดิบเขาระดับต่ำ
ต.ค.57	2.871	2.676	23	23
พ.ย.57	2.888	2.370	28	16
ธ.ค.57	2.479	2.727	16	23
ม.ค.58	2.687	2.665	20	26
ก.พ.58	2.382	1.577	16	30
มี.ค.58	2.883	2.663	22	23
เม.ย.58	2.456	2.795	14	23
พ.ค.58	2.850	2.495	27	14
มิ.ย.58	2.751	2.646	26	29
ก.ค.58	2.904	2.896	28	24
ส.ค.58	2.659	2.722	22	22
ก.ย.58	2.716	2.399	21	20
เฉลี่ย	2.710	2.553	22.75	21.95

ค่าความหลากหลาย H' มักมีค่าระหว่าง 0-5 (Krebs,2001) เป็นค่าที่อธิบายหรือตีความถึงความแตกต่างของสปีชีส์ในสังคมนั้น ค่า H' สูง แสดงถึงสังคมนั้นมีแตกต่างทางชนิดพันธุ์สูง หมายถึงการมีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์สูงนั่นเอง จึงสามารถอธิบายถึงความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่นั่นเอง และสามารถเปรียบเทียบสังคมต่างๆได้ ถึงความอุดมสมบูรณ์นั้น ในที่นี้ทำการศึกษาสองพื้นที่ค่าความหลากหลายเฉลี่ย ไม่

แตกต่างกัน จำนวนชนิดพันธุ์เฉลี่ย ของค่าความมากชนิด ไม่แตกต่างกันด้วย แต่เมื่อพิจารณาที่รายชื่อชนิดพันธุ์ จะพบว่า นกสองพื้นที่นี้ มีรายงานการปรากฏแตกต่างกัน กล่าวคือ นกมีถิ่นอาศัยที่แตกต่างกัน

สองพื้นที่วิจัยนี้ ป่าเบญจพรรณและป่าดิบเขาในระดับต่ำ มีกลุ่มนกแตกต่างกัน กล่าวคือ เป็นนกกลุ่มที่ตั้งจะอธิบายบัญชีรายชื่อ และด้านความเหมือนของสังคมต่อไป

ข.บัญชีรายชื่อ แสดงข้อมูลทางอนุกรมวิธานของนกในพื้นที่สำรวจสองพื้นที่

ความหลากหลายชนิดของนกที่ได้จากการสำรวจในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ระหว่างเดือนตุลาคม 2557 ถึงเดือน กันยายน 2558 พบความหลากหลายชนิดเท่ากับ 147 ชนิดพันธุ์ ถูกจัดใน 12 อันดับ 45 วงศ์ (ตารางผนวก1) นกทั้งหมดที่ปรากฏ เป็นนกประจำถิ่น 113 ชนิดพันธุ์ (76.87%) เป็นนกอพยพ และประจำถิ่นในบางพื้นที่ 19 ชนิดพันธุ์ (12.92%) และเป็นนกอพยพแต่ไม่สร้างรัง 15 ชนิดพันธุ์ (10.20%) นกทั้งหมดนี้ 146 ชนิดพันธุ์ มีสถานภาพด้านการถูกคุกคามในระดับ “ไม่น่าเป็นห่วง (Least concern, LC)” และที่เหลือจำนวน 1 ชนิดพันธุ์เป็นชนิดที่เผชิญกับความเสี่ยสูงต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ (Vulnerable , VU) คือ นกหัวขวานใหญ่สีเทา (*Mulleripicus pulverulentus*) ซึ่งพบในป่าเบญจพรรณ

1) ป่าเบญจพรรณ ทางไปโมโกจู การปรากฏทางชนิดพันธุ์ของนก มีความหลากหลายชนิดเท่ากับ 92 ชนิดพันธุ์ ถูกจัดอยู่ใน 11 อันดับ 43 วงศ์ และสำหรับป่าดิบเขาในระดับต่ำ บริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่วงก์ (ช่องเย็น) มีความหลากหลายชนิดของนกเท่ากับ 86 ชนิดพันธุ์ ถูกจัดอยู่ใน 12 อันดับ 34 วงศ์ ความแตกต่างของชนิดพันธุ์ที่ปรากฏในพื้นที่ป่าสองประเภทที่แตกต่างกันนี้ อาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากการมีความแตกต่างของสภาพทางภูมิศาสตร์ตามระดับความสูง จึงทำให้มีองค์ประกอบและโครงสร้างของป่า ไม้เรือนยอด ไม้พื้นล่าง ปริมาณแสงส่องกระทบ สภาพดิน/ความชื้นในดินและในบรรยากาศ ปริมาณน้ำฝน และอุณหภูมิ แตกต่างกัน ปัจจัยทางกายภาพและผลผลิตจากป่าเหล่านี้แปรผันไปตามความสูงของพื้นที่ (Handbook of The Bird of the World alive. nd) ซึ่งความสูงของพื้นที่มีอิทธิพลต่อเงื่อนไขและปัจจัยทางกายภาพ รวมถึงทรัพยากรสำคัญต่อการหากินและสืบพันธุ์ของนก ซึ่งนำไปสู่รูปแบบโครงสร้างทางสังคมของนก (Able and Noon,1976) การปรากฏของนกในพื้นที่จึงมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของพืชพรรณ (Roth,1976) นอกจากนี้ ปัจจัยทางกายภาพเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญสำหรับนกบางชนิดในพื้นที่สูง มีรายงานว่า ความสูงของพื้นที่เพิ่มขึ้น ทรัพยากรสำคัญและจำเป็นต่อนกยิ่งจำกัด ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของโครงสร้างของผืนป่าพื้นที่ผลผลิต ชนิดพันธุ์ที่เป็นองค์ประกอบของพืชพรรณ การรบกวน รูปแบบและปฏิสัมพันธ์ทางชีวภาพ (Bibby, et al, 2002)

นกที่พบในป่าเบญจพรรณ ความสูงในระดับ 300-400 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ส่วนใหญ่มีสถานภาพการถูกคุกคามในระดับ “ไม่น่าเป็นห่วง Least Concern, LC” ซึ่งหมายถึง เป็นชนิดพันธุ์ที่มีจำนวนประชากรมาก ไม่น่าเป็นห่วงว่าจะสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ นกส่วนมากเป็นกลุ่มที่กระจายพันธุ์ตามป่าหญ้า ป่าละเมาะ ป่าเบญจพรรณ ที่มีความสูงต่ำ 300 เมตรจนถึง 500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ในการวิจัยครั้งนี้

พบนกที่มีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ในระดับ “Vulnerable ,VU” คือมีความเสี่ยงสูงต่อการถูกคุกคามจนสูญพันธุ์ในธรรมชาติ หนึ่งชนิดคือ นกหัวขวานใหญ่สีเทา (Great Slaty Woodpecker, *M. pulverulentus*) (จารุจินต์และคณะ, 2550; IUCN,2015; Winkler,Christie, and Kirwan, 2013). จากการวิจัยพบนกชนิดนี้หากินและแสดงพฤติกรรมการสอยลูกให้หากินและฝึกบินด้วย จึงเป็นข้อมูลเพิ่มเติมว่า พื้นที่ป่าเบญจพรรณแห่งนี้มีความสำคัญ และต้องได้รับการคุ้มครอง เนื่องจากเป็นแหล่งอาศัยที่สำคัญของนกที่มีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ชนิดนี้ รวมถึงนกชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานด้วย นอกจากนี้ ผืนป่าแม่วงก์ เป็นส่วนหนึ่งของผืนป่าตะวันตก อันเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่าที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศอีกมากมาย โดยมีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าพื้นที่แห่งนี้เป็นส่วนหนึ่งของอาณาเขตพื้นที่หากินของเสือโคร่งและสัตว์ป่าที่สำคัญที่เป็นอาหารของมัน (Birdlife international,2015;IUCN,2015) ผืนป่าแห่งนี้จึงควรได้รับการคุ้มครองให้มีสภาพเป็นป่าผืนใหญ่อย่างที่เป็นอยู่ตลอดไป

2) เส้นสำรวจทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่วงก์ (ช่องเย็น) พบนกจำนวน 86 ชนิดพันธุ์ เป็นนกที่มีการกระจายพันธุ์ในป่าดิบเขา ระดับความสูงมากกว่า 1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลขึ้นไป และป่าเบญจพรรณทั่วไป เป็นนกที่มีความอ่อนไหวต่อการถูกรบกวนเป็นส่วนใหญ่ พบจำนวนประชากรไม่มากนัก พบหากินแต่ละครั้งไม่เกิน 5 ตัว เป็นส่วนมาก ยกเว้นในฤดูผสมพันธุ์ที่มีการรวมฝูงกัน

พื้นที่ป่าดิบเขาระดับต่ำ บริเวณช่องเย็น เป็นพื้นที่ที่มีรายงานการสร้างรังของนกที่มีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ระดับ VU ด้วย คือ นกเงือกคอแดง (Rufous-necked hornbill, Rufous-cheeked hornbill; *Aceros nipalensis*) และเป็นแหล่งสร้างรังของนกในป่าดิบเขาระดับสูงอีกหลายชนิด ดังเช่นนกพญาปากกว้างหางยาว Long -tail Broadbill *Psarisomus dalhousiae* นกมูม (Mountain Imperial Pigeon *Ducula badia*)

ค. ดัชนีความเหมือน Jaccard index จากการวิเคราะห์ความเหมือนของนกในสองพื้นที่ พบว่านกทั้งสองพื้นที่มีความเหมือนกันต่ำ ชนิดพันธุ์ของนกในป่าเบญจพรรณและป่าดิบเขาระดับต่ำ มีความต่างกันประมาณ ร้อยละ 80 (Jaccard similarity coefficient เท่ากับ 21.08 %) โดยนกที่ปรากฏเฉพาะป่าผสมผัดใบ/ป่าเบญจพรรณมีจำนวน 61 ชนิดพันธุ์ และนกที่ปรากฏเฉพาะในป่าดิบเขาระดับต่ำมีจำนวน 55 ชนิดพันธุ์ และนกที่พบกระจายพันธุ์ทั้งสองพื้นที่ จำนวน 31 ชนิดพันธุ์ ความเหมือนของนกที่ปรากฏต่ำ แสดงให้เห็นถึงความเป็นเอกลักษณ์ของพื้นที่ทั้งสอง ซึ่งมีความแตกต่างกันในลักษณะของป่า และตามความสูง โดยเส้นทางไปโมโกจูเป็นป่าเบญจพรรณที่มีการปลูกต้นไม้เพิ่มเติม ส่วนใหญ่เป็นป่าเบญจพรรณผสมป่าไผ่ดั้งเดิม มีป่าเต็งรังในบางส่วน ป่าทั้งหมดผ่านการตัดไม้ใหญ่ออกไปแล้ว สำหรับป่าบนเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติเป็นป่าในพื้นที่สูงที่มีระดับต่ำประมาณ 1,340 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล และความสูงแปรผันไปตามเส้นทาง ตั้งแต่ 1,172 เมตรถึงระดับประมาณ 1,090 เมตร อย่างไรก็ตาม ตอนต้นของเส้นทางนี้ เป็นป่าสูงระดับต่ำ มีไม้พุ่มล้มลุกกระจายอยู่ในเส้นทางเป็นแหล่งหากินของนกที่อาศัยหรือหากินตามพื้นดิน เช่นนกกระทา นกแว่นสีเทา นกจิ้งจกชนิดต่างๆ นกแก้วแล้วชนิดต่างๆ เป็นต้น ไม้ล้มลุกไม้พุ่มนี้ถูกรบกวนด้วยการตัดฟันเป็นระยะ เพื่อการจัดการให้มีความสะดวกในการเดินเท้าเข้าศึกษาธรรมชาติของนักท่องเที่ยวนั่นเอง ซึ่งการรบกวนนี้อาจมีผลกระทบต่อ การดำรงชีวิตของนกที่ต้องการพื้นที่เฉพาะแบบนี้ เนื่องจากพื้นที่เหล่านี้เป็นที่อยู่อาศัย หลบซ่อนตัวของสัตว์-

แมลง-หนอน ฯลฯ ที่เป็นอาหารของนกกลุ่มซีฟฟิสัยแบบ Terrestrial Insectivore-Frugivore (GIF)/ Terrestrial Insectivore (TI) และ Terrestrial Insectivore-Faunivore (TIV) ซึ่งหมายถึงพวกที่หากินตามพื้นล่างจนถึงกลางเรือนพุ่ม (low to mid understory) และนกกลุ่มที่มีความเฉพาะเจาะจงมากในการเลือกกินอาหาร จะได้รับผลกระทบมาก เนื่องจากพวกนี้จะหากินสัตว์ขนาดเล็ก พวกจิ้งเหลน หอยทาก ตะขาบ แมงป่อง งู หนอน แมลง ไข่เดือนดิน ฯลฯ ซึ่งมีแหล่งหลบซ่อนตัวในไม้พุ่ม ในซากใบไม้ ไม้ผุบนพื้นดิน การรบกวนถิ่นอาศัยอยู่เสมอจะมีผลต่อปริมาณอาหารเหล่านั้น และส่งผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตของนกที่มีซีฟฟิสัยดังกล่าวได้ (เช่นรายงานการรบกวนต่อนกพวกนี้ในป่าที่มีการทำไม้ โดย Lambert and Collar, 2002) ดังนั้นควรมีการพิจารณาบริหารจัดการพื้นที่ป่าดิบเขาในระดับต่ำอย่างมีประสิทธิภาพ มากกว่าที่เป็นอยู่ และควรมีการวิจัยเรื่องนี้ต่อไป

ง. ความชุกชุมสัมพัทธ์ (relative abundance) การวิจัยครั้งนี้ประยุกต์สถานภาพความชุกชุมตาม Bull (1974) ซึ่งใช้ข้อมูลจำนวนตัวที่ปรากฏในหนึ่งวัน และแบ่งเป็น 6 ระดับ สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ จะแสดงระดับความชุกชุมสัมพัทธ์จากการใช้ข้อมูลจำนวนตัวที่ปรากฏในการสำรวจรายปี และสรุปนกที่มีความชุกชุมระดับต่างๆ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ระดับความชุกชุม 6 ระดับของนก 147 ชนิดพันธุ์ที่พบในการสำรวจตั้งแต่เดือนตุลาคม 2557-กันยายน 2558

ระดับความชุกชุม	จำนวนชนิดพันธุ์		
	ทั้งสองพื้นที่	เฉพาะเส้นทางไปโมโกจู	เฉพาะเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่วางค์ (ช่องเย็น)
ระดับที่ 1 ชุกชุมมาก (VA) มากกว่า 1000 ตัว	-	-	-
ระดับที่ 2 ชุกชุม (A) 200-1000 ตัว	1	-	-
ระดับที่ 3 ธรรมดามาก (VC), 51-200 ตัว	5	3	1
ระดับที่ 4 ธรรมดา พบบ่อย (CF), 21-50 ตัว	7	3	5
ระดับ 5 ธรรมดาแต่พบไม่บ่อย (FC), 7-20 ตัว	9	14	19
ระดับ 6 ไม่ธรรมดา (UC) 1-6 ตัว	7	39	34

ความชุกชุมของนก มีความสัมพันธ์กับค่าความเด่นของนก index of dominance, C โดยมีความแปรผันเป็นเส้นตรง กล่าวคือ นกที่มีระดับความชุกชุมสูง จะมีค่าดัชนีความเด่นสูงด้วย ดังเช่นนกแขวงแขวหงอนขน มีจำนวนตัวรวมมากถึง 434 ตัว จึงเป็นนกที่มีระดับความชุกชุมเป็น “ชุกชุม abundant” ซึ่งมีค่าความเด่นสูงสุดเป็นอันดับ 1 นกที่ปรากฏในสองพื้นที่นกชนิดนี้มีค่าความเด่นสูงสุด ซึ่งความชุกชุมรายตัวสูงนี้ ทำให้เดือนที่ปรากฏนกชนิดนี้มีค่าความต่าง หรือความหลากหลาย heterogeneity, H' ต่ำลง ดังได้อธิบายแล้ว

อย่างไรก็ตาม นกส่วนใหญ่ (ร้อยละ 54.42) มีระดับความชุกชุม “ไม่ธรรมดา uncommon, UC” จนถึง “ธรรมดาแต่พบไม่บ่อย Fairy common” ซึ่งหมายถึงมีจำนวนตัวที่ปรากฏในขณะวิจัยจำนวนตัวต่ำ ทั้ง UC และ FC มีจำนวนมากเกิน 50 % พื้นที่นี้จึงต้องการการจัดการที่มีประสิทธิภาพ เพื่อรักษาประชากรของนกที่ไม่ธรรมดาและธรรมดาแต่พบไม่บ่อยนี้ไว้ โดยเฉพาะนกที่มีสถานภาพระดับ VU อย่างนกหัวขวานสีเทา จะมีความชุกชุมต่ำมาก พบเห็นจำนวนตัวต่ำ

10 อันดับนกที่มีจำนวนตัวรวมมาก มีค่าความเด่น และ ระดับความชุกชุม (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 รายชื่อนกที่มีความเด่น และระดับความชุกชุมสูงสุด 10 อันดับแรกของนกที่พบทั้งสองพื้นที่ในการสำรวจเดือนตุลาคม 2557 ถึงเดือนกันยายน 2558

ที่	รายชื่อ	จำนวนตัวรวม Total of individuals	ค่าความเด่น Index of dominance, C (มีค่าระหว่าง 0-1)	ระดับความชุกชุม Abundance rank
1	แขวงแขวหงอนขน	434	0.073210055	Abundant
2	กระจัดธรรมดา	59	0.001307517	Very common
3	ปลีกกล้วยลาย	53	0.001090180	Very common
4	มุ่นรกตาแดง	51	0.001010955	Very common
5	จับแมลงหัวเทา	47	0.000858592	Common frequent
6	ปรอดภูเขา	43	0.007186680	Common frequent
7	กระจับหญ้าสีข้างแดง	40	0.000621887	Common frequent
8	แขวงแขวเล็กเหลือบ	39	0.000591181	Common frequent
9	ปรอดเหลืองหัวจุก	38	0.000561253	Common frequent
10	มูม	36	0.000503728	Common frequent

นกสีบอันดับที่มีความชุกชุมสูงสุดนี้ เป็นนกที่ไม่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ มีการกระจายพันธุ์ทั่วโดยมีสถานภาพของ IUCN ระดับ LC และพบได้ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติอื่นๆ

ข้อมูลที่น่าสนใจจากงานวิจัยนี้ คือ นกที่มีความเฉพาะที่พบในพื้นที่ป่าเบญจพรรณ และป่าดิบเขา ระดับต่ำบนช่องเย็นนั้น กลับมีสถานภาพทางความชุกชุมในระดับ “ไม่ธรรมดา” เป็นส่วนใหญ่ พื้นที่ทั้งสองนี้จึงต้องการการบริหารจัดการอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อให้เกิดการอนุรักษ์พันธุ์นกที่มีประชากรต่ำ ดังเช่น การกำหนดการพัฒนาเส้นทางของป่าเบญจพรรณ ต้องมีการละเว้นการทำลายถิ่นอาศัยเฉพาะของนกบางชนิดไว้ การกำหนดกิจกรรมของนักท่องเที่ยว ต้องไม่มีผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตของนก กล่าวคือต้องจัดเป็นการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ การถ่ายรูปธรรมชาติ การเดินศึกษาธรรมชาติ การดูนก สัตว์ป่าและพืชพรรณไม้ป่า การขี่จักรยานเสือภูเขา บนเฉพาะในถนนลาดยาง เป็นต้น ควรงดกิจกรรมที่ส่งเสียงดังมากหรือเกิดมลพิษมาก เช่นการขับขี่จักรยานยนต์ความเร็วสูง พวงbig bike และงดการพัฒนาเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติแบบตัดฟันป่าไม้พุ่มบ่อยครั้งเกินไป เป็นต้น เพื่อลดการรบกวนนกทั้งทางตรงและทางอ้อม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวิจัยเรื่องดัชนีทางสังคมของนกเพื่อการจัดการและการอนุรักษ์ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ เสนอข้อมูลระหว่างเดือน ตุลาคม 2557-เดือนกันยายน 2558 สรุปได้ดังนี้

1. บัญชีรายชื่อนก แสดงข้อมูลตามหลักอนุกรมวิธานในสองพื้นที่ และข้อมูลชนิดพันธุ์ที่มีความเฉพาะกับพื้นที่และดัชนีความเหมือน โดยบัญชีรายชื่อนกที่พบในเส้นทางไปโมโกจู เท่ากับ 92 ชนิดพันธุ์ ถูกจัดอยู่ใน 11 อันดับ 43 วงศ์ และสำหรับป่าดิบเขาระดับต่ำ บริเวณเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่วงก์ (ช่องเย็น) มีความหลากหลายชนิดของนกเท่ากับ 86 ชนิดพันธุ์ ถูกจัดอยู่ใน 12 อันดับ 34 วงศ์ ทั้งสองพื้นที่มีดัชนีความเหมือนของชนิดพันธุ์ (Jaccard index) เท่ากับ 21.08 % แสดงถึงการมีนกที่พบอาศัยหากินได้ทั้งสองพื้นที่มีประมาณร้อยละ 20 ของนกที่ปรากฏทั้งหมด นอกนั้นเป็นนกที่พบพื้นที่ทางไปโมโกจูจำนวน 61 ชนิดพันธุ์ และนกที่ปรากฏเฉพาะในป่าดิบเขาระดับต่ำมีจำนวน 55 ชนิดพันธุ์ ทั้งสองพื้นที่มีนกที่เป็นเอกลักษณ์ของพื้นที่ หรือเฉพาะเจาะจงต่อภูมิศาสตร์ของพื้นที่อย่างมาก เกือบร้อยละ 50 นั้นหมายถึงทั้งสองพื้นที่ที่ต้องการได้รับการคุ้มครอง อนุรักษ์และการบริหารจัดการอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อรักษาชนิดพันธุ์นกที่อาศัยอยู่เฉพาะพื้นที่ทั้งสองไว้
2. ค่าดัชนีความหลากหลายของนก (Heterogeneity, H') จะผันแปรไปตามความหลากหลายของชนิดพันธุ์ และสัมพันธ์กับความชุกชุมของรายชนิดพันธุ์ในช่วงเวลาที่สำรวจ พบว่าอยู่ระหว่าง 1.5 -2.8 nits โดยวิเคราะห์จากรายจุดนับนก (pointing count) และเมื่อวิเคราะห์จากจำนวนนกรวมรายเดือน ค่า H' เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.382-2.904 nits ในป่าเบญจพรรณและ 1.577-2.896 nits ในป่าดิบเขา ระดับต่ำทางเดินศึกษาธรรมชาติ ซึ่งความหลากหลายของพื้นที่สอง ต่ำกว่า ทั้งที่ค่าเฉลี่ยจำนวนความหลากหลายชนิดสูงกว่า สืบเนื่องจากความไม่สัมพันธ์ของความชุกชุมของนกบางชนิดที่พบมากในเส้นทางศึกษาธรรมชาติ
3. ค่าความเด่นและระดับความชุกชุมพบว่านกส่วนใหญ่ มีค่าดัชนีความเด่นไม่เข้าใกล้ 1 หมายถึงมีความเด่นต่ำ และทำให้มีระดับความชุกชุมในระดับ “ไม่ธรรมดา” เป็นส่วนมาก แม้ว่า นกส่วนมากมีสถานภาพทางการสูญพันธุ์ของ IUCN,2015 มีสถานะ “least concern, LC” ก็ตาม จากการวิจัยพบว่า ในการปรากฏแต่ละครั้ง มีจำนวนประชากรต่ำ 1-5 ตัวเป็นส่วนมาก แสดงถึงจำนวนประชากรมีแนวโน้มเข้าใกล้ความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์มากขึ้นทั้งสองเส้นทางคือทางไปโมโกจูและเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติซึ่งเป็นป่าดิบเขาระดับต่ำ ดังนั้น จำเป็นต้องบริหารจัดการกับพื้นที่อาศัยสองพื้นที่นี้ อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เกิดการอนุรักษ์สายพันธุ์โดยรวมของนกและความหลากหลายทางชีวภาพอื่นๆ

เนื่องจากพื้นที่ป่าดิบเขาในระดับต่ำนี้เป็นแหล่งทำรังของนกที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์หลายชนิด ดังเช่น นกเงือกคอแดง ดังนั้นพื้นที่นี้ควรมีการบริหารจัดการอย่างมีประสิทธิภาพ โดยต้องมีนโยบายหรือการกำหนดกิจกรรมการท่องเที่ยวที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตของนก และมีการบริหารพื้นที่/การพัฒนาพื้นที่ที่มีผลกระทบต่อด้วย โดยการลดตัดฟันพืชล้มลุกสองข้างทาง เนื่องจากพืชล้มลุกเป็นแหล่งหากินของนกหลายชนิดพวกนกหากินตามพุ่มไม้ ตามพื้นดิน ได้แก่ นกแว่นสีเทา นกกระหาญชนิดต่างๆ นกกระรางชนิดต่างๆ และนกจู่เต้นชนิดต่างๆ นกกินแมลงชนิดต่างๆ ซึ่งนกเหล่านี้มีความซุกซุ่มต่ำ

4. การใช้ประโยชน์จากการวิจัย คือการให้ข้อเสนอแนะด้านการบริหารจัดการพื้นที่ต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องโดยตรงในด้านการกำหนดกิจกรรมและการจัดการพื้นที่ของเจ้าหน้าที่ ไม่ให้เกิดผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพของนก

การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการวิจัยครั้งนี้ ได้รายชื่อชนิดของนกในพื้นที่วิจัย รายชื่อชนิดของนกที่มีความเฉพาะกับพื้นที่ และความเหมือนของชนิดพันธุ์ในสองพื้นที่ รวมถึงการสืบค้นข้อมูลด้านอาหารหลักของนกที่พบในพื้นที่ และจากการสังเกตได้ข้อมูลจากภาคสนาม พบนกในเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติ แสดงพฤติกรรมหากิน และแหล่งหากิน ทำให้ทราบว่านกที่พบในเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาตินี้มีความอ่อนไหวต่อการรบกวน เนื่องจากเป็นกลุ่มที่หากินตามพื้นดินใต้ไม้พุ่ม นอกจากนี้ยังรายงานสถานภาพทางความซุกซุ่มด้วย และพบแหล่งสร้างรังของนกในเส้นทางสำรวจด้วย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการถ่ายทอดความรู้จากการวิจัยให้กับเจ้าหน้าที่ป่าไม้ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยทำการจัด workshop ให้ความรู้เกี่ยวกับนกและความรู้จากการวิจัยที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ในเดือนพฤษภาคม 2558 โดยมีเจ้าหน้าที่ป่าไม้ร่วมอบรมจำนวน 30 คน ผลการประเมินความพึงพอใจพบว่า ความรู้ที่ถ่ายทอดให้ มีประโยชน์ต่อการทำงานของเจ้าหน้าที่ เป็นการเติมความรู้ ประสบการณ์การนำดูนก และข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพให้กับเจ้าหน้าที่ อันเป็นการสร้างความเข้มแข็งให้กับชุมชนฐานราก (เจ้าหน้าที่ป่าไม้) ผู้ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับทรัพยากรชีวภาพเหล่านี้

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทำการเผยแพร่ความรู้จากการวิจัยสู่การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ พะเยาวิจัยครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 29-30 มกราคม 2559 นำเสนอผลงานแบบ oral presentation และตีพิมพ์ proceeding เรื่องความหลากหลายชนิด และดัชนีความเหมือนของนกในป่าเบญจพรรณและป่าดิบเขาในระดับต่ำในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ Species Richness and Similarity Index of Birds in the Mixed Deciduous and Lower Montane Rainforests at Mae Wong National Park

รายการอ้างอิง

โครงการจัดการระบบฐานข้อมูลทรัพยากรในเขตอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช.

2005. อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ . [Online]. Available from:

<http://www.dnp.go.th/nprd/project/maevong.php>. 2012, March 20

จารุจินต์ นภิตะภักดิ์ กานต์ เลขกุล และวัชรระ สงวนสมบัติ. 2550. คู่มือดูนก หมอบุญส่ง เลขะกุล “นกเมืองไทย” กรุงเทพฯ คณะบุคคล นายแพทย์บุญส่ง เลขะกุล. ด้านสุธาการพิมพ์.

ส่วนศึกษาและวิจัยอุทยานแห่งชาติ สำนักอุทยานแห่งชาติ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช สถิตินักท่องเที่ยว/ ที่พัก /ยานพาหนะในอุทยานแห่งชาติและวนอุทยาน สรุปรายงานนักท่องเที่ยวที่เข้าไปในเขตอุทยานแห่งชาติต่างๆ ปีงบประมาณ 2554 แยกตามสำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ [Online]. Available from: http://www.dnp.go.th/NPRD/develop/data/stat54/ftthai_54.pdf. 27 มีนาคม 2555.

Able, K.P. and B.R. Noon. Avian community structure along elevational gradients in the Northeastern United States. *Oecologia*. 1976; 26:275–294.

Auttpol Nakwa, Narit Sitasuwan, Araya Jatisatein, Porntip Chantaramongko, Wasun Pupichit and Pornchai Srisak, 2008. The Effects of Tourists on Bird Diversity in Tourist Area Compared to Restricted Area of Seasonal Evergreen Forest at Tung Salang Luang National Park, Phetchabun Province, Thailand . International Journal of Zoological Research, 4: 96-105. [Online]. Available from: <http://scialert.net/abstract/?doi=ijzr.2008.96.105>

Bibby., C.J., Burgess, N.D., Hill, D.A., and Mustoe, S. 2000. Bird Census Techniques. 2nd ed. London: Academic Press

Bibby, C.J., Burgess, N.D., Hill, D.A., Mustoe, S.H. 2002. Bird Census Techniques. 2nd. Edition. London. Academic Press;

Bibby, C., John., M., and Marsden., S. 1998. Expedition Field Techniques: Bird Surveys. Expedition Advisory Centre. Royal Geographical Society, London. Cited in Ayanalem, S., Bekele, A., 2008. Species composition, Relative abundance and distribution of bird fauna of riverine and wetland habitats of Infranz and Yiganda at southern tip of Lake Tana, Ethiopia. *Tropical Ecology* 49(2): 199-209. [Online]. Available from : http://www.tropecol.com/pdf/open/PDF_49_2/11%20Ayanalem.pdf [2011, October 28].

- Bird Conservation Society of Thailand Records Committee. 2012. *Checklist of Thai bird names, January 2012*. [Online]. Available from: http://www.Phuketbirdwatching.com/wp-content/uploads/2012/02/Notes-on-checklist_V29Jan.pdf. [2012, January 20].
- Bombaci, S. P. and Korb., J. E. 2010. Difference in avian community structure and biodiversity following a Sudden Aspen Decline in Southwest Colorado. Metamorphosis Winter. Fort Lewis College, 14pp.
- Bull, J. 1974. Birds of New York State. Published by Doubleday/Natural History Press.
Edited by Emanuel Levine(1985). Cornell University Press
- Butler, J. C. 2013. Estimates of Avian Diversity in Forest, Prairie, and Wetland Habitats. Academia. edu. [Online]. Available from: <http://www.academia.edu> [2013, August 1]
- Christ, C. , Hillel, O., Matus, S. and Sweeting, J. 2003. Tourism and Biodiversity Mapping Tourism's Global Footprint. Conservation International Washington, DC.
- Handbook of The Bird of the World alive. Available from: URL:<http://www.hbw.com>
- IUCN. 2010. IUCN Red List of Threatened Species. IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. Downloaded in August 2010.
- IUCN,2015. A Review of Thailand's Proposal Mae Wong Dam. IUCN.org. [Online]. Available from: http://cmsdata.iucn.org/downloads/a_review_of_thailand_s_proposed_mae:1-20 Accessed September 10, 2015.
- Gan, Xiaojing, Bo Li, CHEN Jia-Kuan. 2007. The Ecological effect of biological invasion on birds. Biodiversity Science 15(5):548-557[Online]. Available from:www.biodiversity-science.net/EN/abstract/abstract9433.shtml September 10, 2014
- Kangas, K., Louto, M., Ihanola, A., Tomppo, E. and Siikamäki, P. 2010. Recreation-induced changes in boreal bird community in protected areas. Ecological Application. 20: 1775-1786. [Online]. Available form: <http://www.esajournals.org/doi/abs/10.1890/09-0399.1>[2012, March 30].

- Krebs, C. J. 2001. Ecology 5thed. London: Benjamin Cummings
- Laiolo, P. and Rolando, A. 2004. Forest bird diversity and ski-runs: a case of negative edge effect. Animal Conservation (2005) 7, 9-16. [Online]. Available from: http://www.orobievive.net/conoscere/disturbo_pistesci.pdf. [2012, March 30].
- Lambert, F.R. and Collar, N.J. 2002. The Future for Sundaic lowland forest birds: long-term effects of commercial logging and fragmentation. Forktail. 2002; 18:146-127. online Available from: <http://orientalbirdclub.org/wp-content/uploads/2012/09/Lambert-Sundaic.pdf>. Assessed September 29, 2015.
- Miller, S.G., Knight, R. L. and Miller, C. K. 1998. Influence of recreational trail on breeding bird communities. Ecological Applications, 8(1): 162-169. [Online]. Available from: http://www.friendsofboulderopenspace.org/documents/recreation_trails_miller.pdf
- Roe, D., Leader-Williams, N. and Dalal-Clayton, B. 1997. Take only photographs, leave only footprints: the environmental impacts of wildlife tourism. [Online]. Available from : http://biblioteca.duoc.cl/bdigital/Documentos_Digitales/300/39709.pdf
- Roth, R.R. Spatial heterogeneity and bird species diversity. Ecology. 1976; 57:773–782.
- Singh, B. P. and Upadhyay, Ravi. 2011. Ecotourism and its effects on wildlife of Pachmarhi Biosphere Reserve. African Journal of Environmental Science and Technology. 5(9):717-721. [Online]. Available from: <http://www.academicjournals.org/AJEST>. [2012, March 30].
- Winkler, H., Christie, D.A. & Kirwan, G.M. .2013. Great Slaty Woodpecker (*Mulleripicus pulverulentus*). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.) (2013). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. Available from: URL. <http://www.hbw.com/node/56336> Assessed September 30, 2015.

ภาคผนวก

ตารางผนวก 1 ความหลากหลายชนิดของนกในป่าเบญจพรรณ (พื้นที่ 1) และป่าดิบเขาระดับต่ำ (พื้นที่ 2) อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ข้อมูลอนุกรมวิธาน; จำนวนตัวรวมที่นับได้ใน 1 ปีที่สำรวจ ในวงเล็บคือ abundance ranking (VA> 1,000 ตัว; A=200-1,000 ตัว; VC= 51-200 ตัว; CF= 21-50 ตัว; FC= 7-20 ตัว; UC= 1-6 ตัว); สถานภาพตามฤดูกาล (R=นกประจำถิ่น และ N =นกอพยพไม่สร้างรัง); สถานภาพทางการสูญพันธุ์ (LC=least concern, VU=Vulnerable); พื้นที่ที่ปรากฏ (พื้นที่ที่ 1 เส้นทางไปโมโกจู =ป่าผสมผลัดใบ/เบญจพรรณ, Deciduous Forest with Bamboo, BB/DF, และพื้นที่ 2 เส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติแม่วงก์ =ป่าดิบเขาระดับต่ำ Lower Montane Forest, LMF); การกระจายพันธุ์แสดงระดับความสูง (m)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวม ที่นับได้ใน 1 ปี สำรวจ (Abundance ranking)	สถาน ภาพตามฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์ แสดงระดับความสูง (m)
1	อันดับ GALLIFORMES วงศ์ Phasianidae Bar-backed Partridge	นกกระทาทอดอกสีน้ำตาล <i>Arborophila brunneopectus</i>	3 (UC)	R	LC	2 LMF	Deciduous forest 350-1,300
2	Red Junglefowl	ไก่ป่า <i>Gallus gallus</i>	6 (UC)	R	LC	1 BB/DF	Deciduous forest ที่ราบ-1,800
3	อันดับ ACCIPITRIFORMES วงศ์ Accipitridae Crested Serpent Eagle	เหยี่ยวรุ้ง <i>Spilornis cheela</i>	1 (UC)	R, N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-2,500
4	Black Baza	เหยี่ยวกิ้งก่าสีดำ <i>Aviceda leuphotes</i>	4 (UC)	R, N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,500
5	Black Eagle	นกอินทรีดำ <i>Lophaetus malayensis</i>	1 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-2,565
6	อันดับ FALCONIFORMES วงศ์ Falconidae Collared Falconet	เหยี่ยวแมลงปอขาแดง <i>Microhierax caerulescens</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,830
7	อันดับ COLUMBIFORMES วงศ์ Columbidae Little Cuckoo Dove	นกเขาลายเล็ก <i>Macropygia ruficeps</i>	1 (UC)	R	LC	2 LMF	Typical evergreen forest 500-1,800

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวม ที่นับได้ใน 1 ปี สำรวจ (Abundance ranking)	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานะภาพทางการ สูญพันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์แสดง ระดับความสูง(m)
8	อันดับ COLUMBIFORMES วงศ์ Columbidae Common Emerald Dove	นกเขาเขียว <i>Chalcophaps indica</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	Typical evergreen forest ที่ราบ-1,500
9	Thick-billed Green Pigeon	นกเขาเปล้า <i>Treron curvirostra</i>	2 (UC)	R	LC	1 BB/DF	Typical evergreen forest ที่ราบ-1,280
10	Mountain Imperial Pigeon	นกมูม <i>Ducula badia</i>	40 (CF)	R	LC	2 LMF	Typical evergreen forest ที่ราบ-2,565
11	อันดับ CUCULIFORMES วงศ์ Cuculidae Greater Coucal	นกกระปูดใหญ่ <i>Centropus sinensis</i>	9 (FC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,525
12	Green-billed Malkoha	นกบั้งรอกใหญ่ <i>Phaenicophaeus tristis</i>	19 (FC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,600
13	Asian Koel	นกกาเหว่า <i>Eudynamys scolopaceus</i>	3 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,220
14	Banded Bay Cuckoo	นกคัคคูลาย <i>Cacomantis sonneratii</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,500
15	อันดับ STRIGIFORMES วงศ์ Strigidae Collared Owlet	นกเค้ากระ <i>Glaucidium brodiei</i>	1 (UC)	R	LC	2 LMF	ป่าดิบชื้นEvergreen forest ตั้งแต่ 400ขึ้นไป
16	Asian Barred Owlet	นกเค้าโมง, นกเค้าแมว <i>Glaucidium cuculoides</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,980
17	อันดับ APODIFORMES วงศ์ Apodidae Himalayan Swiftlet	นกแอ่นพันธุ์หิมาลัย <i>Aerodramus brevirostris</i>	1 (UC)	N, R	LC	2 LMF	ที่ราบ-2,565
18	Asian Palm Swift	นกแอ่นตาล <i>Cypsiurus balasiensis</i>	9 (FC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-800

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมทั้ง นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญพันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์แสดง ระดับความสูง(m)
19	อินตัม APODIFORMES วงศ์ <i>Apodidae</i> Pacific Swift	นกแอ่นตะโพกขาว แถบกว้าง <i>Apus pacificus</i>	7 (FC)	N	LC	2 LMF	ที่ราบ-2,565
20	อินตัม TROGONIFORMES วงศ์ <i>Trogonidae</i> Orange- breasted Trogon	นกขุนแผนอกส้ม <i>Harpactes oreskios</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	Typical evergreen forest ที่ราบ- 1,000
21	Red-headed Trogon	นกขุนแผนหัวแดง <i>Harpactes erythrocephalus</i>	5 (UC)	R	LC	2 LMF	Typical evergreen forest ที่ราบ-2,000
22	อินตัม CORACIIFORMES วงศ์ <i>Coraciidae</i> Indian Roller	นกตะขาบทุ่ง <i>Coracias benghalensis</i>	4 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,500
23	อินตัม CORACIIFORMES วงศ์ <i>Meropidae</i> Blue-bearded Bee- eater	นกจายคาเคราน้ำเงิน <i>Nyctyornis athertoni</i>	20 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-2,200
24	อินตัม BUCEROTIFORMES วงศ์ <i>Bucerotidae</i> Oriental Pied Hornbill	นกแก๊ก, นกแกง <i>Anthracoceros albirostris</i>	26 (CF)	R	LC	1 BB/DF	Typical evergreen forest ที่ราบ-1,400
25	อินตัม PICIFORMES วงศ์ <i>Megalaimidae</i> Great Barbet	นกตั้งล้อ <i>Megalaima virens</i>	13 (FC)	R	LC	2 LMF	Typical evergreen forest 600ขึ้นไป
26	Lineated Barbet	นกโพระดกธรรมดา <i>Megalaima lineata</i>	38 (CF)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-800
27	Green-eared Barbet	นกโพระดกหูเขียว <i>M. faiostricta</i>	3 (UC)	R	LC	1 BB/DF	Typical evergreen forest ที่ราบ-900
28	วงศ์ <i>Megalaimidae</i> Golden-throated Barbet	นกโพระดกคางเหลือง <i>M. franklinii</i>	3 (UC)	R	LC	1,2 BB/DF , LMF	Typical evergreen forest 900ขึ้นไป

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมทั้ง นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์ แสดงระดับความสูง (m)
29	วงศ์ <i>Megalaimidae</i> Blue-throated Barbet	นกโพระดกคอสีฟ้า <i>M. asiatica</i>	12 (FC)	R	LC	2 LMF	Typical evergreen forest 600-1,800
30	อันดับ TROGONIFORMES วงศ์ <i>Trogonidae</i> White-browed Piculet	นกหัวขวานจิ้งจิวขาว <i>Sasia ochracea</i>	2 (UC)	R	LC	1,2 BB/DF , LMF	ที่ราบ-1,800
31	Freckle-breasted Woodpecker	นกหัวขวาน ต่างอกลายจุด <i>Dendrocopos analis</i>	1 (UC)	R	LC	2 LMF	ไม่เกิน900
32	อันดับ PICIFORMES วงศ์ <i>Picidae</i> Greater Yellownape	นกหัวขวานใหญ่ หงอนเหลือง <i>Chrysophlegma flavinucha</i>	4 (UC)	R	LC	1,2 BB/DF , LMF	ที่ราบ-2,000
33	อันดับ PICIFORMES วงศ์ <i>Picidae</i> Lesser Yellownape	นกหัวขวานเล็กหงอน เหลือง <i>Picus chlorolophus</i>	3 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,800
34	Grey-headed Woodpecker	นกหัวขวานเขี้ยวหัว ดำ <i>P. canus</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,800
35	Common Flameback	นกหัวขวานสามนิ้ว หลังทอง <i>Dinopium javanense</i>	2 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-800
36	Bamboo Woodpecker	นกหัวขวานป่าไผ่ <i>Gecinulus viridis</i>	4 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,400
37	Bay Woodpecker	นกหัวขวานแดงหลัง ลาย <i>Blythipicus pyrrhotis</i>	3 (UC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	600-2,200
38	Rufous Woodpecker	นกหัวขวานสีตาล <i>Micropternus brachyurus</i>	1 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-900

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมที่ นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์แสดงระดับ ความสูง(m)
39	Great Slaty Woodpecker	นกหัวขวานใหญ่สีเทา <i>Mulleripicus pulverulentus</i>	5 (UC)	R	VU	1 BB/DF	ที่ราบ-1,000
40	อันดับ PASSERIFORMES วงศ์ <i>Eurylaimidae</i> Long-tailed Broadbill	นกพญาปากกว้างหาง ยาว <i>Psarisomus dalhousiae</i>	2 (UC)	R	LC	2 LMF	500-1,000
41	วงศ์ <i>Eurylaimidae</i> Dusky Broadbill	นกพญาปากกว้างสีดำ <i>Corydon sumatranus</i>	4 (UC)	R	LC	1 BB/DF	Typical evergreen forest ที่ราบ-1,220
42	วงศ์ <i>Tephrodomithidae</i> Bar-winged Flycatcher-shrike	นกเขนน้อยปีกแถบขาว <i>Hemipus picatus</i>	12 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,830
43	Large Woodshrike	นกเขียวจงหางสีน้ำตาล <i>Tephrodomis virgatus</i>	1 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,500
44	วงศ์ <i>Artamidae</i> Ashy Woodswallow	นกแอ่นพง <i>Artamus fuscus</i>	8 (FC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,800
45	วงศ์ <i>Campephagidae</i> Large Cuckooshrike	นกขี้เถ้าใหญ่ <i>Coracina macei</i>	1 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,800
46	Black-winged Cuckooshrike	นกเขียวมุ้งใหญ่ <i>C. melaschistos</i>	2 (UC)	R, N	LC	1 BB/DF	1,000-1,920
47	Ashy Minivet	นกพญาไฟสีเทา <i>Pericrocotus divaricatus</i>	2 (UC)	N	LC	1 BB/DF	Typical evergreen forest ที่ราบ-1,200
48	Grey-chinned Minivet	นกพญาไฟคอเทา <i>P. solaris</i>	12 (FC)	R	LC	2 LMF	Typical evergreen forest 800-2,190
49	Short-billed Minivet	นกพญาไฟแม่สะเรียง <i>P. brevirostris</i>	9 (FC)	R	LC	2 LMF	900ขึ้นไป
50	Scarlet Minivet	นกพญาไฟใหญ่ <i>P. speciosus</i>	25 (CF)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,700
51	วงศ์ <i>Laniidae</i> Brown Shrike	นกอีเสือสีน้ำตาล <i>Lanius cristatus</i>	1 (UC)	N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-2,000

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมที่ นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์แสดง ระดับความสูง(m)
52	วงศ์ <i>Oriolidae</i> Slender-billed Oriole	นกขมิ้นปากเรียว <i>Oriolus tenuirostris</i>	10 (FC)	R, N	LC	1 BB/DF	600-1,500
53	วงศ์ <i>Oriolidae</i> Black-naped Oriole	นกขมิ้นท้ายทอยดำ <i>O. chinensis</i>	2 (UC)	R, N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,525
54	Black-hooded Oriole	นกขมิ้นหัวดำใหญ่ <i>O. xanthomus</i>	4 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,800
55	Maroon Oriole	นกขมิ้นแดง <i>O. traillii</i>	18 (FC)	R, N	LC	2 LMF	800-2,100
56	Family <i>Dicruridae</i> Black Drongo	นกแซงแซวหางปลา <i>Dicrurus macrocercus</i>	10 (FC)	R, N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-2,000
57	Ashy Drongo	นกแซงแซวสีเทา <i>D. leucophaeus</i>	11 (FC)	R, N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-2,565
58	Bronzed Drongo	นกแซงแซวเล็กเหลือบ <i>D. aeneus</i>	11 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-2,000
59	Lesser Racket-tailed Drongo	นกแซงแซวหางปวงเล็ก <i>D. remifer</i>	2 (UC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	700-2,565
60	Hair-crested Drongo	นกแซงแซวหงอนขน <i>D. hottentottus</i>	434 (A)	R, N	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-2,000
61	วงศ์ <i>Dicruridae</i> Greater Racket- tailed Drongo	นกแซงแซวหางปวง ใหญ่ <i>D. paradiseus</i>	10 (FC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,700
62	วงศ์ <i>Rhipiduridae</i> White-throated Fantail	นกอีแพรดคอขาว <i>Rhipidura albicollis</i>	9 (FC)	R	LC	2 LMF	600-2,565
63	White-browed Fantail	นกอีแพรดคิ้วขาว <i>R. aureola</i>	3 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,065
64	วงศ์ <i>Monarchidae</i> Black-naped Monarch	นกจับแมลงจุกดำ <i>Hypothymis azurea</i>	32 (CF)	R, N	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,520
65	วงศ์ <i>Corvidae</i> Red-billed Blue Magpie	นกขุนแผน <i>Urocissa erythroryncha</i>	14 (FC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,525
66	Common Green Magpie	นกสาลิกาเขียว <i>Cissa chinensis</i>	7 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,800

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมทั้ง นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์แสดง ระดับความสูง(m)
67	Grey Treepie	นกกะลิงเขียดสีเทา <i>Dendrocitta formosae</i>	7 (FC)	R	LC	2 LMF	800-1,800
68	วงศ์ <i>Stenostiridae</i> Grey-headed Canary- flycatcher	นกจับแมลงหัวเทา <i>Culicicapa ceylonensis</i>	49 (CF)	R, N	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-2,565
69	วงศ์ <i>Paridae</i> Yellow-cheeked Tit	นกตีดักแก้มเหลือง <i>Parus spilonotus</i>	8 (FC)	R	LC	1 BB/DF	Typical evergreen forest 900ขึ้นไป
70	วงศ์ <i>Pycnonotidae</i> Black-headed Bulbul	นกปรอดทอง <i>Pycnonotus atriceps</i>	2 (UC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,600
71	Black-crested Bulbul	นกปรอดเหลืองหัวจุก <i>P. flaviventris</i>	123 (VC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-2,565
72	Red-whiskered Bulbul	นกปรอดหัวโขน <i>P. jocosus</i>	3 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,800
73	Sooty-headed Bulbul	นกปรอดหัวสีเข้ม <i>P. aurigaster</i>	57 (VC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,830
74	Flavescent Bulbul	นกปรอดหัวตาขาว <i>P. flavescens</i>	38 (CF)	R	LC	2 LMF	900-2,565
75	วงศ์ <i>Pycnonotidae</i> White-throated Bulbul	นกปรอดโง่งหน้าผาก เทา <i>Alophoixus flaveolus</i>	2 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,525
76	Puff-throated Bulbul	นกปรอดโง่งเมืองเหนือ <i>A. pallidus</i>	4 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,450
77	วงศ์ <i>Pycnonotidae</i> Olive Bulbul	นกปรอดเล็กสีโพลตา แดง <i>Iole virescens</i>	8 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF	ที่ราบ-900
78	Grey-eyed Bulbul	นกปรอดเล็กตาขาว <i>I. propinqua</i>	5 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,500
79	Mountain Bulbul	นกปรอดภูเขา <i>I. maclellandii</i>	94 (VC)	R	LC	2 LMF	800 ขึ้นไป
80	Cinereous Bulbul	นกปรอดสีซีดำ <i>Hemixos cinerea</i>	5 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-2,100
81	Black Bulbul	นกปรอดดำ <i>Hypsipetes leucocephalus</i>	31 (CF)	R, N	LC	2 LMF	500-2,565

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมที่ นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพ ตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์แสดง ระดับความสูง(m)
82	วงศ์ <i>Hirundinidae</i> Barn Swallow	นกนางแอ่นบ้าน <i>Hirundo rustica</i>	17 (FC)	R, N	LC	2 LMF	ที่ราบ-2,565
83	วงศ์ <i>Cettiidae</i> Yellow-bellied Warbler	นกกะจ้อยคอขาว <i>Abroscopus superciliaris</i>	20 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,525
84	Mountain Tailorbird	นกกะจิบภูเขา <i>Phyllergates cuculatus</i>	3 (UC)	R	LC	2,LMF	1,000-1,200
85	วงศ์ <i>Cettiidae</i> Yellow-streaked Warbler	นกกะจืดอกลายเหลือง <i>P. arandii</i>	1 (UC)	N	LC	1 BB/DF	1,500-2,500
86	Radde's Warbler	นกกะจืด ปากหนา <i>P. schwarzi</i>	15 (FC)	N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-2,135
87	Yellow-browed Leaf Warbler	นกกะจืด ธรรมดา <i>P. inornatus</i>	59 (VC)	N	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-2,440
88	Arctic Warbler	นกกะจืดขั้วโลกเหนือ <i>P. borealis</i>	16 (FC)	N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,800
89	วงศ์ <i>Phylloscopidae</i> Claudia's Leaf Warbler	นกกะจืดหางขาวใหญ่ <i>P. claudiae</i>	1 (UC)	N	LC	2 LMF	600-2,565
90	วงศ์ <i>Phylloscopidae</i> Grey-crowned Warbler	นกกะจ้อยวงดาสีทอง หัวเทา <i>Seicercus tephrocephalus</i>	1 (UC)	N	LC	1 BB/DF	1,400-2,565
91	วงศ์ <i>Acrocephalidae</i> Black-browed Reed Warbler	นกพงคิ้วดำ <i>Acrocephalus bistrigiceps</i>	1 (UC)	N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-800
92	Thick-billed Warbler	นกพงปากหนา <i>Phragamaticola aedon</i>	2 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,525
93	วงศ์ <i>Cisticolidae</i> Rufescent Prinia	นกกะจิบหญ้าสีข้างแดง <i>Prinia rufescens</i>	80 (VC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,600

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมที่ นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์ แสดงระดับความสูง (m)
94	วงศ์ <i>Cisticolidae</i> Grey-breasted Prinia	นกกระจิบหน้าอกเทา <i>P. hodgsonii</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,675
95	Common Tailorbird	นกกระจิบธรรมดา <i>Orthotomus sutorius</i>	55 (VC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,525
96	วงศ์ <i>Timaliidae</i> White-browed Scimitar Babbler	นกกระวังไพรปากเหลือง <i>Pomatorhinus schisticeps</i>	16 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-2,000
97	Red-billed Scimitar Babbler	นกกระวังไพรปากแดง ยาว <i>P. ochraceiceps</i>	10 (FC)	R	LC	2 LMF	600-1,600
98	Coral-billed Scimitar Babbler	นกกระวังไพรปากแดงสั้น <i>P. ferruginosus</i>	3 (UC)	R	LC	2 LMF	1,200-2,000
99	วงศ์ <i>Timaliidae</i> <i>Grey-throated Babbler</i>	นกกินแมลงคอเทา <i>Stachyris nigriceps</i>	5 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,830
100	Spot-necked Babbler	นกกินแมลงคอดลาย <i>Stachyris striolata</i>	1 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,525
101	วงศ์ <i>Timaliidae</i> Rufous-fronted Babbler	นกกินแมลงหน้าผาก น้ำตาล <i>Stachyridopsis rufifrons</i>	20 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-2,100
102	Golden Babbler	นกกินแมลงหัวสีทอง <i>S. chrysaee</i>	25 (CF)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	775-2,000
103	Pin-striped Tit Babbler	นกกินแมลงอกเหลือง <i>Macronus gularis</i>	2 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,525
104	วงศ์ <i>Pellorneidae</i> Grey-cheeked Fulvetta	นกมุ่นรกตาแดง <i>Alcippe fratercula</i>	59	R	LC	2 LMF	Mountain forest bird 600ขึ้นไป
105	Streaked Wren Babbler	นกจู่ต้นหางสั้น <i>Napothera brevicaudata</i>	3 (UC)	R	LC	2 LMF	Mountain forest bird ที่ราบ-1,600

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมที่ นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ ปรากฏ	การกระจายพันธุ์แสดง ระดับความสูง(m)
106	วงศ์ <i>Pellorneidae</i> Collared Babbler	นกเสื้อแมลงหัวขาว <i>Gampsorhynchus torquatus</i>	6 (UC)	R	LC	2 LMF	Mountain forest bird 500-1,800
107	Puff-throated Babbler	นกจาดินอกลาย <i>Pellorneum ruficeps</i>	15 (FC)	R	LC	1 BB/DF	Deciduous forest ที่ราบ-1,800
108	วงศ์ <i>Leiothrichidae</i> White-crested Laughingthrush	นกกระรางหัวหงอก <i>Garrulax leucolophus</i>	65 (VC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	Deciduous forest ที่ราบ-1,600
109	White-necked Laughingthrush	นกกระรางอกสีน้ำตาล ไหม้ <i>G. strepitans</i>	9 (FC)	R	LC	2 LMF	500-1,800
110	Lesser Necklaced Laughingthrush	นกกระรางสร้อยคอเล็ก <i>G. monileger</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	Deciduous forest ที่ราบ-1,675
111	Greater Necklaced Laughingthrush	นกกระรางสร้อยคอใหญ่ <i>G. pectoralis</i>	19 (FC)	R	LC	1 BB/DF	Deciduous forest ที่ราบ-1,500
112	วงศ์ <i>Leiothrichidae</i> Black-throated Laughingthrush	นกกระรางคอดำ, นกขอฮู้ <i>Dryonastes chinensis</i>	6 (UC)	R	LC	2 LMF	Mountain forest bird ที่ราบ-1,525
113	Silver-eared Laughingthrush	นกกระรางหัวแดง <i>Trochalopteron melanostigma</i>	2 (UC)	R	LC	2 LMF	Mountain forest bird 1,065-2,565
114	วงศ์ <i>Leiothrichidae</i> Blue-Winged Siva	นกคิ้วะปีกสีฟ้า <i>Siva cyanouroptera</i>	2 (UC)	R	LC	2 LMF	Mountain forest bird 900-2565
115	Silver-eared Mesia	นกกระรอกทองแก้มขาว <i>Leiothrix argentauris</i>	5 (UC)	R	LC	2 LMF	Mountain forest bird 1,300-2,000
116	วงศ์ <i>Zosteropidae</i> Striated Yuhina	นกภูหงอนหัวลาย <i>Staphida castaniceps</i>	37 (CF)	R	LC	2 LMF	Mountain forest bird 900-1,900
117	วงศ์ <i>Zosteropidae</i> Chestnut-flanked White-eye	นกแว่นตาขาวสีข้างแดง <i>Zosterops erythropleurus</i>	8 (FC)	N	LC	2 LMF	ที่ราบ-2,565
118	Japanese White-eye	นกแว่นตาขาวหลังเขียว <i>Z. japonicus</i>	15 (FC)	N	LC	2 LMF	ที่ราบ-2,565
119	Oriental White-eye	นกแว่นตาขาวสีทอง <i>Z. palpebrosus</i>	24 (CF)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,830

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมที่ นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์แสดง ระดับความสูง(m)
120	วงศ์ <i>Irenidae</i> Asian Fairy-bluebird	นกเขี้ยวคราม <i>Irena puella</i>	10 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,250
121	วงศ์ <i>Sittidae</i> Velvet-fronted Nuthatch	นกไตไม้หน้าผาก ก้ามเหยี่ยว <i>Sitta frontalis</i>	25 (CF)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,800
122	วงศ์ <i>Sturnidae</i> Common Hill Myna	นกขุนทอง <i>Gracula religiosa</i>	56 (VC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,370
123	วงศ์ <i>Muscicapidae</i> Oriental Magpie Robin	นกทางเขนบ้าน <i>Copsychus saularis</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,830
124	White-rumped Shama	นกทางเขนดง <i>C. malabaricus</i>	25 (CF)	R	LC	1 BB/DF	Deciduous forest ที่ราบ-1,525
125	Asian Brown Flycatcher	นกจับแมลงสีน้ำตาล <i>Muscicapa dauurica</i>	1 (UC)	N, R	LC	1 BB/DF	Deciduous forest ที่ราบ-1,600
126	Verditer Flycatcher	นกจับแมลงสีฟ้า <i>Eumyias thalassinus</i>	2 (UC)	R, N	LC	2 LMF	ที่ราบ-2,565
127	วงศ์ <i>Muscicapidae</i> Hainan Blue Flycatcher	นกจับแมลงอกสีฟ้า <i>Cyornis hainanus</i>	7 (FC)	R,N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,020
128	วงศ์ <i>Muscicapidae</i> Hill Blue Flycatcher	นกจับแมลงคอน้ำตาล แดง <i>Cyornis banyumas</i>	20 (FC)	R, N	LC	1,2 BB/DF, LMF	400-2,515
129	Tickell's Blue Flycatcher	นกจับแมลงอกส้ม ท้องขาว <i>Cyornis tickelliae</i>	2 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-600
130	วงศ์ <i>Muscicapidae</i> Blue-throated Flycatcher	นกจับแมลงคอสีน้ำเงิน เข้ม <i>Cyornis rubeculoides</i>	3 (UC)	R, N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,700
131	Northern White- crowned Forktail	นกทางเขนหัวขาว เหนือ <i>Enicurus sinensis</i>	5 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,300
132	Blue Whistlingthrush	นกเอี้ยงถ้ำ <i>Myophonus caeruleus</i>	1 (UC)	R, N	LC	2 LMF	ที่ราบ-2,565

ตารางผนวก1 (ต่อ)

ที่	ชื่อสามัญ	ชื่อไทย ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวรวมที่ นับได้ใน 1 ปี สำรวจ	สถาน ภาพตาม ฤดูกาล	สถานภาพ ทางการสูญ พันธุ์	พื้นที่ที่ปรากฏ	การกระจายพันธุ์แสดงระดับ ความสูง(m)
133	วงศ์ <i>Muscicapidae</i> Taiga Flycatcher	นกจับแมลงคอแดง <i>Ficedula albicilla</i>	14 (FC)	N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-2,153
134	Little Pied Flycatcher	นกจับแมลงเล็กขาวดำ <i>Ficedula westermanni</i>	8 (FC)	R	LC	2 LMF	700 ขึ้นไป
135	วงศ์ <i>Chloropseidae</i> Blue-winged Leafbird	นกเขียวก้านดองปีกสีฟ้า <i>Chloropsis cochinchinensis</i>	4 (UC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,500
136	Golden-fronted Leafbird	นกเขียวก้านดอง หน้าผากสีทอง <i>Chloropsis aurifrons</i>	9 (FC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,220
137	วงศ์ <i>Chloropseidae</i> Orange-bellied Leafbird	นกเขียวก้านดองท้องสี ส้ม <i>Chloropsis hardwickii</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	600-2,000
138	วงศ์ <i>Dicaeidae</i> Plain Flowerpecker	นกกาฝากสีเรียบ <i>Dicaeum minullum</i>	1 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,700
139	วงศ์ <i>Nectariniidae</i> Ruby-cheeked Sunbird	นกกินปลีแก้มสีทับทิม <i>Chalcoparia singalensis</i>	2 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-1,370
140	Olive-backed Sunbird	นกกินปลีอกเหลือง <i>Cinnyris jugularis</i>	5 (UC)	R	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-915
141	Black-throated Sunbird	นกกินปลีหางยาวคอดำ <i>Aethopyga saturata</i>	25 (CF)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	300-1,700
142	Crimson Sunbird	นกกินปลีคอแดง <i>Aethopyga siparaja</i>	1 (UC)	R	LC	2 LMF	ที่ราบ-1,000
143	วงศ์ <i>Nectariniidae</i> Little Spiderhunter	นกปลีกล้วยเล็ก <i>Arachnothera longirostra</i>	37 (CF)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,300
144	Streaked Spiderhunter	นกปลีกล้วยลาย <i>Arachnothera magna</i>	92 (VC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	300-1,800
145	วงศ์ <i>Estrildidae</i> White-rumped Munia	นกกระต๊อตตะโพกขาว <i>Lonchura striata</i>	11 (FC)	R	LC	1,2 BB/DF, LMF	ที่ราบ-1,500
146	วงศ์ <i>Motacillidae</i> Olive-backed Pipit	นกเด้าดินสวน <i>Anthus hodgsoni</i>	5 (UC)	N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-2,565
147	วงศ์ <i>Emberizidae</i> Chestnut Bunting	นกจาบปีกอ่อนสีตาล <i>Emberiza rutila</i>	2 (UC)	N	LC	1 BB/DF	ที่ราบ-2,500



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของชนิดปลาน้ำจืดที่พบในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Fresh Water Fish Diversity at Mae Wong National Park

สุริศักดิ์ ประสานพันธ์* Surisak Prasarnpun
สุธน เวียงดาว** Suthon Weingdow

*คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

**อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปี พ.ศ. 2557



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของชนิดปลาน้ำจืดที่พบในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Fresh Water Fish Diversity at Mae Wong National Park

สุริศักดิ์ ประสานพันธ์ Surisak Prasarnpun
สุธน เวียงดาว Suthon Weingdow

*คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
**อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปี พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “ความหลากหลายของชนิดปลาน้ำจืดที่พบในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
ได้รับการตรวจประเมินเค้าโครงของการวิจัยจากคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ (วช.) อันเป็นผลให้ได้การ
สนับสนุนงบประมาณการทำวิจัยจากงบประมาณของสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2557 ซึ่งต้อง
กราบขอบพระคุณคณะกรรมการทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คุณสุชน เวียงดาว หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ที่ให้ความอนุเคราะห์เข้าร่วมโครงการ
ทดลอง และอนุญาตให้เข้าทำการเก็บตัวอย่างอันเป็นผลให้การวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณพนักงานของอุทยานทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน และเจ้าหน้าที่
ห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความเหลือในการปฏิบัติการเป็นอย่างดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ไทย)	1
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	2
บทนำ	3
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	8
อภิปรายและสรุปผล	18
บรรณานุกรม	19

ความหลากหลายของชนิดปลาน้ำจืดที่พบในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Diversity of fishes in Mae Wong National Park Area

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายชนิดของปลาน้ำจืดในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ได้มีการรวบรวมตัวอย่างปลาจากลำน้ำแม่วงก์และตามเกาะแก่งสาขาของลำน้ำในเขตพื้นที่อุทยานแม่วงก์รวมทั้งหมด 10 จุดในระหว่างเดือน มิถุนายน 2557-สิงหาคม 2558 รวม 5 ครั้ง จับปลาด้วยสวิงหรือลากด้วยตาข่าย เก็บตัวอย่างด้วยการถ่ายรูปหรือนำตัวอย่างปลาไปจำแนกชนิดและปริมาณ เพื่อหาความหลากหลายชนิดของปลาและการแพร่กระจาย ผลการสำรวจพบมีความหลากหลายของชนิดปลาทั้งหมด 42 ชนิด จาก 17 วงศ์ 27 สกุล โดยพบปลาในวงศ์ตะเพียน ชิว สร้อย (Cyprinidae) มีความหลากหลายชนิดมากที่สุดคือ 9 ชนิด การกระจายของปลาทุกวงศ์พบได้ทั่วไปทั้งตามลำน้ำและตามพื้นที่ที่เป็นแก่ง แต่เนื่องจากในปีที่สำรวจนี้มีภาวะฝนทิ้งช่วงและฝนแล้งยาวนาน เป็นเหตุให้ปริมาณน้ำไม่แตกต่างกันมากในรอบเวลาที่สำรวจ จึงไม่สามารถจำแนกเป็นฤดูน้ำหลากและฤดูน้ำน้อย และไม่พบความแปรผันของชนิดปลาและปริมาณในแต่ละฤดูกาล

คำสำคัญ: ปลาน้ำจืด ความหลากหลาย อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Fresh Water Fish Diversity at Mae Wong National Park

Abstract

Surveyed on fishes diversity and distribution were carried out in 10 stations along Mae Wong River and in some river basin alongside in Mae Wong National Park Area during June 2014-August 2015. Fish were trapped by using the fishnet and collected data by photographing before discharging. In some cases, if there are many, one or two fishes were collected as specimens in 10% formalin before taking to the Laboratory. A total number of species observed throughout the study was 42 species from 17 families and 27genera. The highest diversity of fishes was found in Family Cyprinidae with 9 species. Distribution of fish communities was similar in both along the river and in the river basin. However, seasonal variation in the composition and abundance was not observed because of the long period of rain-shortage during the year of studying.

Keywords: freshwater fish, diversity, Mae Wong National Park

บทนำ

สถานการณ์โลกปัจจุบันกำลังเผชิญกับปัญหาการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์น้ำจืดมากขึ้นทุกปี เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมและการคุกคามแหล่งที่อยู่อาศัยที่เป็นแหล่งน้ำจืดมากขึ้นด้วยหลายสาเหตุ เช่น การรุกรานทำลายป่าเพื่อการทำกินและเพื่อเป็นแหล่งที่อยู่อาศัย การสร้างเขื่อนกั้นน้ำ การขยายตัวของเขตอุตสาหกรรม การขยายตัวของแหล่งเพาะปลูก ซึ่งนำไปสู่การทำลายหรือทำให้แหล่งน้ำจืดมีความเป็นพิษจากสารเคมีจากแหล่งอุตสาหกรรมและแหล่งการเกษตร เป็นต้น ซึ่งปัญหาเหล่านี้วันแต่จะทวีความรุนแรงมากขึ้นทุกปี เมื่อนิเวศวิทยาของแหล่งน้ำจืดได้รับผลกระทบจึงส่งผลต่อการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์น้ำอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ และจากการศึกษาการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพ มีรายงานว่าหากแหล่งที่อยู่น้ำจืดได้รับผลกระทบ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งที่เกิดจากการกระทำโดยน้ำมีมนุษย์จะทำให้มีการสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าที่เกิดกับแหล่งที่อยู่บนบกและแหล่งที่อยู่ในทะเล อย่างเห็นได้ชัด (Sala et al., 2000; Liermann et al., 2012)

ปลาน้ำจืดเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของคนไทยมาช้านาน จนกระทั่งถึงปัจจุบันก็ยังคงมีความสำคัญในหลายมิติ ทั้งการเป็นอาหาร การเพาะเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ปลาจึงเป็นกลุ่มสัตว์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ส่วนคุณค่าในทางระบบนิเวศและการอนุรักษ์นั้นปลาน้ำจืดยังเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงความสมดุลทางธรรมชาติที่ดี โดยดูได้จากความหลากหลายทางชีวภาพของชนิดพรรณปลาที่มีอยู่ และแนวโน้มการเปลี่ยนแปลง การที่จะใช้ประโยชน์จากธรรมชาติให้ยั่งยืนได้ จำเป็นที่จะต้องมียุทธศาสตร์เบื้องต้นของชนิดพันธุ์ปลาพื้นเมืองที่พบตามธรรมชาติและชนิดที่นำเข้ามาจากต่างถิ่นเป็นข้อมูลสำคัญลำดับแรก (ขวลิต วิทยานนท์ และคณะ, 2541)

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีพื้นที่ครอบคลุมท้องที่อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร อำเภอแม่วงก์ และอำเภอแม่เปิน จังหวัดนครสวรรค์ สภาพพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์เป็นเทือกเขาสูงสลับซับซ้อนเรียงรายอยู่ตามเทือกเขาถนนธงชัย ลดหลั่นลงมาจนถึงพื้นราบ ยอดที่สูงที่สุดคือยอดเขาโมโกจู ซึ่งสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,964 เมตร เป็นแหล่งต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ ในเขตอุทยานมีพื้นที่ที่ราบไม่มาก ส่วนใหญ่จะเป็นพื้นที่แคบๆอยู่บริเวณริมแม่น้ำ ถึงแม้ว่าลำน้ำแม่วงก์จะเป็นลำน้ำเล็กๆ แต่แม่น้ำแม่วงก์ก็เป็นต้นกำเนิดของแม่น้ำสะแกกรังซึ่งอยู่ระดับล่างลงมาและเป็นแม่น้ำสายใหญ่ที่ไหลผ่านชุมชนหลายจังหวัดผ่านลงมายังภาคกลาง ซึ่งเป็นแหล่งของปลาน้ำจืดที่สำคัญอีกแหล่งของประเทศ ความเชื่อมโยงระหว่างสองสายน้ำนี้จึงน่าจะทำให้มีความหลากหลายของปลาน้ำจืดที่คล้ายคลึงกัน ปลาน้ำจืดน่าจะอพยพหรือกระจายถึงกันได้ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่เกิดขึ้นกับลำน้ำแม่วงก์น่าจะกระทบถึงความหลากหลายของปลาในแหล่งน้ำต่างๆ ที่อยู่ระดับล่างลงมาได้เช่นกัน การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจความหลากหลายชนิดของปลาน้ำจืดในลำน้ำแม่วงก์และการแพร่กระจาย เพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น และจะเป็นข้อมูลในการวางแผนดูแลและใช้ประโยชน์จากทรัพยากรปลาน้ำจืดในอนาคต

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยจัดว่าเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายของพันธุ์ปลามาก มีรายงานโดย Vidthayanon (2004) และ Vidthayanon (2005) รายงานไว้ว่าประเทศไทยมีสายพันธุ์ปลาน้ำจืดประมาณ 700 ชนิด คิดเป็น 1.04% ของโลก และเป็น 3.74% ของปลาในทวีปเอเชีย ปลาจึงเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ทรงคุณค่าในหลายด้านสำหรับประเทศไทย ไม่เพียงแต่เป็นแหล่งอาหารที่ใช้ในการบริโภค แต่ยังมีการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรในปัจจุบันที่เปลี่ยนรูปแบบไปได้อีก เช่น การนำลักษณะเด่นที่สวยงามของพันธุ์ปลาบางชนิดมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ทั้งเลี้ยงเพื่อความเพลิดเพลิน และเพาะเลี้ยงเป็นอาชีพ มีการส่งออกไปขายยังตลาดต่างประเทศ สร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย และนำเงินเข้ามาในประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี มีรายงานว่าประเทศไทยส่งออกปลาสวยงามไปสู่ประเทศต่างๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก มีทั้งปริมาณและมูลค่าของการส่งออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปลาสวยงามน้ำจืดเขตร้อนร้อยละ 75 ได้มาจากภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกอยู่ในอันดับต้นๆ ปลาสวยงามของไทยหลายชนิดที่ตลาดต่างประเทศต้องการและนิยมเลี้ยงเป็นปลาที่รวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ (สุจินต์ หนูขวัญ และอรุณี รอดลอย, 2552) ดังนั้นทุกภาคส่วนที่เกี่ยวข้องจึงต้องตระหนักถึงการใช้ทรัพยากรปลาน้ำจืดของไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยต้องคำนึงถึงทั้งการอนุรักษ์แหล่งที่อยู่ การวางแผนอนุรักษ์การใช้ประโยชน์ ตลอดจนการเก็บรวบรวมข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางประกอบการวางแผนการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ เพื่อให้ทรัพยากรปลาน้ำจืดจะยังคงอยู่อย่างยั่งยืน

ลักษณะของป่าแฉ่งก้นในอดีตเคยเป็นพื้นที่ใช้ประโยชน์โดยประชากรในท้องถิ่น จึงมีการตัดไม้ป่าจำนวนมาก จากการสำรวจในหลายๆ ครั้งจึงมักถูกจัดว่าเป็นพื้นที่ป่าเสื่อมโทรม แต่จากการศึกษาและมีการรายงานผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อมใน EIA ฉบับร่าง ที่จัดทำในปี 2542 โดย 2 หน่วยงานคือ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช และสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กลับพบว่า มีจำนวนสัตว์เพิ่มมากขึ้นจำนวนมากว่าครั้งที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้ศึกษาไว้ในปี 2534 ทั้งๆ ที่การศึกษายังไม่สมบูรณ์ครบทุกฤดูกาล (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2542; สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2542) แสดงให้เห็นถึงการเข้ามาดูแลและจัดการให้เป็นพื้นที่อนุรักษ์ทำให้สัตว์อพยพเข้ามาอยู่และมีความหลากหลายเพิ่มขึ้น ในประเด็นที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายของสัตว์น้ำ ในรายงานยังกล่าวไว้ว่าถ้าเทียบกับจำนวนชนิดของปลาน้ำจืดที่พบในประเทศไทยกว่า 700 ชนิดตามที่มีรายงานโดย Vidthayanon (2004) และ Vidthayanon (2005) นั้น ในพื้นที่อุทยานแฉ่งก้นมีปลาถึง 60 กว่าชนิด ซึ่งประมาณได้ว่าเป็นเกือบ 10% ของปลาทั้งหมดที่พบในประเทศไทย (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2542; สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2542) ทั้งๆ ที่เป็นลำน้ำสายไม่ใหญ่ นอกจากนี้ที่นี่ยังเป็นจุดอาศัยของปลาบางชนิดที่อาศัยเฉพาะในลำธารที่เป็นที่ราบลักษณะนี้ เช่น ปลาตะพากปีกส้ม และไม่พบในบริเวณอื่น (นณณ์ ภาณุตวงค์, 2555) และด้วยลักษณะภูมิประเทศของลำน้ำที่พื้นที่สองฝั่งเป็นป่าหญ้า จึงมีความเหมาะสมสำหรับการเป็นพื้นที่หากิน ทำรังและวางไข่ของสัตว์น้ำในฤดูน้ำหลาก พื้นที่ลักษณะนี้เวลาที่มีน้ำหลากน้ำจะไหลแรงตรงกลาง ส่วนริมฝั่งจะไหลเบา จึงเป็นทั้งที่

หลบภัยและวางไข่ของปลา นอกจากนี้การมีแก่งเป็นจำนวนมากในลำน้ำก็มีความสำคัญเปรียบเสมือนเป็น
ปอดของแม่น้ำ ทำให้น้ำแตกเป็นฟองและมีออกซิเจนละลายลงไป

ดังนั้นการไปเปลี่ยนแปลงหรือไปก่อผลกระทบใดๆต่อลำน้ำจึงย่อมส่งผลกระทบต่อความหลากหลาย
ของปลาน้ำจืดในลำน้ำแม่วงก์อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การสำรวจในครั้งนี้จึงจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการ
อนุรักษ์ทรัพยากรสัตว์น้ำอีกทางหนึ่ง



ภาพ 2 จุดเก็บตัวอย่างเหนือบริเวณที่จะสร้างเขื่อนและใต้บริเวณที่จะมีการสร้างเขื่อน (ตามแนวเส้นน้ำเงิน)

2. ระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมิถุนายน 2557-สิงหาคม 2558 โดยออกเก็บตัวอย่างเป็นช่วงๆ 6 ครั้ง ในระหว่างเดือนที่กำหนด เพื่อให้เป็นข้อมูลที่เป็นตัวแทนของฤดูฝน (มิถุนายน-สิงหาคม) (2 ครั้ง) ฤดูหนาว (พฤศจิกายน-ธันวาคม) (2 ครั้ง) และฤดูแล้ง (มีนาคม-พฤษภาคม) (2 ครั้ง)

3. การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมกับแต่ละลักษณะของพื้นที่ ได้แก่

- 3.1. การใช้วนตาถี่
- 3.2. การช้อนด้วยสวิง
- 3.3. การรวบรวมปลาจากท่าขึ้นปลา ตลาด หรือชาวประมงในเขตท้องที่ที่ศึกษา

ตัวอย่างปลาจะมีการถ่ายรูปและหากมีจำนวนหลายตัวจะนำมาดองด้วยสารละลายฟอร์มาลิน 10% นำกลับห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบและจำแนกชนิดโดยใช้คู่มือการจำแนกชนิดของปลาของคณะประมง (2542) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการวิจัย

1. ลักษณะทางภูมิศาสตร์และสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำ

ลักษณะของลำน้ำแม่वंงก์เป็นลำน้ำขนาดเล็ก มีแก่งหินกั้นเป็นระยะๆ (ภาพ 3-A, 3-B) ทำให้มีแอ่งน้ำแยกออกจากลำน้ำเป็นบางบริเวณ (ภาพ 3-C) ด้วยพื้นที่ที่มีความลาดชันเป็นส่วนใหญ่ จึงมีพื้นที่ราบข้างลำน้ำน้อย ข้างลำน้ำส่วนใหญ่เป็นป่าหญ้า และมีบางบริเวณที่มีลักษณะเป็นหาดแคบๆ ลักษณะเช่นนี้ทำให้มีร่องน้ำตรงกลางและด้านข้างเป็นบริเวณที่น้ำท่วมถึงในฤดูน้ำหลาก (ภาพ 3-E, 3-F) ทำให้มีน้ำไหลแรงในบริเวณร่องน้ำ แต่บริเวณข้างๆ กระแสน้ำไหลช้า ส่วนที่เป็นแก่งหินจะให้ลักษณะที่ทำให้น้ำแตกเป็นฟองซึ่งเป็นข้อดีในการช่วยเพิ่มออกซิเจนแก่แหล่งน้ำ (ภาพ 3-B) ส่วนใหญ่มีระดับความลึกไม่มากนัก น้ำใสมีตะกอนน้อย ท้องน้ำมีสาหร่ายค่อนข้างมาก (ภาพ 3-E, 3-H) ลักษณะต่างๆ ดังกล่าวจึงเป็นลักษณะเฉพาะที่แตกต่างไปจากลำน้ำขนาดใหญ่ทั่วไป

2. ค่าความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิของน้ำ

น้ำมีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วง pH 6-7 (วัดด้วยกระดาษอินดิเคเตอร์ ซึ่งเหมาะสำหรับการออกภาคสนามมากกว่าการนำ pH meter ออกไป ดังนั้นจึงไม่สามารถบอกค่าละเอียดได้) อุณหภูมิเฉลี่ย 23 องศาเซลเซียส



ภาพ 3. สภาพทางภูมิศาสตร์และโครงสร้างทางกายภาพของลำน้ำ

3. ชนิดของปลาที่สำรวจพบ

พบปลาจำนวน 17 วงศ์ ได้แก่

1. วงศ์ปลากราย (Family Notopteridae) ได้แก่ ปลาสลาด ปลาทองลาย ปรางกราย
2. วงศ์ปลาหลังเขียว (Family Clupeidae) ได้แก่ ปลาชีวก้าว
3. วงศ์ปลาตะเพียน ชิว สร้อย (Family Cyprinidae) ได้แก่ ปลาแปบควาย ปลาชีวกวาย ปลาชีวหางแดง ปลาตะเพียนขาว ปลาตะเพียนทอง ปลาตะเพียนทราย ปลาแก้มขำ ปลากระแห ปลากระสุบซิด
4. วงศ์ปลาจิ้งจก (Family Balitoridae) ได้แก่ ปลาอืด
5. วงศ์ปลาหมอ (Family Cobitidae) ได้แก่ ปลารากกกกล้วย ปลาหมอข้างลาย ปลาหมอคอก
6. วงศ์ปลาสร้อยน้ำผึ้ง (Family Gyrinocheilidae) ได้แก่ ปลาแขยงหิน ปลาแขยงข้างลาย ปลา กดคัง ปลา กดเหลือง ปลา กดหม้อ
7. วงศ์ปลาเนื้ออ่อน (Family Siluridae) ได้แก่ ปลาปักไถ่หนวดยาว
8. วงศ์ปลาดุก (Family Clariidae) ได้แก่ ปลาดุกด้าน ปลาดุกอูย ปลาดุกเอ็น
9. วงศ์ปลาจิ้มฟันจระเข้ (Family Syngnathidae) ได้แก่ ปลาจิ้มฟันจระเข้ยักษ์
10. วงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae) ได้แก่ ปลาหลด ปลาหลดลาย ปลาหลดหลังจุด
11. วงศ์ปลาแป้นแก้ว (Family Ambassidae) ได้แก่ ปลาแป้นแก้วยักษ์ ปลากระจก
12. วงศ์ปลาบู่ทราย (Family Eleotrididae) ได้แก่ ปลาบู่ ปลาบู่ทราย
13. วงศ์ปลาหมอ (Family Anabantidae) ได้แก่ ปลาหมอไทย
14. วงศ์ปลาสลิด กัด กริม (Family Belontiidae) ได้แก่ ปลากระตี่นาง ปลากระตี่หม้อ
15. วงศ์ปลาแรด (Family Osphronemidae) ได้แก่ ปลาแรด
16. วงศ์ปลาช่อน (Family Channidae) ได้แก่ ปลาช่อน
17. วงศ์ปลาปักเป้า (Family Tetraodontidae) ได้แก่ ปลาปักเป้าสุวัตถิ

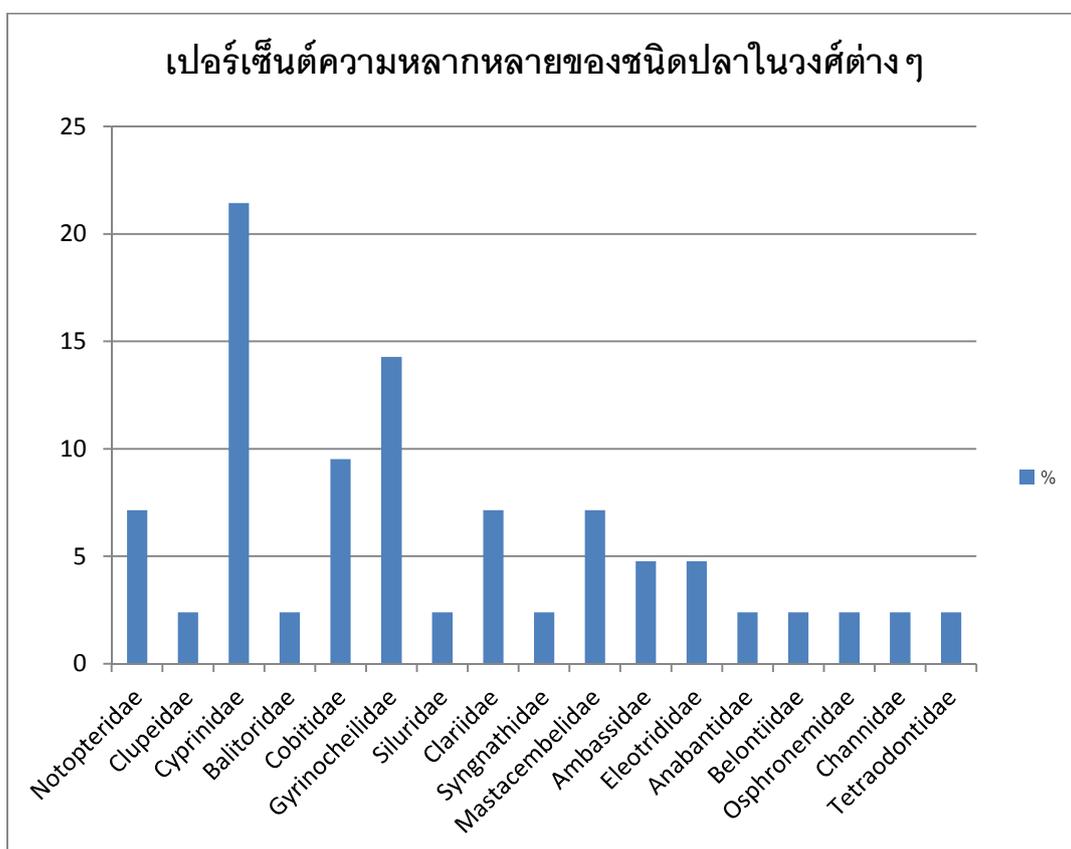
ใน 17 วงศ์ ที่พบเป็นปลาที่จัดอยู่ใน 27 สกุล 42 ชนิด ดังตาราง 1 กราฟ 1 และภาพปลาตัวอย่างบางชนิด ดังแสดงในภาพ 4

ตาราง 1. การจำแนกชนิดของปลาที่สำรวจพบในพื้นที่

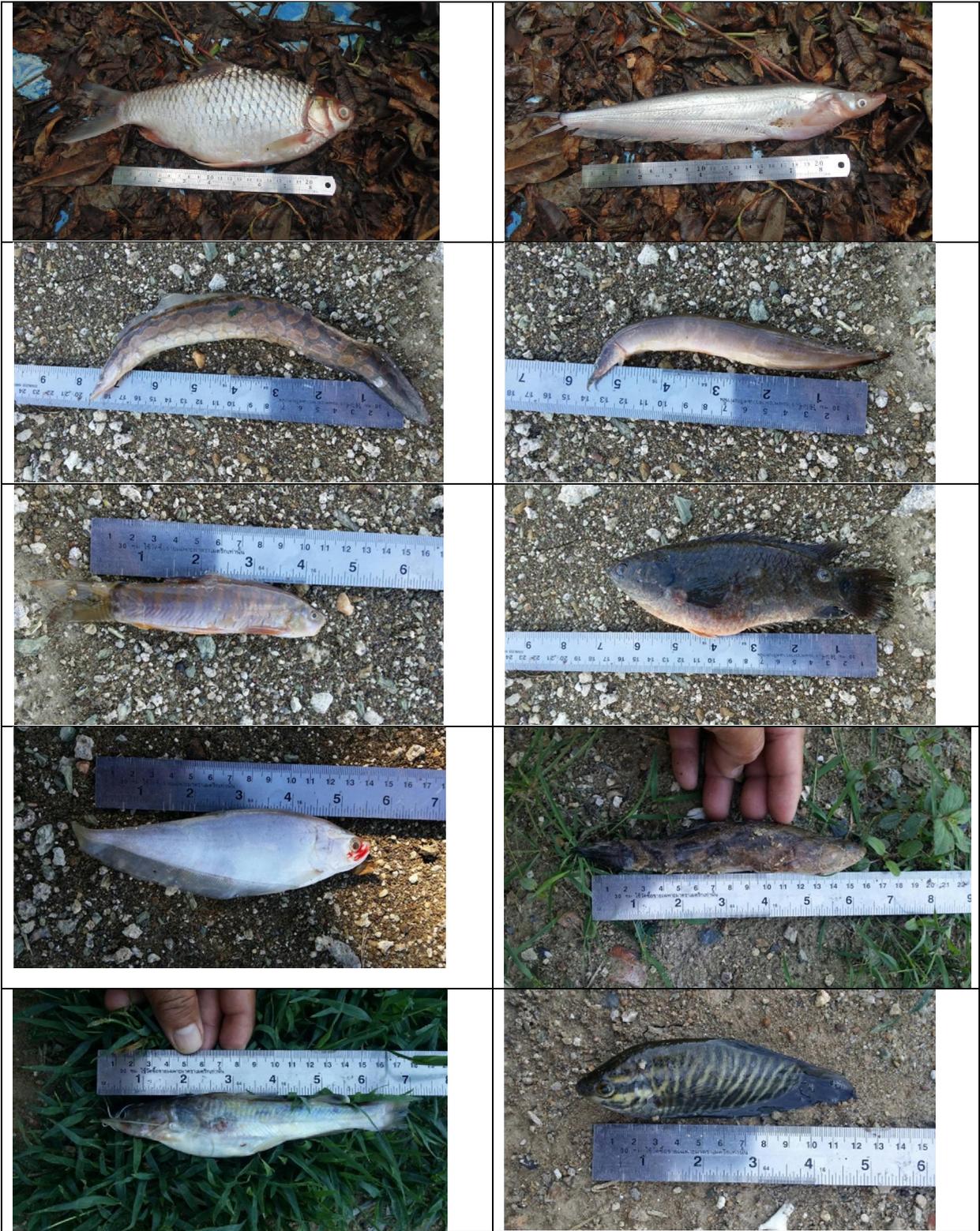
Family	Genus	Species	
Notopteridae	<i>Notopterus</i>	<i>Notopterus notopterus</i> Pallas (1769)	
	<i>Chitala</i>	<i>Chitala balanci</i> d' Aubenton (1965) <i>Chitala ornata</i> Gray (1831)	
	<i>Clupeichthys</i>	<i>Clupeichthys aesarnensis</i> Wongratana (1983)	
Clupeidae	<i>Clupeichthys</i>	<i>Clupeichthys aesarnensis</i> Wongratana (1983)	
Cyprinidae	<i>Paraluabuca</i>	<i>Paraluabuca riveroi</i> Fowler (1935) <i>Paraluabuca typus</i> Bleeker (1865)	
	<i>Rasbora</i>	<i>Rasbora aurotaenia</i> Tirant (1885) <i>Rasbora borapetensis</i> Smith (1934)	
	<i>Barbonymus</i>	<i>Barbonymus gonionotus</i> Bleeker (1850) <i>Barbonymus altus</i> Gunther (1868) <i>Barbonymus schwanenfeldii</i> Bleeker (1853)	
	<i>Puntius</i>	<i>Puntius brevis</i> Bleeker (1850)	
	<i>Hampala</i>	<i>Hampala macrolepidota</i> Kuhl & Van Hasselt (1823)	
	<i>Systemus</i>	<i>Systemus orphoides</i> Val. in Cuv. & Val. (1842)	
	<i>Acanthocobitis</i>	<i>Acanthocobitis botia</i> Hamilton (1822)	
Cobitidae	<i>Acanthopsis</i>	<i>Acanthopsis thiemmethdi</i> Sontirat (1997)	
	<i>Botia</i>	<i>Botia helodes</i> Sauvage (1876) <i>Botia morleti</i> Tirant (1885)	
	<i>Pseudomystus</i>	<i>Pseudomystus siamensis</i> Regan (1913)	
Gyrinocheilidae	<i>Mystus</i>	<i>Mystus artifasciatus</i> Fowler (1937) <i>Mystus mysticetus</i> Roberts (1992)	
	<i>Hemibragus</i>	<i>Hemibragus filamentus</i> Fang & Chaux (1949) <i>Hemibragus nemurus</i> Val.in Cuv. & Val. (1839) <i>Hemibragus wyckii</i> Bleeker (1858)	
	<i>Kryptopterus</i>	<i>Kryptopterus dissitus</i> Ng (2001)	
	Clariidae	<i>Clarias</i>	<i>Clarias batrachus</i> Linnaeus (1758) <i>Clarias macrocephalus</i> Gunther (1864) <i>Clarias sp.1</i>
		<i>Dorytichthys</i>	<i>Dorytichthys boaja</i> Bleeker (1851)
Mastacembelidae		<i>Macrognathus</i>	<i>Macrognathus circumcinctus</i> Hora (1924) <i>Macrognathus siamensis</i> Gunther (1861) <i>Macrognathus semiocellatus</i> Roberts (1986)
	<i>Parambassis</i>	<i>Parambassis wolffii</i> Bleeker (1851)	
	Ambassidae	<i>Parambassis</i>	

		<i>Parambassis siamensis</i> Fowler (1937)
Eleotrididae	<i>Oxyeleotris</i>	<i>Oxyeleotris mamorata</i> Bleeker (1852)
	<i>Ophiocara</i>	<i>Ophiocara porocephala</i> Val.in Cuv. & Val. (1837)
Anabantidae	<i>Anabas</i>	<i>Anabas testudineus</i> Bloch (1972)
Belontiidae	<i>Trichogaster</i>	<i>Trichogaster microlepis</i> Gunther (1861)
		<i>Trichogaster trichopterus</i> Pallas (1770)
Osphronemidae	<i>Osphronemus</i>	<i>Osphronemus goramy</i> Lacepede (1802)
Channidae	<i>Channa</i>	<i>Channa striata</i> Bloch (1797)
Tetraodontidae	<i>Monotrete</i>	<i>Monotrete suvatti</i> Sontirat (1985)

ชนิดที่พบมากที่สุดเป็นปลาที่อยู่ในวงศ์ตะเพียน ชิว สร้อย (Cyprinidae) เป็นจำนวน 5 สกุล 9 ชนิด



กราฟ 1. เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของชนิดปลาในวงศ์ต่างๆ ที่สำรวจพบ











ภาพ 4. ตัวอย่างปลาบางชนิดที่สำรวจพบในท้องที่

3. การกระจายของสังคมปลา

พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างจุดที่ทำการศึกษา ปลาทุกวงศ์สามารถพบได้ในขอบเขตที่ศึกษา และไม่พบความแตกต่างในฤดูกาล ทั้งนี้เพราะในรอบปีที่ศึกษาไม่พบความแตกต่างระหว่างฤดูน้ำหลากและฤดูน้ำน้อย เนื่องจากฝนทิ้งช่วงยาวนานและมีภาวะแล้งจัด

อภิปรายผลและสรุป

จากการศึกษาชนิดของปลาและการกระจายตัวในครั้งนี้นับปลาน้ำจืดทั้งหมด 17 วงศ์ 27 สกุล 42 ชนิด ซึ่งจะเห็นได้ว่าแตกต่างไปจากที่มีผู้สำรวจก่อนหน้านี้ ซึ่งมีรายงานว่าพบ 60 กว่าชนิด (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2542; สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2542) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการสำรวจครั้งนี้ทำในขอบเขตที่แคบเกินไป เนื่องจากความชำนาญในการเดินป่าของผู้วิจัยเป็นข้อจำกัดในการเข้าถึงพื้นที่ และจำนวนครั้งของการสำรวจอาจยังไม่เพียงพอ ข้อมูลที่ได้จึงไม่ครอบคลุม อีกทั้งปีที่สำรวจเป็นปีที่ฝนทิ้งช่วงและมีภาวะแล้งยาวนาน อาจเป็นปัจจัยที่เป็นตัวแปรทำให้ปริมาณปลาลดลงและหายากขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบปลาชนิดใหม่เพิ่มขึ้นจากเดิมที่เคยมีการสำรวจพบแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่สำรวจพบชนิดของปลาน้อยกว่าที่พบจากการสำรวจก่อนหน้านี้ ก็ไม่สามารถจะกล่าวยืนยันได้ว่าการสูญหายไปของพันธุ์ปลาแต่อย่างใด ทั้งนี้เพราะผลจากภาวะฝนทิ้งช่วงและฝนแล้งที่ยาวนาน จึงไม่ก่อให้เกิดภาวะน้ำหลากและส่งผลให้ไม่เกิดการกระจายตัวของพันธุ์ปลา แต่ถึงแม้ว่าจำนวนชนิดของปลาที่พบมีน้อยกว่าข้อมูลเดิม จากข้อมูลก็ยังคงแสดงให้เห็นว่าพื้นที่นี้ยังคงมีความหลากหลายชนิดของสายพันธุ์ปลากว่า 40 ชนิด ซึ่งหากมีการดูแลสภาพแวดล้อม หรืออนุรักษ์ให้คงไว้ในสภาพเดิมจำนวนปลาที่มีอยู่ น่าจะเพิ่มจำนวนได้อีก ข้อเสนอแนะในการสำรวจต่อไปคือการเก็บตัวอย่างให้ถี่ขึ้นและครอบคลุมพื้นที่ให้มากขึ้นกว่าเดิม

บรรณานุกรม

- กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 2542. แผนแม่บทอุทยานแห่งชาติแม่วังก์.
คณะประมง. 2542. คู่มือวิเคราะห์พรรณปลา. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
297 หน้า.
- ชวลิต วิทยานนท์ และคณะ. 2541. ความหลากหลายชนิดของปลาน้ำจืดในประเทศไทย. สำนักงาน
นโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม.
- นณณ์ ผาณิตวงศ์. 2555. สัมมนาวิชาการ “โครงการก่อสร้างเขื่อนแม่วังก์” เมื่อวันที่ 28 มิถุนายน
2555. ห้องนนทรี 1 เคยูโฮม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุจินต์ หนูขวัญ และอรุณี รอดลอย. 2552. 100 ชนิดปลาสวยงามของไทย. โรงพิมพ์ดอกเปื้อย.
กรุงเทพฯ. 116 หน้า.
- สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2542. พื้นที่ชุ่มน้ำภาคเหนือ.
- Liermann et al. 2012. Implications of Dam Obstruction for Global Freshwater Fish
Diversity. *Bioscience*, 62(6): 539-548.
- Sala, OE. et al. 2000. Global Biodiversity Scenarios for the year 2100. *Science*, 287:
1770-1774.
- Vidthayanon, C. 2004. *Manual of Freshwater Fishes*. Sarakadee press, Bangkok,
Thailand. p.232.
- Vidthayanon, C. 2005. *Thailand Red Data Fishes*. Office of Natural Resources and
Environmental Policy and Planning, Bangkok, Thailand. p.108.

รายชื่อผู้รับผิดชอบโครงการ

1. หัวหน้าโครงการ

นายสุริศักดิ์ ประสานพันธ์

ตำแหน่งปัจจุบัน หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก
รหัสไปรษณีย์ 65000

โทรศัพท์ 055-963300 โทรสาร 055-963301

e-mail: surisakp@nu.ac.th

2. ผู้ร่วมโครงการ

นายสุธน เวียงดาว

ตำแหน่งปัจจุบัน หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ กม.65 ถนนคลองลาน-อุ้มผาง อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร
รหัสไปรษณีย์ 65000

โทรศัพท์ 089-8958533



รายงานการวิจัย

โครงการย่อยที่ 5

ความหลากหลายของแมงมุม (Order Araneae) ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Species diversity of Spider (Order Araneae) in Mae Wong National Park

อุบลวรรณ บุญฉ่ำ* Ubolwan Booncham

สุธน เวียงดาว** Suthon Weingdow

*คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

**อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปี พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นโครงการย่อยที่ 5 เรื่อง ความหลากหลายของแมงมุม (Order Araneae) ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ภายใต้โครงการเรื่อง “ความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2557 ทำให้การทำวิจัยเป็นไปได้เป็นอย่างดี ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ ผู้ที่มีความสำคัญในการบริหารโครงการทำให้โครงการย่อยสามารถดำเนินการได้ด้วยดี คุณสุรณ เวียงดาว หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืชที่อนุญาตในการเข้าศึกษาในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ และเจ้าหน้าที่ทุกๆท่านที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในขณะที่ทำวิจัยในพื้นที่ คุณประสิทธิ์ วงษ์พรมที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ชนิดของแมงมุม ตลอดจนนิสิตผู้ช่วยวิจัยและเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาผู้มีส่วนช่วยในการวิจัยครั้งนี้ และสุดท้ายขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ได้ให้การสนับสนุนสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆในการทำวิจัยมาโดยตลอด

อุบลวรรณ บุญฉ่ำ

ความหลากหลายของแมงมุม (Order Araneae) ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

บทคัดย่อ

การศึกษาคความหลากหลายของแมงมุมในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยการสำรวจ แมงมุม Order Araneae ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ.2557 ถึง สิงหาคม 2558 การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดจำแนกและวิเคราะห์ชนิดของแมงมุมที่พบในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จากการสำรวจครั้งนี้พบทั้งหมด 21 วงศ์ ได้แก่ Araneidae, Agelenidae, Deinopidae, Gnaphosidae, Hersilia, Lycosidae, Linyphiidae, Nemesiidae, Nephilidae, Oxyopidae, Pholcidae, Pisauridae, Salticidae, Selenopidae, Sparassidae, Tetragnathidae, Theridiidae, Theraphosidae, Thomisidae, Uloboridae และ Zodariidae และจำแนกได้ 40 สกุล 129 ชนิด และยังมีอีกหลายชนิดที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ อีกทั้งจะได้วิเคราะห์ดัชนีต่างๆทางด้านนิเวศวิทยา สร้างคู่มือในการจำแนกชนิด (Dichotomous key) ตลอดจนสร้างฐานข้อมูล (database) และทำบัญชีรายชื่อตัวอย่าง (Catalogue) ของแมงมุมที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ สำหรับไว้ใช้เป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและการอนุรักษ์แมงมุมในพื้นที่ต่อไป

คำสำคัญ อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ แมงมุม Order Araneae

Species diversity of Spider (Order Araneae) in Mae Wong National Park

Abstract

The diversity of spider (Order Araneae) in Mae Wong National Park by exploring since September 2014 to August 2015, this study aims to identify and analyze species of spider. They were found 21 families include Araneidae, Agelenidae, Deinopidae, Gnaphosidae, Hersilia, Lycosidae, Linyphiidae, Nemesiidae, Nephilidae, Oxyopidae, Pholcidae, Pisauridae, Salticidae, Selenopidae, Sparassidae, Tetragnathidae, Theridiidae, Theraphosidae, Thomisidae, Uloboridae and Zodariidae. There are 40 genus, 129 species and unidentified specimens. These data will be analyzed with ecological index, created the Identification Guide (Dichotomous key) and created catalogue and database of spider species. It will be good resources for use as a source of spider background information for the study and conservation in the future.

Key words Mae Wong National Park, Spider, Araneae

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย Abstract	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2
ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย	3
ผลการวิจัย	3
อภิปรายและวิจารณ์ผล	12
สรุปผลและอภิปรายผล	12
บรรณานุกรม	13

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. จำนวนชนิดของแมงมุมที่สำรวจพบในพื้นที่สำรวจในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (สำรวจเดือนกันยายน 2557 - สิงหาคม 2558)	5
ตารางที่ 2. จำนวนชนิดของแมงมุมที่วิเคราะห์ถึงระดับสกุล (สำรวจเดือนกันยายน 2557 - สิงหาคม 2558)	7

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1. พื้นที่ทำการสำรวจชนิดของแมงมุม ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ บริเวณพื้นที่ทำการอุทยานฯ บริเวณช่องเย็น และหน่วยพิทักษ์ป่าแม่เระวา	4
ภาพที่ 2. เปอร์เซ็นต์ของจำนวนชนิดที่พบในแตงวงศ์ของแมงมุมที่พบในพื้นที่สำรวจของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	5
ภาพที่ 3. 1. Family Thomisidae : <i>Thomisus stoliczka</i> ,2. Family Theridiidae: <i>Steatoda grossa</i> , 3. Family Theridiidae : <i>Coleosoma blandum</i> ,4. Family Nemesiidae: <i>Calisoga</i> sp., 5. Family Theridiidae 6. Family Pisauridae: <i>Pisaurina</i> sp., 7. Family Gnaphosidae : <i>Micaria formicaria</i> ,8-9. Family Araneidae: <i>Anepsion</i> sp., and <i>Cyclosa</i> sp., 10 . Family Theridiidae : <i>Argyrodes</i> sp.11 Family Nephilidae: <i>Nephila</i> sp.	6
ภาพที่ 4. แมงมุมหลังนาม สกุล <i>Gastercantha</i> 1. <i>Gastercantha hasselti</i> 2. <i>Gastercantha kuhlii</i> ที่พบในบริเวณป่าไผ่ เส้นทางศึกษาธรรมชาติป่อน้ำแร่ และ 3. <i>Gastercantha</i> sp. พบในป่าเบญจพรรณ	9
ภาพที่ 5. แมงมุมกระโดด (Jumping spider) หมายเลข 1-15 อยู่ในวงศ์ Salticidae เป็นแมงมุมที่มีจำนวนสกุลมาก และมีรายงานชนิดที่พบจำนวนมาก จำนวนที่พบในบริเวณสำรวจพบมีความหลากหลายมาก โดย หมายเลข 13-14 คือ <i>Phintella vittata</i> (C. L. Koch; 1845)	10
ภาพที่ 6. ตัวอย่างแมงมุมที่สำรวจพบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์เช่น วงศ์ Tetragnathidae (1-5) 1. <i>Opadometa</i> sp 1 ,2. <i>Leucauge decorata</i> 3. <i>Opadometa</i> sp 2 4. <i>Pachygnatha</i> sp1. 5. <i>Pachygnatha</i> sp2. วงศ์ Theridiidae (6-8) 6, <i>Theridion</i> 7. <i>Tetragnatha mandibulata</i> 8 <i>Dolichognatha</i> sp วงศ์ Nephilidae (10) 10 <i>Nephilengys</i> cf. <i>malabarensis</i> วงศ์ Araneidae (9, 11-12) <i>Cyclosa</i> sp 12. <i>Neoscona</i> sp 15. <i>Eriovixia</i> sp. วงศ์ Sparassidae (13-14) 13-14 <i>Heteropoda</i> sp.	11

รายงานวิจัย

โครงการย่อยที่ 5 ความหลากหลายของแมงมุม (Order Araneae) ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

บทนำ

แมงมุมเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง แมงมุนั้นมีความสามารถในการอดทนอยู่ในสภาพที่ขาดอาหารได้นาน มีการปรับตัวได้ดีในธรรมชาติ มีการเพิ่มจำนวนประชากรได้รวดเร็ว และพบได้พื้นที่ต่างๆได้หลากหลาย แมงมุมแต่ละชนิดสร้างรูปแบบของเส้นใยที่แตกต่างกันไป เส้นใยของแมงมุมหลายชนิดมีความเหนียวและทนทานต่อความร้อนสูง และสามารถใช้อุปกรณ์กระสุนได้ ทางกรมแพทย์สนใจที่จะนำเอาใยแมงมุมมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับพิษวิทยาของแมงมุม แมงมุมบางชนิดเช่นแมงมุมแม่หมาดำและแมงมุมแม่หมาสีน้ำตาล มีพิษที่มีผลต่อระบบประสาท ทำให้มนุษย์เกิดอาการเจ็บปวดและบางชนิดอาจทำให้ผู้ถูกแมงมุมกัดตายได้ ในระบบนิเวศแมงมุมเป็นสิ่งมีชีวิตที่สำคัญ ทำหน้าที่เป็นผู้ล่าคอยควบคุมจำนวนของแมลงที่เป็นศัตรูพืช ในประเทศไทยยังมีการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของแมงมุก้นน้อย เช่นอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ เป็นพื้นที่หนึ่งที่มีความหลากหลายของแหล่งที่อยู่อาศัย มีความอุดมสมบูรณ์ของสภาพพื้นที่ติดต่อกับพื้นที่ป่าตะวันตก การที่มีความหลากหลายของพื้นที่นี้ก็คาดว่าจะพบแมงมุมที่หลากหลายชนิดและสามารถสร้างเป็นฐานข้อมูลเกี่ยวกับแมงมุมไว้ได้ ข้อมูลเหล่านี้ย่อมที่จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปได้ จากการศึกษาที่จะมีโครงการสร้างเขื่อนกั้นลำน้ำแม่วงก์นั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าเมื่อมีการสร้างเขื่อนสภาพพื้นที่ย่อมมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ในพื้นที่ที่ราบต่ำก็ย่อมจะถูกน้ำท่วม สภาพแหล่งที่อยู่อาศัยจะเปลี่ยนไป ย่อมมีโอกาสที่จะสูญเสียความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดไปได้ เช่นที่ศึกษาในโครงการนี้คือแมงมุม ดังนั้นการสำรวจสิ่งมีชีวิตต่างๆในพื้นที่จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็น และเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของข้อมูลพื้นฐานเพื่อการอนุรักษ์พื้นที่ต่อไป โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อจัดจำแนกและวิเคราะห์ชนิดของแมงมุมที่พบในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จัดสร้างคู่มือในการจำแนกและวิเคราะห์ชนิดของแมงมุมและทำบัญชีรายชื่อตัวอย่าง (Catalogue) สร้างฐานข้อมูลแมงมุมที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์เพื่อเป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและการอนุรักษ์ต่อไป

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ มีพื้นที่ครอบคลุม 2 จังหวัด คืออำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร และอำเภอแม่วงก์ และกิ่งอำเภอแม่เปิน จังหวัดนครสวรรค์ เป็นหนึ่งในผืนป่าตะวันตกที่มีพื้นที่ป่าสมบูรณ์มากที่สุด ตั้งแต่จังหวัดตาก จนถึงจังหวัดกาญจนบุรี มีเนื้อที่ประมาณ 558,750 ไร่ หรือ 894 ตารางกิโลเมตร พื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีอาณาเขต ติดต่อกับป่าของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ห้วยใหญ่ นครสวรรค์ สภาพภูมิประเทศเป็นเทือกเขาสูงสลับซับซ้อนเรียงรายกันอยู่ตามเทือกเขานนทชัยลดหลั่นลงมา จนถึงพื้นราบ ประมาณ 40-50 ลูก ยอดที่สูงที่สุดคือ “ยอดเขาโมโกจู” สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,964 เมตร เป็นแหล่งต้นน้ำลำธารต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ ส่วนพื้นที่ราบมีไม่มาก ส่วนใหญ่อยู่บริเวณริมแม่น้ำ พื้นที่ทิศเหนือของอุทยานฯติดกับอุทยานแห่งชาติคลองลาน ทิศใต้ติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง

จังหวัดอุทัยธานี และทิศตะวันตกติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าอุ้มผาง จังหวัดตาก ได้รับการประกาศเป็นอุทยานแห่งชาติ เมื่อวันที่ 14 กันยายน 2530 ป่าส่วนใหญ่ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ประกอบด้วยป่าเบญจพรรณ ป่าดงดิบ และป่าเต็งรัง เป็นแหล่งกำเนิดต้นน้ำลำธาร ตามเทือกเขาสูงชันก่อกำเนิดเป็นน้ำตกที่สวยงาม 4-5 แห่ง ทั้งเป็นต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ที่สำคัญของจังหวัดนครสวรรค์ นอกจากนี้ยังมีแก่งหินทำให้เกิดน้ำตกเล็กๆ ตามแก่งหินนี้ ตลอดจนมีน้ำผาที่สวยงามตามธรรมชาติ มีพันธุ์ไม้ที่สำคัญและมีค่ามากมาย เช่น สัก ประดู่ มะค่าโมง ยางแดง เต็ง รัง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสัตว์ป่าที่หายาก เช่น ช้างป่า กระต๊อง เสือ กวาง เก้ง หมู หมาย และนกต่าง ๆ มากกว่า 305 ชนิด จาก 53 วงศ์ ซึ่งนกบางชนิดพบเพียงไม่กี่แห่งในประเทศไทย เช่น นกกระเต็นขาวดำใหญ่ นกเงือกคอแดง นกกางเขนดง นกโพระดกหูเขียว เป็นต้น (<http://www.siamfreestyle.com/travel-attraction/kampaengpetch.html>)

แมงมุมเป็นสัตว์ขาข้อใน Class Arachnida, Order Araneae มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ โดยทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมจำนวนประชากรแมลงศัตรูพืช เช่นแมงมุมใยกลมที่เรียกทั่วไปว่า orb-weavers วงศ์ Araneidae เป็นแมงมุมที่มีการดำรงชีวิตบนใย และดักจับเหยื่อด้วยการชักใยระหว่างกิ่งไม้ กระจายในพื้นที่ที่มีความหลากหลายทั้งป่าธรรมชาติ สวนผลไม้ไร่นา ริมลำธาร เป็นต้น เนื่องจากแมงมุมมีการปรับตัวเข้ากับสภาพต่างๆ ได้ดี มีความสามารถในการทนต่อสภาพที่ขาดอาหารได้เป็นเวลานาน แมงมุมมีความสามารถในการออกไข่ และฟักไข่ออกมาเป็นตัวได้ปริมาณมากจึงมีโอกาสมากที่จะพบแมงมุมในสภาพแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย ในปัจจุบันได้มีการรวบรวมรายชื่อแมงมุมที่พบทั่วโลกประมาณ 39,725 ชนิด 3,677 สกุล 108 วงศ์ (ประสิทธิ์ วงษ์พรหม, 2550) จากที่มีรายงานชนิดแมงมุมที่พบทั่วโลกในปัจจุบันพบ 48,678 ชนิด 3,898 สกุล 112 วงศ์ (Platnick, N.L. and Raven, R.J., 2013) โดยแบ่งแมงมุมได้เป็น 2 Suborder คือ Opisthothelae และ Mygalomorphae (Kaston, 1972) ในปัจจุบันได้มีการศึกษาทางพิษวิทยาของแมงมุม และเมื่อเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2555 ที่ผ่านมานี้ ได้มีรายงานว่า มีผู้ที่ได้รับบาดเจ็บและเสียชีวิตเนื่องจากถูกแมงมุมกัดในประเทศไทย โดยสำนักกระบาด กรมควบคุมโรค ได้รายงานว่ามีผู้ป่วยที่ได้รับพิษแมงมุม ระหว่างปีพ.ศ. 2546-2554 มีทั้งสิ้น 43 ราย แต่ไม่มีรายงานเสียชีวิต มีแมงมุมประมาณ 50 ชนิดที่สามารถกัดและแทงทะลุเข้าผิวหนัง มนุษย์และปล่อยพิษ ทำให้เกิดอาการบาดเจ็บและเสียชีวิตได้ ซึ่งจากข้อมูลการรักษาผู้ป่วยจากพิษแมงมุมของแพทย์ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่มาโรงพยาบาล ถูกกัดโดยแมงมุม 2 ชนิดได้แก่ แมงมุมแม่หมาดำ Black widow (genus *Latrodectus*) และแมงมุมสีน้ำตาล Brown recluse (genus *Loxosceles*) ซึ่งนักกีฏวิทยาเชื่อว่า แมงมุมชนิดนี้น่าจะมีการแพร่กระจายในชุมชนต่างๆ ในประเทศไทยแล้ว (แสงโสม ศิริพานิช และ พรรณนภา เหมือนผึ้ง, 2555) นอกจากนี้เรื่องพิษวิทยาของแมงมุมแล้ว ทุกวันนี้ นักวิทยาศาสตร์หลายคนกำลังสนใจแมงมุม เพราะได้มีการศึกษาพบว่าใยแมงมุมที่เบาและเหนียวนี้สามารถนำมาถักทอเป็นผ้าและสามารถใช้เป็นเกราะกันกระสุนได้ นอกจากนี้แพทย์ในอนาคตก็คาดหวังว่าจะใช้ใยแมงมุมเป็นด้ายเย็บแผล เพราะนอกจากใยจะไม่เป็นพิษต่อบาดแผลแล้ว ยังสามารถหดตัวเมื่อได้รับความชื้นจากแผล ทำให้มีประสิทธิภาพในการสมานแผลสูงกว่าด้ายเย็บแผลธรรมดาได้

(http://www.mwit.ac.th/~physicslab/content_01/sutut/woldspider.pdf)

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

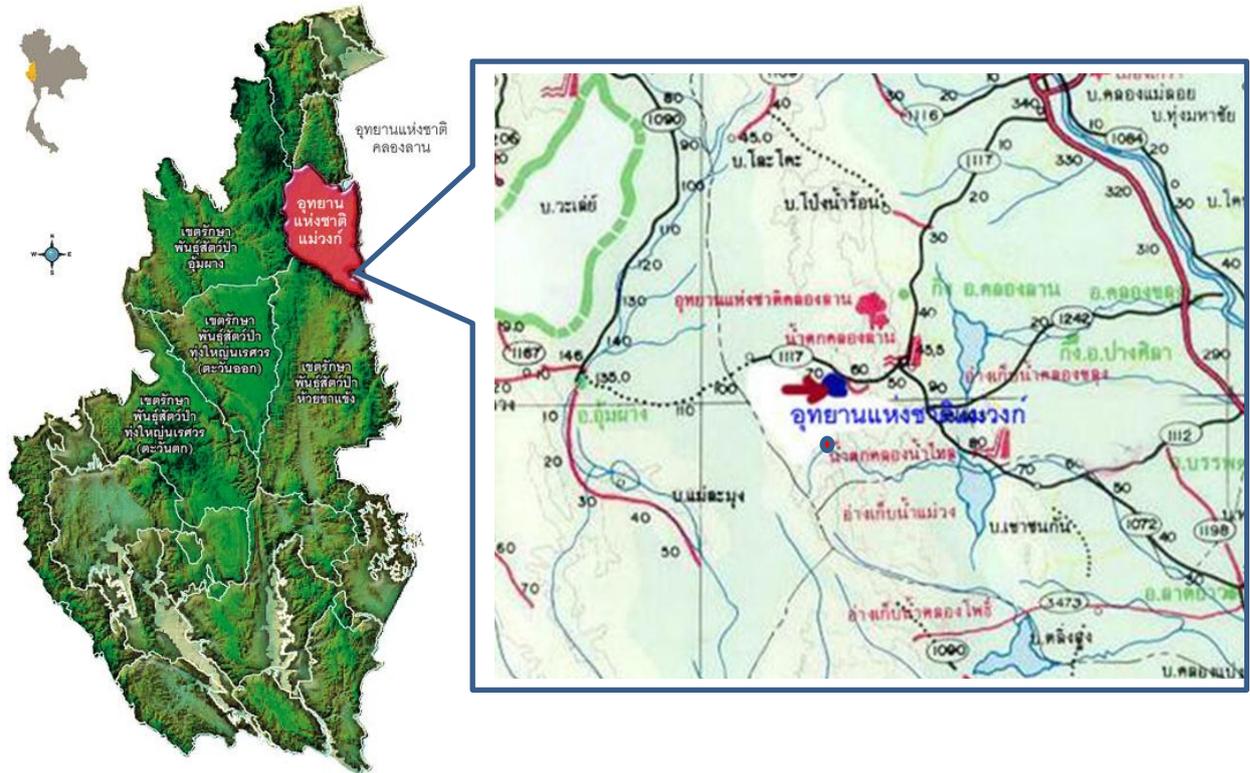
1. วางแผนเส้นทางและสุ่มพื้นที่เพื่อทำการสำรวจแมงมุมในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ โดยสำรวจตลอดทั้งปี ตั้งแต่เดือนกันยายน 2557 ถึงเดือนสิงหาคม 2558 และแบ่งสำรวจตามสภาพพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ พื้นที่ธรรมชาติ พื้นที่เกษตรกรรมและที่อยู่อาศัยของมนุษย์ ในบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ โดยได้สำรวจพื้นที่จากพื้นที่ทั้งหมด 7 บริเวณ ได้แก่ ที่ระดับความสูงประมาณ 1,200 เมตร ถึง 1,428 เมตรจากระดับน้ำทะเล ได้แก่ 1. เส้นทางสำรวจธรรมชาติคลองลาน-อุ่มผาง 2. เส้นทางสำรวจธรรมชาติระยะสั้นหน้าป่าคลองลาน-อุ่มผาง (ป่าดิบเขา) 3. เส้นทางศึกษาธรรมชาติจุดชมวิวกุสรวรรค์ (ระดับความสูง 1,428 เมตรจากระดับน้ำทะเล) และที่ระดับความสูงประมาณ 500 เมตร ถึง 1,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล ได้แก่ 1. บริเวณหน่วยจัดการต้นน้ำขุนลาน (ป่าเบญจพรรณ และลำธารน้ำ) 2. บริเวณโครงการฟื้นฟูป่าเพื่อการอนุรักษ์ดินและน้ำ (ป่าที่กำลั้งฟื้นฟู) 3. เส้นทางศึกษาธรรมชาติบ่อน้ำแร่ (ป่าไผ่) 4. บริเวณโดยรอบที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จังหวัดกำแพงเพชร และที่บริเวณแก่งนกยูง หน่วยพิทักษ์ป่าแม่เฒ่า จังหวัดนครสวรรค์ (ภาพที่ 1)

2. การสุ่มพื้นที่เพื่อสำรวจแมงมุมในเส้นทางธรรมชาติที่เป็นพื้นที่ โดยใช้ระยะทาง 100 เมตร และสำรวจทั้งบนต้นไม้ ที่ซีกใบ และอยู่ตามพื้นดิน เป็นพื้นที่ 2,000 ตารางเมตร โดยใช้ระยะเวลาในการสำรวจประมาณ 3 ชั่วโมงต่อพื้นที่) เข้าไปในพื้นที่ในลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัยต่างๆเช่น ในป่าธรรมชาติ พื้นที่เกษตรกรรม และแหล่งที่อยู่อาศัย เก็บตัวอย่างแมงมุมในแอลกอฮอล์ 70 % ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นตัวอย่างต้นแบบและเพื่อใช้ศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา และเป็นตัวอย่างเก็บไว้ที่อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ บันทึกรายละเอียดวันที่เก็บ เวลาที่พบ สถานที่เก็บ พืชอาศัย สภาพพื้นที่ของถิ่นอาศัย๓. บันทึกตำแหน่งที่พบตัวอย่างแมงมุมและความสูงจากระดับน้ำทะเลด้วยเครื่องกำหนดพิกัดบนพื้นผิวโลก (GPS) ยี่ห้อ Garmin รุ่น *GPSmap 60CSx* เพื่อนำข้อมูลไปทำแผนที่การแพร่กระจายของแมงมุมแต่ละชนิด

3. จำแนกและวิเคราะห์ชนิดโดยใช้คู่มือจัดจำแนกชนิดจากเอกสารทางวิชาการต่างๆเช่น วิภาดา วังศิลาบัต (2544), Kaston (1972), Levi (1996, 2002, 2005), Motta and Levi (2009), Scharff and Coddington (1997), Smith and Levi (2010), Teixeira and Lise (2012) เป็นต้น และยืนยันชนิดโดยผู้เชี่ยวชาญในการจำแนกและวิเคราะห์ชนิดแมงมุม

4. ตัดหมายเลขตัวอย่างและจัดทำบัญชีรายชื่อตัวอย่างและสร้างฐานข้อมูลแมงมุมที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วังก์พร้อมภาพประกอบ

5. ถ่ายภาพโดยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายใต้กล้องสแตอริโอ และดำเนินการวาดภาพลายเส้นเพื่อแสดงลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและสร้างคู่มือในการจัดจำแนกและวิเคราะห์ชนิดแมงมุมที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วังก์



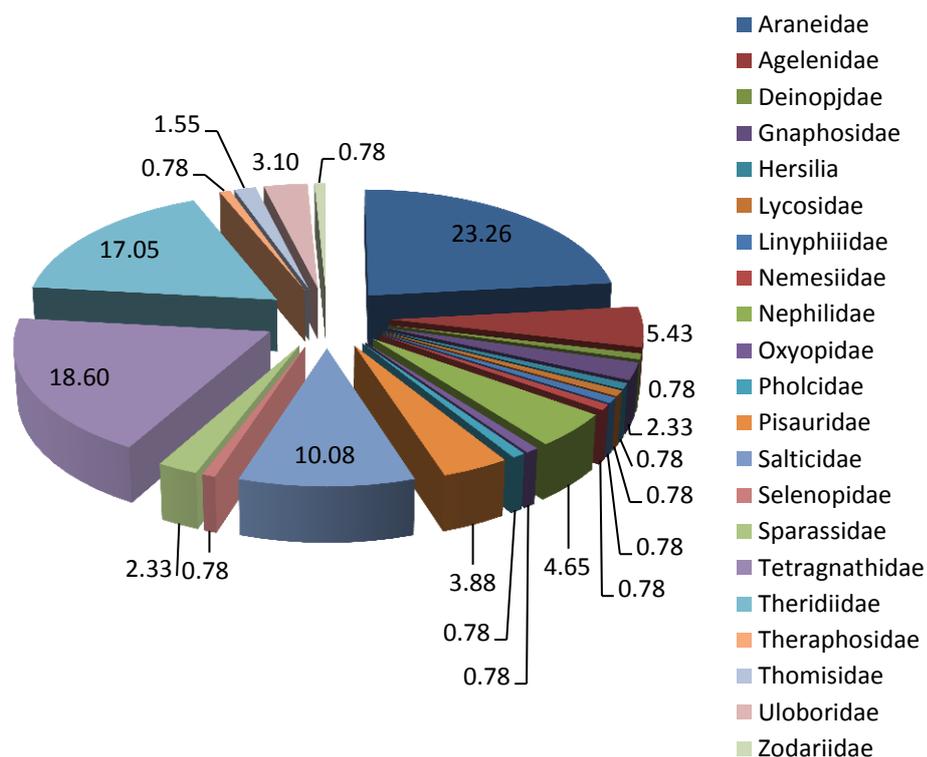
ภาพที่ 1 พื้นที่ทำการสำรวจชนิดของแมงมุม ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ บริเวณพื้นที่ทำการอุทยานฯ บริเวณช่องเย็น และหน่วยพิทักษ์ป่าแม่เรวา ที่มา: <http://www.sarakadee.com/2012/10/17/maewong-dam/>

ผลการวิจัย

จากการสำรวจจำนวนชนิดของแมงมุมในช่วงเดือน กันยายน 2557 ถึงสิงหาคม 2558 ในบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ สามารถพบได้ในลักษณะของแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลายและเกือบทุกพื้นที่ ทั้งที่เป็นสภาพธรรมชาติและบริเวณที่เป็นสิ่งปลูกสร้างได้แก่บ้านอาคารที่พักต่างๆ โดยในรายงานฉบับนี้จำแนกตัวอย่างแมงมุมที่พบในพื้นที่สำรวจได้ ๒๑ วงศ์ ได้แก่ Agelenidae, Araneidae, Deinopidae, Gnaphosidae, Hersilia, Linyphiidae, Lycosidae, Nephilidae, Nemesiidae, Oxyopidae, Pholcidae, Pisauridae, Salticidae, Selenopidae, Sparassidae, Tetragnathidae, Theridiidae, Theraphosidae, Thomisidae, Uloboridae, และ Zodariidae ดังตารางที่ 1 และสามารถจำแนกถึงในระดับสกุลและชนิดได้(ตารางที่ 2) แมงมุมในวงศ์ Araneidae พบจำนวนชนิดมากที่สุดถึง 30 ชนิด รองลงมาคือ วงศ์ Tetragnathidae พบ 24 ชนิด และวงศ์ Theridiidae พบ 22 ชนิด (ภาพที่ 2) และได้แสดงตัวอย่างของแมงมุมที่พบในพื้นที่สำรวจ (ภาพที่ 3) และแมงมุมบางชนิด สกุล *Gastercantha* เช่นชนิด *Gastercantha hasselti* และ *Gastercantha kuhlii* พบเฉพาะในป่าไผ่ ป่าเบญจพรรณ (ภาพที่ 4) แมงมุมแต่ละชนิดจะพบในสภาพแหล่งที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกันไป เช่น ในวงศ์ Salticidae (ภาพที่ 5) เป็นวงศ์พบจำนวนชนิดมากพบในพื้นที่ต่างๆ ซึ่งในรายงานฉบับที่สมบูรณ์ที่จะนำเสนอ นั้นจะวิเคราะห์แยกตามสภาพพื้นที่ และวิเคราะห์ด้ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 1 จำนวนชนิดของแมงมุมที่สำรวจพบในพื้นที่สำรวจในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (สำรวจเดือนกันยายน 2557 - สิงหาคม 2558)

ลำดับที่	ชื่อวงศ์	จำนวนชนิด	เปอร์เซ็นต์	ลำดับที่	ชื่อวงศ์	จำนวนชนิด	เปอร์เซ็นต์
1	Araneidae	30	23.26	12	Pisauridae	5	3.88
2	Agelenidae	7	5.43	13	Salticidae	13	10.08
3	Deinopidae	1	0.78	14	Selenopidae	1	0.78
4	Gnaphosidae	3	2.33	15	Sparassidae	3	2.33
5	Hersilia	1	0.78	16	Tetragnathidae	24	18.60
6	Lycosidae	1	0.78	17	Theridiidae	22	17.05
7	Linyphiidae	1	0.78	18	Theraphosidae	1	0.78
8	Nemesiidae	1	0.78	19	Thomisidae	2	1.55
9	Nephilidae	6	4.65	20	Uloboridae	4	3.10
10	Oxyopidae	1	0.78	21	Zodariidae	1	0.78
11	Pholcidae	1	0.78		รวม	129	100



ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนชนิดที่พบในวงศ์ของแมงมุมที่พบในพื้นที่สำรวจของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



ภาพถ่ายโดย Chorn, S. , สุวัจน์ แน่นไพร และอุบลวรรณ บุญฉ่ำ

ภาพที่ 3. 1. Family Thomisidae : *Thomisus stoliczka* ,2. Family Theridiidae: *Steatoda grossa* ,
 3. Family Theridiidae :*Coleosoma blandum* ,4. Family Nemesiidae: *Calisoga* sp., 5. Family
 Theridiidae 6. Family Pisauridae: *Pisaurina* sp., 7. Family Gnaphosidae : *Micaria formicaria* ,8-9.
 Family Araneidae: *Anepsion* sp., and *Cyclosa* sp., 10 . Family Theridiidae : *Argyrodes* sp.11
 Family Nephilidae: *Nephila* sp.

ตารางที่ 2 จำนวนชนิดของแมงมุมที่สำรวจเดือนกันยายน 2557 – สิงหาคม 2558

Family	Genus	Species	
Araneidae Simon, 1895	<i>Argiope</i> Audoulin, 1826	<i>Argiope</i> cf. <i>pulchella</i> <i>Argiope</i> sp.	
	<i>Anepsion</i> Strand, 1929	<i>Anepsion</i> sp.	
	<i>Cyclosa</i> Menge, 1866	<i>Cyclosa bifida</i> (Doleschall, 1859) <i>Cyclosa</i> sp.	
	<i>Gea</i> C. L. Koch, 1843	<i>Gea</i> sp.	
	<i>Gastercantha</i> Sundevall, 1833	<i>Gastercantha hasselti</i> C.L.Koch, 1838 <i>Gastercantha kuhlii</i> C.L.Koch, 1838 <i>Gastercantha</i> sp.	
	<i>Chorizopes</i> O.P.-Cambridge, 1870	<i>Chorizopes</i> sp.	
	<i>Eriovixia</i> Archer, 1951	<i>Eriovixia</i> sp.	
	<i>Neoscona</i> Simon, 1864	<i>Neoscona</i> sp.	
	Deinopidae C.L.Koch, 1851	<i>Deinopsis</i> Macleay, 1839	<i>Deinopsis spinosa</i> Marx, 1889
	Gnaphosidae Pocock, 1898	<i>Nodocion</i> Chamberlin, 1922	<i>Nodocion</i> sp.
		<i>Micaria</i> Weatring, 1851	<i>Micaria formicaria</i> (Sundevall, 1831)
Hersilidae Thorell, 1870	<i>Hersilia</i> Audouin, 1826	<i>Hersilia savignyi</i> Lucas, 1836	
Lycosidae Sundevall, 1833	<i>Pardosa</i> C.L.Koch, 1847	<i>Pardosa</i> sp.	
Nemesiidae Simon, 1892	<i>Calisoga</i> Chamberlin, 1937	<i>Calisoga</i> sp.	
Nephilidae Simon, 1894	<i>Nephilengys</i> L. Koch, 1872	<i>Nephilengys malabarensis</i> (Walckenaer, 1841) <i>Nephilengys</i> sp.	
	<i>Nephila</i> Leach, 1815	<i>Nephila pilipes</i> (Fabricius, 1793) <i>Nephila</i> sp.	
	Oxyopidae Thorell, 1870	<i>Oxyopes</i> Latreille, 1804	<i>Oxyopes</i> sp.
Pisauridae Simon, 1890	<i>Dolomedes</i> Latreille, 1804	<i>Dolomedes</i> sp.	
	<i>Pisaurina</i> Simon, 1898	<i>Pisaurina</i> sp.	
	<i>Hygropoda</i> Thorell, 1894	<i>Hygropoda</i> sp.	
	<i>Sphedanus</i> Thorell, 1877	<i>Sphedanus</i> sp.	
	Salticidae Blackwall, 1841	<i>Phintella</i> Stand, 1906	<i>Phintella vittata</i> (C.L.Koch, 1846)
<i>Harmochirus</i> Simon, 1885		<i>Harmochirus brachiatus</i> (Thorell, 1877)	

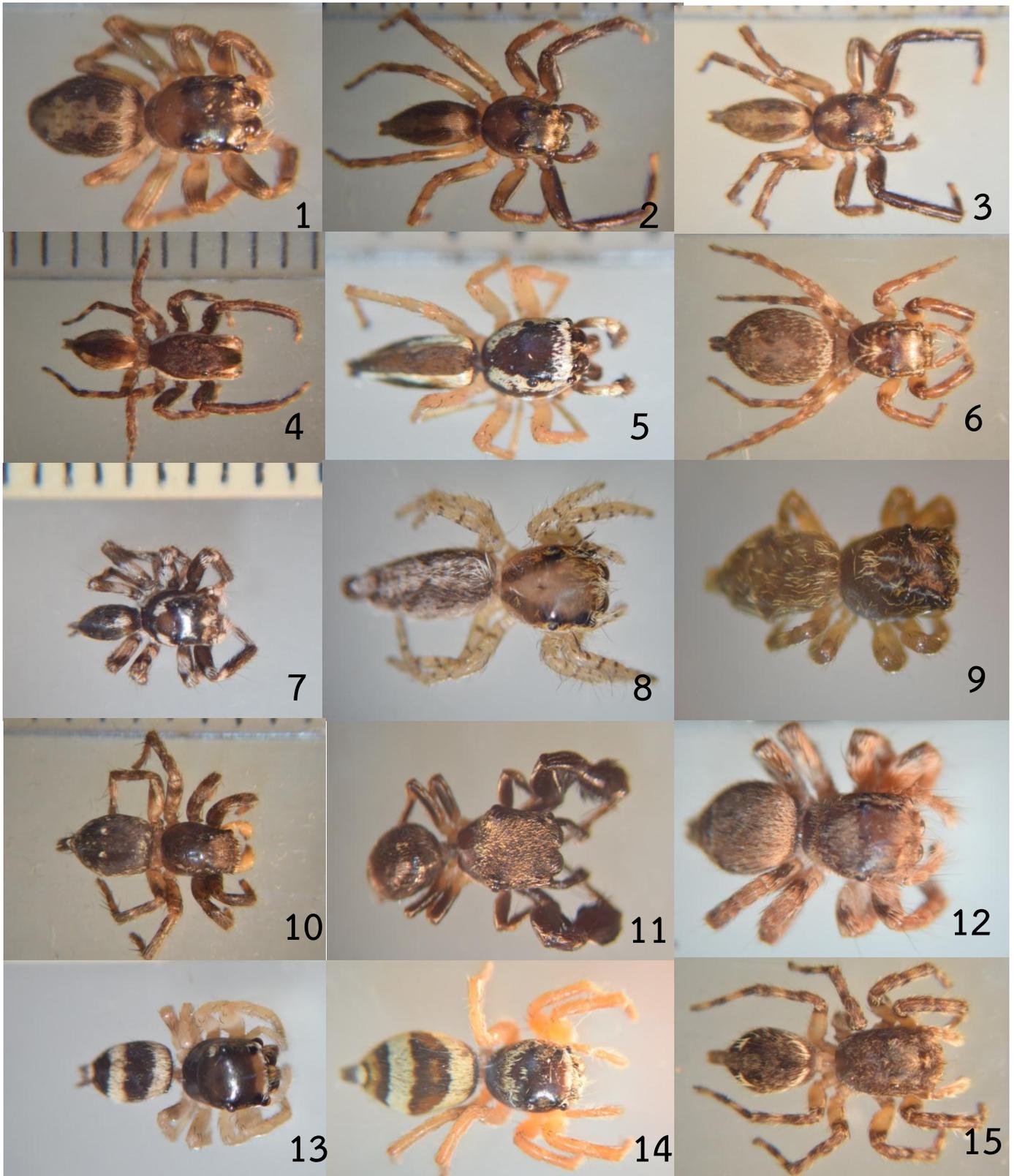
ตารางที่ 2 (ต่อ)

Family	Genus	Species
Sparassidae Bertkua,1872	<i>Heteropoda</i> Latreille,1804	<i>Heteropoda venatoria</i> (Linnaeus,1767) <i>Heteropoda</i> sp
Tetragnathidae Menge, 1866	<i>Tetragnatha</i> Latreille ,1804 <i>Leucauge</i> White, 1841 <i>Opadometa</i> Archer, 1951 <i>Pachygnatha</i> Sundevall, 1832 <i>Dolichognatha</i> O.P.-Cambridge, 1869	<i>Tetragnatha mandibulata</i> Walckenaer,1842 <i>Leucauge celebesiana</i> Walkenear, 1842 <i>Leucauge decorate</i> Blackwall, 1864 <i>Leucauge</i> sp. <i>Opadometa</i> sp. <i>Pachygnatha</i> sp <i>Dolichognatha</i> sp.
Theraphosidae Thorell,1869	<i>Haplopelma</i> Simon,1892	<i>Haplopelma</i> sp.
Theridiidae Sundevall, 1833	<i>Theridion</i> Walckenaer,1805 <i>Chryso</i> O.P.-Cambridge,1822 <i>Argyrodes</i> Simon,1864 <i>Coleosema</i> O.P.-Cambridge,1822	<i>Theridion</i> sp. <i>Chryso</i> sp. <i>Argyrodes</i> sp. <i>Coleosema blandum</i> O.P.-Cambridge,1822
Thomisidae Sundevall, 1833	<i>Steatoda</i> Sundevall, 1833 <i>Oxytae</i> L. Koch,1878	<i>Steatoda grossa</i> C.L.Koch, 1838 <i>Oxytae parallela</i>
Uloboridae Thorell,1869	<i>Thomisus</i> Walckenaer,1805 <i>Uloborus</i> Latreille, 1806 <i>Philoponella</i> Mello-Leitao,1917	<i>Thomisus stoliczka</i> (Thorell) 1887 <i>Uloborus</i> sp. <i>Philoponella</i> sp.
Zodariidae Thorell, 1881	<i>Mallinella</i> Strand,1906	<i>Mallinella</i> sp.



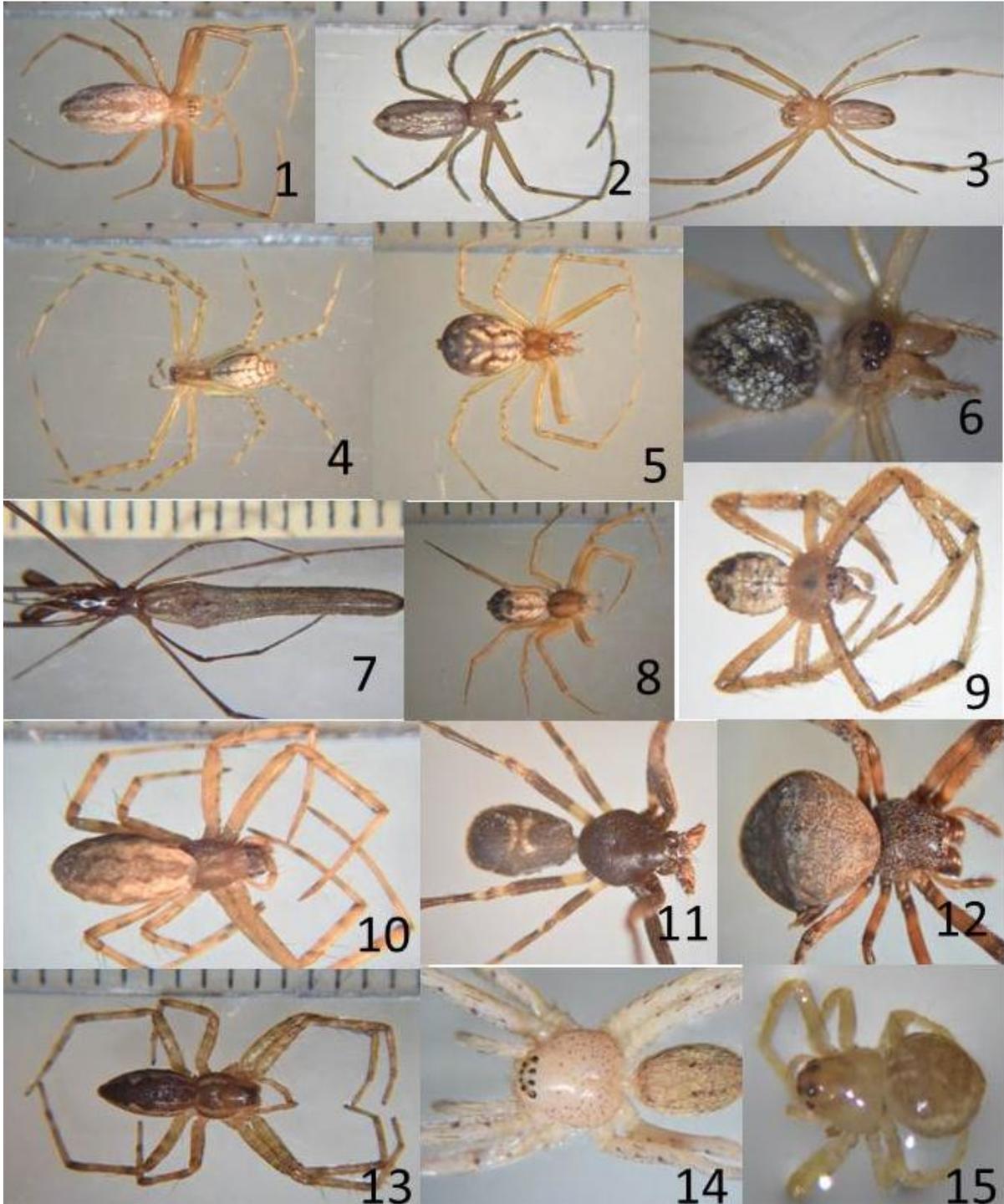
ภาพถ่ายโดย Chorn, S. , สุวัจน์ ไนไพร์ และอุบลวรรณ บุญฉ่ำ

ภาพที่ 4 แมงมุมหลังหนาม สกุล *Gastercantha* 1. *Gastercantha hasselti* 2. *Gastercantha kuhlii* ที่พบในบริเวณป่าไผ่ เส้นทางศึกษาธรรมชาติบ่อน้ำแร่ และ 3. *Gastercantha* sp. พบในป่าเบญจพรรณ



ภาพถ่ายโดย Chorn, S. , สุวัจน์ แนไพโร และอุบลวรรณ บุญฉ่ำ

ภาพที่ 5 แมงมุมกระโดด (Jumping spider) หมายเลข 1-15 อยู่ในวงศ์ Salticidae เป็นแมงมุมที่มีจำนวนมาก สุกุลมาก และมีรายงานชนิดที่พบจำนวนมาก จำนวนที่พบในบริเวณสำรวจพบมีความหลากหลายมาก โดย หมายเลข 13-14 คือ *Phintella vittata* (C. L. Koch; 1845)



ภาพถ่ายโดย Chom, S., สุวัจน์ แน่ไพโร และอุบลวรรณ บุญฉ่ำ

ภาพที่ 6 ตัวอย่างแมงมุมที่สำรวจพบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์เช่น Family Tetragnathidae (1-5)
 1. *Opadometa* sp 1 ,2. *Leucauge decorata* 3. *Opadometa* sp 2 4. *Pachygnatha* sp1.
 5. *Pachygnatha* sp2. Family Theridiidae (6-8) 6, *Theridion* 7. *Tetragnatha mandibulata*
 8 *Dolichognatha* sp, Family Nephilidae (10) 10 *Nephilengys* cf. *malabarensis*
 Family Araneidae (9, 11-12) *Cyclosa* sp 12. *Neoscona* sp 15. *Eriovixia* sp. Family
 Sparassidae (13-14) 13-14 *Heteropoda* sp.

อภิปรายและวิจารณ์ผล

ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์นั้นเป็นพื้นที่ที่มีสภาพความหลากหลายของสภาพพื้นที่สูงมาก สภาพภูมิอากาศมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ และจากการศึกษาพบว่าแมงมุมหลายชนิดจะพบในสภาพพื้นที่ที่มีความจำเพาะเจาะจง และแมงมุมก็ยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษา ดังนั้น แมงมุมจึงเป็นดัชนีชี้วัดอย่างหนึ่งว่าพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์นี้ เป็นพื้นที่ที่สมควรดูแลรักษาไว้ จากที่มีรายงานชนิดแมงมุมที่พบทั่วโลกในปัจจุบันประมาณ 43,678 ชนิด 3,898 สกุล 112 วงศ์ (Platnick, N.L. and Raven, R.J., 2013) ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้ ในพื้นที่สำรวจในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2557 ถึง สิงหาคม 2558 พบ 21 วงศ์ จากที่มีรายงานของทั่วโลกพบ 112 วงศ์ ซึ่งถือว่าจำนวนวงศ์ที่พบในบริเวณที่สำรวจในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์พบได้มากถึงร้อยละ 18.75 ของทั้งหมดที่พบทั่วโลก จำนวนชนิดเท่าที่สามารถแยกออกในระดับชนิดในขณะนั้นนั้นได้ถึง 129 ชนิด และคาดว่าจะจะเป็นชนิดใหม่ๆของโลกหลายชนิด และจำนวนชนิดใหม่ๆที่พบเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆในทุกครั้งที่มีการออกสำรวจและเก็บตัวอย่าง และเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างครบถ้วนทั้งหมดและถ้าสำรวจอย่างต่อเนื่อง โดยสำรวจทั้งเวลากลางวันและกลางคืน และเพิ่มพื้นที่ในการสำรวจมากยิ่งขึ้น ย่อมที่จะพบชนิดของแมงมุมเพิ่มมากขึ้นด้วย จึงถือได้ว่าในพื้นที่แห่งนี้มีความหลากหลายของชนิดแมงมุมที่มากพื้นที่หนึ่ง

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

แมงมุมที่สำรวจในพื้นที่ที่มีความหลากหลายของชนิดและแหล่งที่อยู่อาศัยมาก สามารถพบได้ในทุกสภาพพื้นที่ จากในการศึกษาคั้งนี้มีข้อจำกัดหลายประการทั้งในการเข้าพื้นที่ที่ไม่สามารถครอบคลุมได้ อีกทั้งช่วงเวลากลางคืนที่แมงมุมหลายชนิดมารวมทั้งสัตว์ป่าต่างๆจะออกหากินในเวลากลางคืน รวมทั้งการวิเคราะห์ชนิดต้องวิเคราะห์จากตัวเต็มวัย แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าในการสำรวจตัวอย่างนี้จะมีข้อจำกัดและเป็นเพียงส่วนน้อยเมื่อเทียบกับพื้นที่อันกว้างใหญ่ แต่สามารถพบตัวอย่างได้หลากหลายชนิดมาก ซึ่งขณะนี้ยังไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดได้หมด เพื่อจกได้นำข้อมูลไปวิเคราะห์จัดชนิดต่างๆในเชิงนิเวศวิทยา สร้างคู่มือ (Dichotomous key) ในการจำแนกชนิด (identify) ของแมงมุม ตลอดจนสร้างฐานข้อมูล (database) และทำบัญชีรายชื่อตัวอย่าง (Catalogue) ของแมงมุมที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ สำหรับไว้ใช้เป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและการอนุรักษ์แมงมุมในพื้นที่ต่อไป

การศึกษาถึงความหลากหลายจึงเป็นดัชนีหนึ่งที่บ่งชี้ได้ว่า อุทยานแห่งชาติแม่วงก์แห่งนี้เป็นที่ๆที่ความสำคัญเป็นแหล่งทรัพยากรอันทรงคุณค่าของประเทศ และจากการศึกษาพบว่าแมงมุมหลายชนิดอาศัยอยู่ในพื้นที่ๆแตกต่างกันไป ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่สำคัญและช่วยรักษาสมดุลของระบบนิเวศ และยังมีความรู้อีกมากมายที่ยังต้องมีการศึกษาต่อไปไม่มีที่สิ้นสุด ถึงแม้ว่าแมงมุมจะเป็นเพียงสิ่งมีชีวิตเล็กๆในระบบนิเวศ แต่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศ การรักษาพื้นที่ๆสัตว์เหล่านี้อาศัยอยู่เป็นวิธีการที่ดี และต้องมีการศึกษาต่อเนื่องกันไปเรื่อยๆ อย่างไม่หยุดยั้ง และเพื่อประโยชน์ของประเทศชาติต่อไป

บรรณานุกรม

- วิภาดา วังศิลาบัต. 2544. แมงมุมในสวนส้ม. กองกึ่งและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ 108 หน้า
- ประสิทธิ์ วงษ์พรม. 2550. ความหลากหลายชนิดและนิเวศวิทยาบางประการของแมงมุมใยกลมในพื้นที่โครงการทองผาภูมิตะวันตก อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี รายงานการวิจัยในโครงการ BRT 2550 ชุดโครงการทองผาภูมิตะวันตก: 321-326
- แสงโสม ศิริพานิช และพรรณนภา เหมือนผึ้ง. 2555. สถานการณ์การเจ็บป่วยจากการได้รับพิษแมงมุม ปีพ.ศ. 2555 รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 43(4): 49-52
- Coddington, J.A. and Levi, H.W. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 565-592
- Levi, H. W. 1996. The genus *Taczanowskia* of the orb-weavers spider Family Araneidae (Araneae). *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Auton. Mexico, Ser. Zool.* 67(2): 183-195
- Levi, H. W. 2002. Keys to the genera of Araneid orbweavers (Araneae: Araneidae) of the Americas. *The Journal of Arachnology.* 30: 527-562
- Levi, H. W. 2005. The orb-weaver genus *Mangora* of Mexico, Central America, and the west Indies (Araneae: Araneidae). *Bulletin of the museum of comparative zoology,* 158(4): 139-181
- Kaston, B. J. 1972. **How to know the spiders.** Wm. C. Brown Company Publishers, Dubuque, Iowa. 272 p.
- Motta, P. C. and Levi, H. W. 2009. A new species of *Argiope* (Araneae: Araneidae) from Brazil. *Zoologia.* 26(2) : 334-336
- Platnick, N.L. and Raven, R.J. 2013. Spider systematics : Past and Future. *Zootaxa* 3683(5):595-600
- Scharff, N. 1997. A phylogenetic analysis of the orb-weaving spider family Araneidae (Arachnida, Araneae). *Zoological Journal of the Linnean Society.* 120: 355-434

- Siliwal, M. and Molur ,S. 2007. Checklist of spiders (Arachnida: Araneae) of the South Asia including the 2006 update of Indian spider checklist. *Zoos' Print Journal* 22(2):2551-2597
- Smith, H.M. and Levi, H.W. 2010. Review of the genus *Micropoltys* (Chelicerata: Araneae: Araneidae). ***Arthropod Systematics & Phylogeny***. 68(3): 291-307
- Teixeira, R. A. and Lise, A. A. 2010. Description of the female of the orb-weaver spider *Testudinaria gravatai* (Araneae: Araneidae). ***Zoologia***. 27(1) : 128-130

โครงการย่อยที่ 5

เรื่อง ความหลากหลายของแมงมุม (Order Araneae) ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Species diversity of Spider (Order Araneae) in Mae Wong National Park

๑ หัวหน้าโครงการ

ดร. อุบลวรรณ บุญฉ่ำ (Ms. Ubolwan Booncham)

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา e-mail: ubolwanb@nu.ac.th

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง

จ.พิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ ๖๕๐๐๐

โทรศัพท์ 091-8396328 โทรสาร 055-963333

๒ ผู้ร่วมงานวิจัย

นายสุธน เวียงดาว (Mr. Suthon Weingdow)

ตำแหน่งปัจจุบัน หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ e-mail: Asoon-33@hotmail.com

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ กม.๖๕ ถนนคลองลาน-อุ้มผาง

อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร รหัสไปรษณีย์ ๖๒๑๘๐

โทรศัพท์ 089-89533 โทรสาร -

๓. ผู้ช่วยวิจัย

๓.๑ Miss Sokonthey Chorn

ตำแหน่งปัจจุบัน นิสิตระดับปริญญาโท ชั้นปีที่ ๒ สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง

จ.พิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000

โทรศัพท์ 091-8396328 โทรสาร 055-983301

๓.๒ นางสาวสุวัจน์ี แน่ไพโร

ตำแหน่งปัจจุบัน นิสิตระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ ๓ สาขาวิชา ชีววิทยา

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง

จ.พิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ ๖๕๐๐๐

โทรศัพท์ 091-8396328 โทรสาร 055-983301

๔. ผู้ช่วยวิจัยในการวิเคราะห์ ชนิดแมงมุม

นายประสิทธิ์ วงษ์พรหม (Mr. Prasit Wongprom)

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก 12/1 หมู่ 2 ต. กองดิน อ. แกลง จ. ระยอง 22160



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความหลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนมัยสิทธิ์ที่หายากจากดิน
ในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ : เพื่อนำไปสู่การค้นหารายการออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่
Diversity of rare actinomycetes isolated from soils in Maewong National Park:
reach to the discovery of novel bioactive compound

โดย ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว และคณะ
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2558



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความหลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนมัยสิทธิ์ที่หายากจากดิน
ในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ : เพื่อนำไปสู่การค้นหายาออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่
Diversity of rare actinomycetes isolated from soils in Maewong National Park:
reach to the discovery of novel bioactive compound

โดย ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว และคณะ
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคลากรผู้สนใจด้านความหลากหลายทางชีวภาพของแคว้นไน้มยลิตที่หายาก และการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ตลอดจนจะเป็นประโยชน์ในการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพต่อไป

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะกันอย่าง ทำให้เกิดปัญหาการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ จึงนำไปสู่การค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ ซึ่งไม่เพียงแต่นำมาเพื่อแก้ปัญหาเรื่องการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดเดิมๆ แต่ยังสามารถนำไปใช้ในการแก้ปัญหาโรคอุบัติใหม่ได้อีกด้วย แอคติโนมัยสิทนับว่าเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ใหม่ๆ แหล่งที่มีเชื้อสายพันธุ์ใหม่น่าจะมาจากสถานที่ใหม่ๆ ที่ยังไม่เคยมีคนศึกษามาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายาก เพื่อคาดหวังว่าจะพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์หายากที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ จากดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งยังไม่พบรายงานการศึกษาแอคติโนมัยสิทที่หายากในบริเวณดังกล่าวมาก่อน

ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยสิทจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ทั้งหมด 15 จุด พบว่าได้เชื้อแอคติโนมัยสิททั้งหมด 166 ไอโซเลท ทำการจัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HT agar plate ได้จำนวน 11 กลุ่ม นำตัวแทนกลุ่มมาทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับลักษณะทางเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน พบว่าจัดอยู่ใน 3 จีนัส คือ *Streptomyces* sp., *Microbispora* sp, *Micromonospora* sp จำนวน 54, 8 และ 93 ไอโซเลทตามลำดับ คิดเป็น 33% 5% และ 56% ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ยังไม่ทราบชนิดเนื่องจากยังมาพบการสร้างสปอร์บนอาหาร HT และยังไม่สามารถสกัด DNA เพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน อีก 2 กลุ่ม คิดเป็น 7 % ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด จากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ เช่น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antifungal, anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial) เอนไซม์ และ anticancer โดยทดสอบกับเชื้อจำนวน 38 ไอโซเลท พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จำนวน 21 ไอโซเลท คิดเป็น 55 %ของเชื้อที่นำมาทดสอบ และจากเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดพบว่าเป็นกลุ่มของ non-Streptomycete ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสิทที่หายากมากกว่า *Streptomyces* คิดเป็นร้อยละ 62 และ 38 ยิ่งไปกว่านี้ยังพบมีเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากที่มีความน่าสนใจ เช่น *Micromonospora* MW1103 มีความสามารถในการสร้างสารได้ 4 ชนิดคือ anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, เอนไซม์โปรตีเอส และ เอนไซม์เซลลูเลส , *Microbispora* MW1102 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ 3 ชนิด ทั้ง MW1103 และ MW1102 แยกได้จากดินบริเวณข้างเส้นทางจากที่ทำการอุทยานไปยังช่องเย็น และ เชื้อไอโซเลท MW501 และ MW503 ซึ่งแยกได้จากบริเวณที่ทำการอุทยานที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ ซึ่งอาจจะจัดเป็นเชื้อชนิดใหม่ โดยไอโซเลท MW501 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากถึง 40 มิลลิเมตร ส่วน MW503 ได้ทำการทดสอบเพียงการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้นซึ่งไอโซเลทนี้ก็สามารถยับยั้งเชื้อราได้

จากผลการวิจัยทำให้สรุปได้ว่าดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์เป็นแหล่งของแอคติโนมัยสิทที่หายากที่น่าจะมีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ซึ่งถ้าได้ทำการศึกษาต่อไปอาจสามารถพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่เพื่อใช้ในการแก้ปัญหาการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันได้

คำสำคัญ: Rare actinomycetes, Diversity, cave, Bioactive compound

Abstract

It is conceivable that actinobacteria are a major source of bioactive compounds used currently in medical, pharmaceutical, agricultural and industrial applications. A discovery trend of novel bioactive compounds is believed to be in relation with the discovery rate of novel actinobacteria. Accordingly, most novel actinobacteria recently found are often isolated from unexplored or less known habitats. Maewong National Park that have yet been unexplored for their microbial resource, are an interesting habitat for this study. Thus, our work aims to study of generic diversity of rare actinomycete for discovery of novel bioactive compound.

A total 166 isolates of actinomycetes was isolated from 15 soil samples collected from various site in Maewong National Park. On the basis of morphology studies including colony and spore observations together with some analyses of cell wall compositions like diaminopimelic acid (DAP) and whole cell sugar, the actinomycetes were divided into 11 groups. These studies were done when the actinomycete isolates were grown on Hickey-Tresner agar. Later on, some actinomycetes (11 isolates) from each group were randomly selected for analysis of 16S rRNA gene sequence compared with database of National Center for Biotechnology Information (NCBI). With this classification, we assumed that all actinomycete isolates could belong to 3 genera of actinomycetes including *Micromonospora* (56%), *Microbispora* (5%), *Streptomyces* (33%) and 7 % of identified were found. For the diversity evaluation, the genus *Micromonospora* was found highly abundant followed by the genus *Streptomyces* and *Microbispora* respectively.

Based on evaluation of potential to produce bioactive compound, 55% of all actinomycete isolates (38 isolates) was able to produce bioactive compound. They belong to non streptomycete group than streptomycete (non streptomycete 62 %, streptomycete 38%). There were found four attractive isolates belonged to *Micromonospora*, *Microbispora* and unidentified. *Micromonospora* MW1103 and *Micromonospora* W1102 were isolated from soil collected on the way from Maewong National Park official to chong yen. *Micromonospora* MW1103 could produce 4 bioactive compounds (anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, protease and cellulase). *Microbispora* MW1102 shows three enzyme activities (protease, amylase and cellulase). Moreover two unidentified isolated (MW501 and MW503) which might be novel species also show antimicrobial activities. MW501 produce potential anti gram+ bacteria by give inhibition zone of 40 mm, while MW503 show antifungal activity and activities of enzymes and anticancer were not test yet.

We concluded that Maewong National Park is a valuable natural resource that can provide a unique habitat for diverse rare actinomycetes, which can be discovered for enormous applicable benefits.

Keyword: Rare actinomycetes, Diversity, cave, Bioactive compound

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
บทนำ	8
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	9
ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย	22
ผลการวิจัย	29
อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง	46
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	49
บรรณานุกรม	50
คณะผู้วิจัย	57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Example of new bioactive compounds derived from rare actinomycetes in 2003-2008	9
2	ชนิดผนังเซลล์แอกติโนมัยสิท	12
3	แบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยสิท	12
4	องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอกติโนมัยสิท	13
5	ลักษณะของแอกติโนมัยสิททั้ง 7 กลุ่ม	16
6	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยสิทที่มีรายงานในช่วงปี ค.ศ. 2003-2005	18
7	จุดเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์เพื่อแยกเชื้อแอกติโนมัยสิท	22
8	ผลการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	30
9	การจัดกลุ่มแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ตามลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate	31
10	ชนิดของ DAP isomer และ น้ำตาลที่ผนังเซลล์ ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม	35
11	ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม	35
12	เปอร์เซ็นต์ identity ของ ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีนของเชื้อที่แยกได้เมื่อเทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสิทในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI	39
13	ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	42
14	สรุปผลความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้	47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสิท	10
2	ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายของแอกติโนมัยสิท	11
3	โครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด LL-isomer ของแอกติโนมัยสิทผนังเซลล์กลุ่มที่ I,M = NAM และ G = NAG	14
4	โครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด meso-isomer ของแอกติโนมัยสิทผนังเซลล์กลุ่มที่ II	14
5	Mycostop	20
6	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์	21
7	ช่องเยื่อ	21
8	การเตรียมตัวอย่างดินเพื่อนำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสิท	23
9	Restreak แอกติโนมัยสิทที่แยกได้บนอาหาร HT agar plate และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร HT agar slant	23
10	เทคนิคการปักสไลด์เพื่อศึกษาสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	24
11	การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay	27
12	การวัดขนาดของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone)	27
13	จุดเก็บตัวอย่างดินบางบริเวณ	29
14	ลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม	33
15	ลักษณะการสร้างสปอร์เมื่อมีการเจริญบนอาหาร HT agar plate เป็นเวลา 15 วัน ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม	34
16	Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มยีน <i>Microbispora</i> เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ <i>Streptomyces sporocinereus</i> เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .	40
17	Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มยีน <i>Streptomyces</i> เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ <i>Microbispora rosea</i> เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .	40
18	Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มยีน <i>Micromonospora</i> เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ <i>Acrocarpospora phusangensis</i> เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .	41
19	ความสามารถของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียทดสอบ	44
20	ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	45
21	กราฟแสดงจำนวนร้อยละของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละยีน	46

บทนำ

ในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลายทั้งในการแพทย์ และการเกษตร ทำให้เกิดการพัฒนาศายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคเพื่อให้เกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ ทำให้สารปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ไม่ได้ผล จึงนำไปสู่การค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ ซึ่งไม่เพียงแต่นำมาเพื่อแก้ปัญหาเรื่องการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดเดิมๆ การค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ ยังสามารถนำไปใช้ในการแก้ปัญหาโรคอุบัติใหม่ได้อีกด้วย

นักวิทยาศาสตร์ และนักวิจัยทางการแพทย์ ได้ทำการพัฒนายาขึ้นมาใหม่ๆ อย่างต่อเนื่อง ในกระบวนการพัฒนายาดังกล่าว การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างพื้นฐานของยาเพื่อสร้างบทบาทหรือกลไกใหม่ๆ โดยใช้โครงสร้างพื้นฐานของยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมาเป็นสารตั้งต้น เพื่อดัดแปลงด้วยวิธีทางเอนไซม์เทคโนโลยี (enzyme technology) อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีความหลากหลายของโครงสร้างพื้นฐานที่จำกัด ดังนั้นการแสวงหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ที่มีโครงสร้างพื้นฐานใหม่ๆ จึงมีความสำคัญและจำเป็นต้องศึกษาในจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการค้นพบสารชนิดเดิมๆ จากเชื้อที่มีพันธุกรรมแบบเดิมที่มีการค้นพบและใช้มาก่อนแล้ว

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนขึ้นบริเวณเส้นศูนย์สูตร (Equator) ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ความหลากหลายทางชีวภาพเกิดจากสิ่งมีชีวิตที่มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมแตกต่างกัน เพื่ออำนวยความสะดวกให้สิ่งมีชีวิตต่างๆ สามารถดำเนินชีวิตได้สอดคล้องและเหมาะสมกับสภาพแหล่งที่อยู่อาศัย จุลินทรีย์จัดเป็นอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากวิวัฒนาการอันยาวนาน จุลินทรีย์ที่มีสปีชีส์เดียวกัน อาจจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกันทุกประการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์มีความสำคัญอย่างยิ่งในการนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ

แอกติโนมัยซิท์นับว่าเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการศึกษากันมากทำให้ในระยะหลังๆ โอกาสที่จะได้สารใหม่จากเชื้อชนิดนี้ลดลง ในปัจจุบันนักวิจัยจึงมุ่งไปสู่อคติโนมัยซิท์ในสกุลอื่นๆ นอกเหนือจาก *Streptomyces* ที่จัดเป็นแอกติโนมัยซิท์ที่หายาก (rare actinomycetes) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ใหม่ๆ จึงกลายเป็นแหล่งที่น่าสนใจของการศึกษา เพื่อการค้นหายาชนิดใหม่ๆ ต่อไปหลายปีที่ผ่านมาความพยายามที่จะค้นหายาชนิดใหม่จากเชื้อแอกติโนมัยซิท์ที่หายากในประเทศไทย ปัจจุบันสารหลายชนิดอยู่ในระหว่างการดำเนินการทำให้บริสุทธิ์และค้นหาโครงสร้าง มีรายงานเพียง micromonosporin A ที่สร้างโดย *Micromonospora* sp. ที่แยกได้จากป่าพลู (peat swamp forest) (Thawai *et al.*, 2004) เท่านั้น แหล่งที่มีเชื้อแอกติโนมัยซิท์ที่หายากสายพันธุ์ใหม่น่าจะมาจากสถานที่ใหม่ๆ ที่ยังไม่เคยมีคนศึกษามาก่อน ดังนั้นจึงนำมาสู่งานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการค้นหายาออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ จากเชื้อแอกติโนมัยซิท์ที่หายากจากดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งยังไม่พบรายงานการศึกษาแอกติโนมัยซิท์ที่หายากในบริเวณดังกล่าวมาก่อน ซึ่งผลการวิจัยในครั้งนี้จะได้ข้อมูลที่นำไปสู่การจัดการคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อเป็นประโยชน์ในการผลิตสารซึ่งมีผลต่อสุขภาพและอนามัยของประชาชน ลดการนำเข้าตัวยามีราคาแพงจากต่างประเทศเป็นการช่วยลดภาระค่าครองชีพของประชาชน ทั้งนี้ยังช่วยส่งเสริมศักยภาพของการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันเชื้อก่อโรคหลายชนิดได้มีการพัฒนาพัฒนาสายพันธุ์ให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้กันเป็นประจำ ทั้งในการเกษตรซึ่งเกิดจากการใช้สารเคมี และสารปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายทำให้แมลงและเชื้อก่อโรคพืชชนิดต่างๆ ทนต่อสารที่ใช้ทำให้ต้องเปลี่ยนสารที่ใช้ในการป้องกันกำจัดเสมอๆ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในทางการแพทย์ เชื้อดื้อยาหลายสายพันธุ์ เช่น *Staphylococcus aureus* ซึ่งพบว่าต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด โดยสายพันธุ์ Mithicillin resistant *Staphylococcus aureus* ที่มักพบในโรงพยาบาล ซึ่งมีเพียงยา vancomycin เท่านั้นที่สามารถรักษาได้ แต่ปัจจุบันพบว่ามีการพัฒนาสายพันธุ์จนสามารถต้านทานต่อยา vancomycin ได้ (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Ceylan *et al.*, 2008) *Mycobacterium tuberculosis complex* ก็เป็นเชื้ออีกกลุ่มหนึ่งที่พบว่ามี การต้านทานต่อยาหลายชนิด (Multidrug-resistant tuberculosis (MDR TB)) (Thomas *et al.*, 2007)

แอกติโนมัยสิทนับว่าเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อในสกุล Streptomyete โดยพบว่าสามในสี่ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันได้มาจากแอกติโนมัยสิทกลุ่มนี้ (Takizawa *et al.*, 1993) จากเหตุผลดังกล่าวในเวลา 50 ปีที่ผ่านมา ทำให้มีการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะจาก Steptomycete กันอย่างกว้างขวาง จนกระทั่งปัจจุบันอัตราการค้นพบสารชนิดใหม่ที่สร้างโดยแอกติโนมัยสิทกลุ่มนี้มีจำนวนลดลง เพราะสารส่วนใหญ่ที่พบในระยะหลังเป็นสารชนิดเดิม เนื่องจากเชื้อที่แยกมาได้เป็นเชื้อกลุ่มเดิม ดังนั้นแอกติโนมัยสิทในสกุลอื่นๆ นอกเหนือจาก Streptomycete (rare actinomycetes) จึงกลายเป็นแหล่งที่น่าสนใจของการศึกษาเพื่อการค้นหายาชนิดใหม่ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอกติโนมัยสิทที่หายากสายพันธุ์ใหม่ๆ (Takahashi and Omura, 2003) ซึ่งปัจจุบันพบรายงานสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแอกติโนมัยสิทที่หายากเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (ตาราง 1)

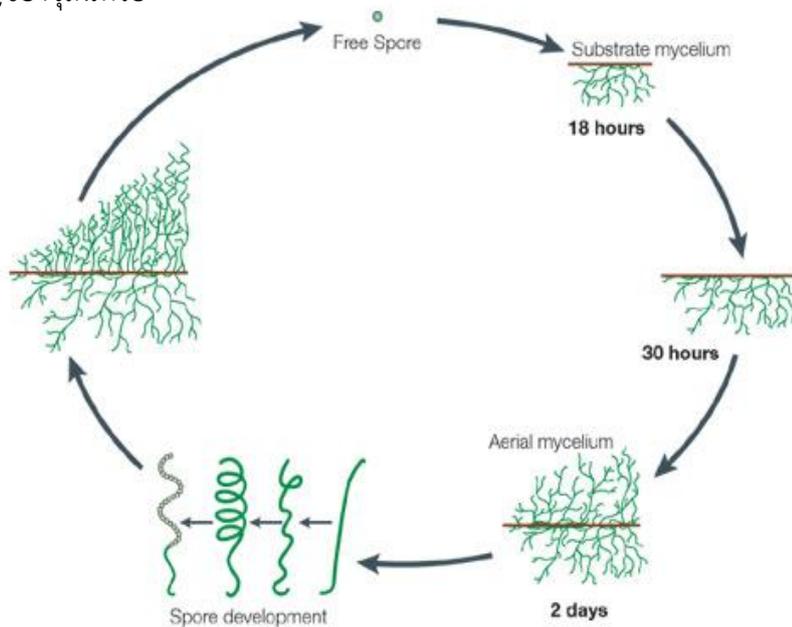
ตาราง 1 Example of new bioactive compounds derived from rare actinomycetes in 2003-2008

Producer	Bioactive compound	Activity	Reference
<i>Micromonospora</i> sp.	Kosinosporin	Antitumor	Furumai <i>et al.</i> , 2003
<i>Micromonospora</i> sp.	R176502	Antitumor	Laakso <i>et al.</i> , 2003
<i>Actinomadura</i> sp.	Chandrananimycin A, B,C	Antitumor	Maskey <i>et al.</i> , 2003
<i>Actinomadura</i> sp.	IB-00208	Antitumor	Malet <i>et al.</i> , 2003
<i>Nonomuraea</i> sp.	A40926, dechlorinated	Antibacteria	Beltrametti <i>et al.</i> , 2003
<i>Nonomuraea</i> sp.	A40926, monochlorinated	Antibacteria	Beltrametti <i>et al.</i> , 2003
<i>Kitasatospora cheerisanensis</i>	bafilomycin C1-amide	Antitumor	Moon <i>et al.</i> , 2003
<i>Kibdelosporangium</i> sp.	Kibdelones	anticancer	Ranjala <i>et al.</i> , 2007
<i>Verrucosipora</i> sp.	Proximicin A, B and C	Antibacterial and Antitumor	Fielder <i>et al.</i> , 2008

หลายปีที่ผ่านมา มีรายงานการค้นพบแอกติโนมัยสิทสายพันธุ์ใหม่ในประเทศไทย (Thawai *et al.*, 2004b; Thawai *et al.*, 2005a,b; Thawai *et al.*, 2008; Chomchoei *et al.*, 2011; Jongrungruangchok *et al.*, 2008) และมีความพยายามที่จะค้นหาสารชนิดใหม่จากเชื้อแอกติโนมัยสิทที่หายากในประเทศไทย ปัจจุบันสารหลายชนิดอยู่ในระหว่างการดำเนินการทำให้บริสุทธิ์และค้นหาโครงสร้าง และมีรายงานเพียง micromonosporin A ที่สร้างโดย *Micromonospora* sp. ที่แยกได้จาก peat swamp forest (Thawai *et al.*, 2004a) เท่านั้น

1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอกติโนมัยสิท

เชื้อแอกติโนมัยสิทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ใน order Actinomycetales ที่มีปริมาณ guanine และ cytosine ในเซลล์สูงกว่า 55 % จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนเล็กน้อยในการเจริญ เชื้อแอกติโนมัยสิทเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายตั้งแต่ลักษณะทรงกลม ท่อน และเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา ที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศหรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในเชื้อแอกติโนมัยสิทส่วนใหญ่ สปอร์มีทั้งแบบที่ไม่มีถุงหุ้ม (conidia) เป็นเม็ดเดี่ยวๆ และเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย และแบบที่สร้างอยู่ในอับสปอร์ (sporangium) เชื้อแอกติโนมัยสิทแตกต่างจากเชื้อราตรงที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย (Goodfellow and Brand, 1980) แอกติโนมัยสิทส่วนใหญ่จะพบทั่วไปในดินทั้งบนบกและในทะเล เนื่องจากคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์และมีหลายชนิดที่ทนต่อความเค็ม (Jensen *et al.*, 1991) อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อแอกติโนมัยสิทในระยะแรกๆ มักเป็นการศึกษาจากแหล่งที่อยู่บนบกเป็นส่วนใหญ่ และวัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสิทแสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งวัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสิทจะเริ่มต้นจากการสร้างเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร เพื่อใช้สารอาหารในการเจริญเติบโต และภายหลังจะมีการสร้างเส้นใยอากาศเพื่อใช้สืบพันธุ์ หรือในกรณีที่มีการขาดอาหาร การขาดน้ำ หรือการสะสมสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

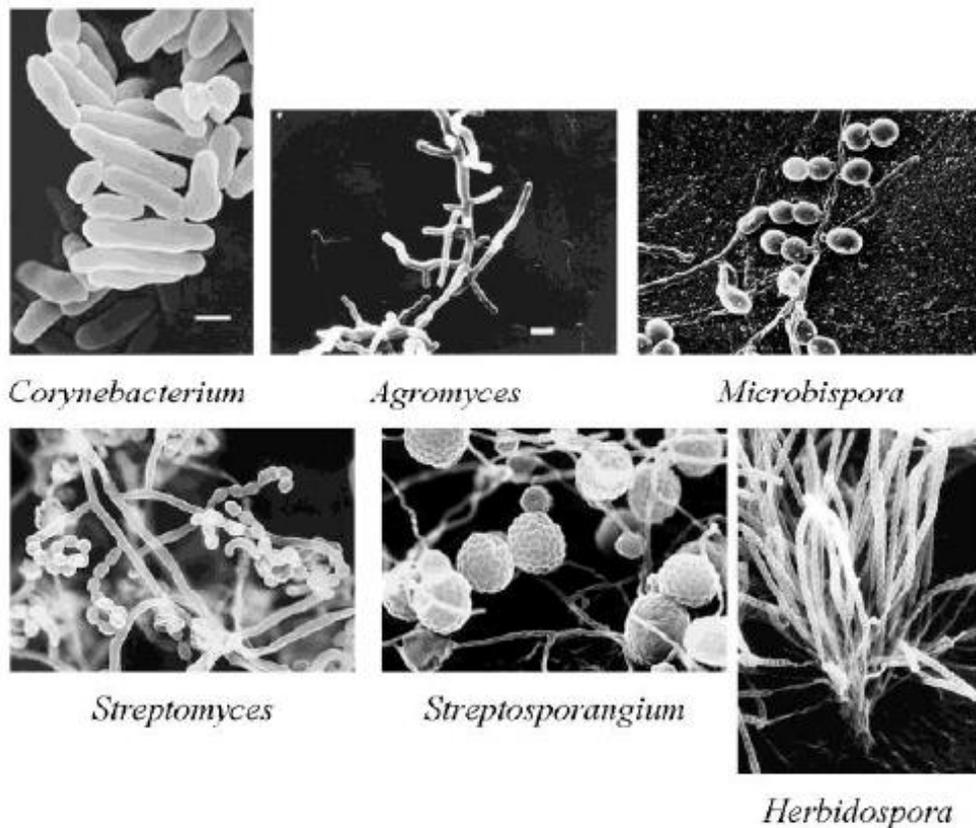


ภาพที่ 1 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสิท

ที่มา : <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n3/images/nrmicro1096-f6.jpg>

แอกติโนมัยสิทมีการสร้างสปอร์ได้ทั้งบนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ หรือสร้างบนเส้นใยชนิดใดชนิดหนึ่ง บางชนิดมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือ (conidia) ไปจนถึงสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้และอยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ สามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยสิทตามรูปร่างและการเรียงตัวของสปอร์ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ (Miyadoh, 1997) คือ

1. กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว หรือสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายสั้นๆ
2. กลุ่มที่สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว
3. กลุ่มที่สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์
4. กลุ่มที่สร้างสปอร์นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาแล้วทั้งหมด



ภาพที่ 2 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายของแอกติโนมัยสิท
ที่มา : Miyadoh (1997)

เส้นใยอาหารมีการเจริญแตกกิ่งก้านยึดเกาะกันไปมา ทำให้เห็นโคโลนีมีลักษณะคล้ายแผ่นหนังและเจริญฝังแน่นลงในเนื้อวุ้น ส่วนโคโลนีที่มีลักษณะอ่อนนุ่มและร่วนเกิดจากเส้นใยแตกหักเป็นรูปท่อนหรือทรงกลม โคโลนีของแอกติโนมัยสิทหลายสกุล เช่น *Streptomyces* จะปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศที่ห่อหุ้มด้วยชั้นของผิวที่เป็นไฮโดรโฟบิก(hydrophobic)และเจริญขึ้นสู่ด้านบนในระยะเริ่มแรกเส้นใยอากาศมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีต่างๆเมื่อเริ่มมีการสร้างสปอร์ ทำให้เห็นโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือคล้ายกำมะหยี่ (Williams *et al.*, 1989) สีของเส้นใยอาหารและอากาศมีตั้งแต่สีขาว สีน้ำตาล สีเหลือง สีชมพู สีส้ม สีดำ สีเทา สีม่วง สีแดง เป็นต้น บาง

ชนิดสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำแพร่ออกมาในอาหารและมีสีต่างๆกัน เช่น สีเหลือง สีส้ม สีเทา สีน้ำตาล สีชมพู เป็นต้น

เส้นใยที่แตกกิ่งก้านสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากเลี้ยงผ่านไป 24 ชั่วโมง และจะเห็นเป็นโคโลนีในวันที่ 3-4 ของการเจริญ ในขณะที่เส้นใยอากาศจะใช้เวลา 7-14 วันจึงจะเจริญเต็มที่ และในบางชนิดอาจใช้เวลานานถึง 1 เดือน แอคติโนมัยสิทธิ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีลักษณะการเจริญเป็นกลุ่มก้อน (pellet) เนื่องจากการงอกของสปอร์และการพันกันแน่นของเส้นใย (Williams *et al.*, 1989)

แอคติโนมัยสิทธิ์มีค่า generation time ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เจริญได้ในอาหารที่มีค่า a_w (water activity) เท่ากับ 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ (W/W) และอาจมากถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ ในบางสกุล เจริญได้ดีในช่วง pH 6.5-8.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส (Williams *et al.*, 1989) แต่มีบางพวกที่เป็น thermophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 50-65 องศาเซลเซียส เช่น ในดินปุ๋ยคอกและปุ๋ยหมัก (Cross, 1968)

2. องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของแอคติโนมัยสิทธิ์ โดยดูจากกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (Major wall amino acid) และชนิดของน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมด (whole cell hydrolysate) สามารถจำแนกชนิดขององค์ประกอบของผนังเซลล์แอคติโนมัยสิทธิ์ได้เป็น 4 ลักษณะดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ชนิดผนังเซลล์แอคติโนมัยสิทธิ์

ที่มา :Bergey's Manual Systematic Bacteriology เล่ม 4 (Willam, 1989)

Type	Major amino acid	Distinguishing major constituent
I	LL-DAP	Glycine
II	Meso-DAP	Glycine
III	Meso-DAP or OH-DAP	None
IV	Meso-DAP	None

ตารางที่ 3 แบบแผนน้ำตาลของแอคติโนมัยสิทธิ์

ที่มา : Bergey's Manual Systematic Bacteriology เล่ม 4 (Willam, 1989)

Type	Diagnostic Sugar
A	Arabinose, Galactose
B	Madurose
C	None
D	Xylose, Arabinose

ในปี 1956 Cummins and Harris ได้แบ่งกลุ่มแอสดีโนมัยลิตตามชนิดขององค์ประกอบทางเคมีที่ผนังเซลล์ไว้ทั้งหมด 8 กลุ่ม (ตารางที่ 3) โดยมีชนิดของ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) เป็นส่วนประกอบของเปปติโดไกลแคน DAP มี 2 ชนิด คือ LL-DAP และ *meso*-DAP ซึ่งพบในกลุ่มผนังเซลล์ชนิดที่มี I และกลุ่มผนังเซลล์ชนิดที่ IL-IV ตามลำดับ ไม่พบ DAP ในกลุ่มผนังเซลล์ชนิดที่ V-VI แต่พบกรดอะมิโน Lysine นอกจากนี้ยังมี Ornithine, Aspartic acid, Diaminobutylic acid (DAP) เป็นต้น

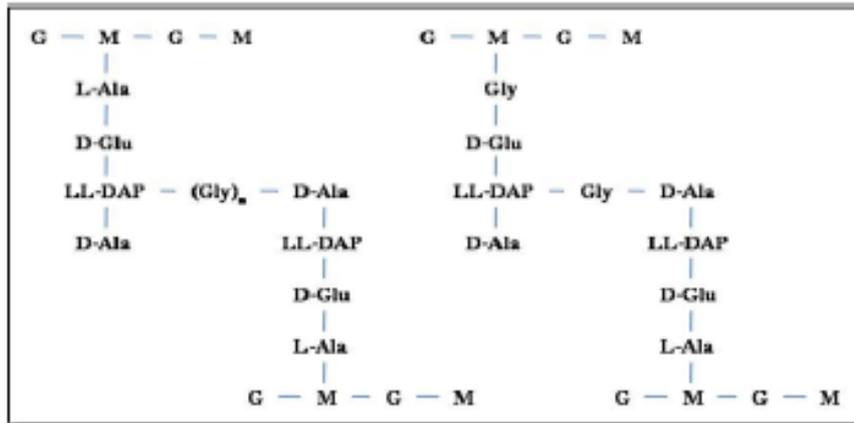
เปปติโดไกลแคนในแอสดีโนมัยลิตประกอบด้วย N-acetyl glucosamine (NAG) เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid (NAM) ด้วยพันธะ β -(1,4)-glycosidic ได้เป็นสาย glycantetrapeptide แต่ละสายจะมาเชื่อมกันด้วยพันธะเพปไทด์ที่เป็น interpeptide bridge ระหว่าง L-diamino acid กับ D-Ala ซึ่งความแตกต่างระหว่างแอสดีโนมัยลิตที่มีผนังเซลล์จัดอยู่ในกลุ่มที่ I-IV พบว่าในกลุ่มที่ I มี glycine bridge เป็นตัวเชื่อมระหว่าง LI-DAP กับ D-Ala (ภาพที่ 3) กลุ่มที่ II-IV ไม่พบกรดอะมิโนใน interbridge ที่เชื่อมระหว่าง *meso*-DAP กับ D-Ala โดยกลุ่มที่ II มี glycine เป็นตัวเชื่อมระหว่าง NAM กับ D-Glu ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ I, III และ IV ที่มี L-Ala เป็นตัวเชื่อมระหว่าง NAM กับ D-Glu (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แอสดีโนมัยลิต

ที่มา : Goodfellow (1985)

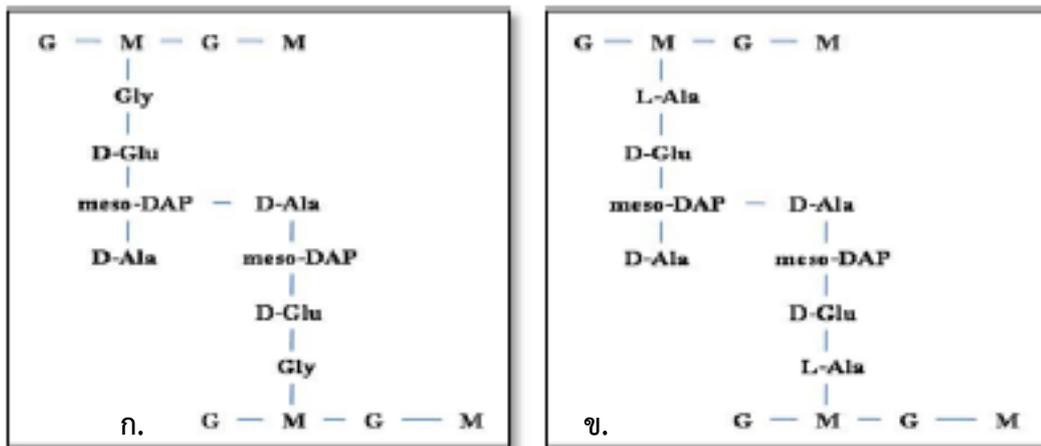
Major constituent	Chemotype							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
L-Diaminopimelic acid	+							
<i>meso</i> -Diaminopimelic acid		+	+	+				
Diaminobutyric acid							+	
Aspartic acid						v		
Glycine	+	+					+	
Lysine					+			
Ornithine					+			+
Arabinose				+				
Galactose				+		v		

หมายเหตุ v=variable



ภาพที่ 3 โครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด LL-isomer ของแอคติโนมัยสิทผนังเซลล์กลุ่มที่ I, M = NAM และ G = NAG

ที่มา :Kudo (2008)



ภาพที่ 4 โครงสร้างเปปติโดไกลแคนที่มี DAP ชนิด meso-isomer ของแอคติโนมัยสิทผนังเซลล์กลุ่มที่ II (ก.) ผนังเซลล์กลุ่มที่ III และกลุ่มที่ IV (ข.) M = NAM และ G = NAG

ที่มา :Kudo (2008)

3. การจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสิท

Bergey's Manual Systematic Bacteriology เล่ม 4 (Willam *et al.*, 1989) ได้แบ่งประเภทของเชื้อแอคติโนมัยสิทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ Nocaddioforms, Multilocular sporangia, Acinoplanetes, Streptomycete, Maduromycetes, Theromnbospora, Thermoactinomycete และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มต่างๆข้างต้น

3.1 Nocardioforms

Nocardioforms เป็นกลุ่มที่เส้นใยมีการแตกหักเป็นแท่งหรือกลม บางชนิดสามารถสร้างโคนิเดีย แอคติโนมัยสิทกลุ่มนี้ทุกสกุลเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ ยกเว้น *Oerskoviae* ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการ

อากาศเล็กน้อยในการเจริญ เชื้อในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์เป็นแบบ I(LI-DAP และ glycine) ในสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* ที่ผนังเซลล์จะมี mycolic acid และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type A (Arabinose และ Galactose)

3.2 Actinomycetes with multilocular sporangium5k

เชื้อในกลุ่มนี้ใช้ลักษณะ multilocular sporangium เป็นหลักในการจำแนกประเภทแยกออกจากเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มอื่นๆ แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 สกุล ดังนี้ *Dermatophilus*, *Geodermatophilus* และ *Frankia* โดยมีลักษณะแตกต่างกันคือ เชื้อสกุล *Geodermatophilus* ซึ่งมีเส้นสายง่ายที่ยังไม่พัฒนามากนัก thullus ทั้งหมดสร้างเป็น sporangium ส่วนสกุล *Dermatophilus* เส้นสายจะมีการพัฒนามากขึ้นมีการสร้าง multilocular sporangium แบบยาวและสกุล *Frankia* มีการสร้าง sporangium และ filament ทั้งบริเวณ intercalary swelling ตอนปลายหรือบนกิ่ง lateral branches ทั้ง 3 สกุลจะไม่พบการสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศ (aerial mycelium)

3.3 Actinoplanetes

แอคติโนมัยสีทในกลุ่ม Actinoplanetes มีทั้งสิ้น 5 สกุล ดังนี้ *Actionplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia*, *Dactylosporangium* และ *Micromonospora* เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อยู่ในน้ำ เพราะเป็นกลุ่มที่มีสปอร์เคลื่อนที่ได้ในน้ำในช่วงหนึ่งของวงชีวิตยกเว้น *Micromonospora* ลักษณะสำคัญของเชื้อกลุ่มนี้คือ เจริญโดยไม่มีการแตกหัก มีการแตกกิ่งก้านแล้วสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่มีผนังกัน เส้นใยมีการพัฒนาน้อยคือจะเห็นเพียงบางๆ เชื้อในกลุ่มนี้มี DAP ที่ผนังเซลล์แบบ III (Meso-DAP และ OH-DAP) และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type D (Xylose และ Arabinose)

Micromonospora สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ เกิดขึ้นเดี่ยวๆ ไม่มีก้านหรือมีเพียงสั้นๆ มักพบรวมเป็นกลุ่ม มีลักษณะกลม รูปไข่หรือวงรี ผนังหนาบางครั้งพบตุ่มหรือหนามที่ผนัง พวกที่สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ใน sporangia หรือ vesicles ซึ่งมีการพัฒนาให้ไปอยู่ที่ส่วนปลายของ sporangiophore มีทั้งขนาดสั้นและยาว สปอร์มักถูกสร้างอยู่ใน sporangium ที่ถูกปกคลุมไว้ด้วยกิ่งก้านที่แตกหัก หรือบางทีก็เป็นเส้นใยของ mutisporous sporangia มีหลายรูปร่าง

3.4 Streptomycetes และเชื้อใน genera ที่เกี่ยวข้อง

แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ดังนี้ *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Kineosporia* และ *Sporichthya* ลักษณะที่สำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ เส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกันมีเส้นใยขึ้นมาในอากาศ และเมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์เป็นลูกไข่ มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป ผิวของโคโลนีลักษณะย่นๆ เมื่อมีอายุมาก ที่ผิวหน้าของเส้นใยมีลักษณะเป็นฝุ่นผง ซึ่งก็คือสปอร์ที่สร้างขึ้นนั่นเอง เชื้อในกลุ่มนี้มี DAP ที่ผนังเซลล์เป็นแบบ I (LI-DAP)

3.5 Maduromycetes

แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 7 สกุล ดังนี้ *Actinomadura*, *Microbiospora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomospora*, *Spirillospora* และ *Streptosporangium* กลุ่มนี้เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ สร้างเส้นใยราบที่มีการแตกแขนงไม่มีสปอร์ แต่มีเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศซึ่งมี

การสร้าง arthospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้นหรือใน sporangia ที่มี 1 ถึงหลายสปอร์ ผนังเซลล์เป็นแบบ III (Meso-DAP) น้ำตาลในเซลล์เป็นแบบ type B คือน้ำตาล 3-O-methyl-D-galactose (madurose)

3.6 Thermomonospora and Related Genera

แอกติโนมัยสิทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ดังนี้ *Thermomonospora*, *Actinosynnema*, *Nocardiosis* และ *Streptoalloteichus* กลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญและสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่แตกกิ่งก้านอยู่ในอากาศ ผนังเซลล์เป็นแบบ III (Meso-DAP) ไม่มี mycolic acid แต่มี menaquinone ที่มี isoprenoid จำนวน 9-10 หน่วย (MK-9, MK10) การเรียงตัวและลักษณะของสปอร์จะแตกต่างกันไปตามสกุล

3.7 Thermoactinomyces

กลุ่มนี้มีเพียงสกุลเดียวคือ *Thermoactinomyces* ซึ่งเป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงซึ่งในกลุ่มนี้จะมีเอ็นโดสปอร์อย่างแท้จริง ทนความร้อนได้ดี และมีคุณสมบัติของเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรียครบถ้วน มี G+C Content ต่ำกว่าพวกแอกติโนมัยสิททั่วไป แต่ไปมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพวก *Bacillus* และมีการพัฒนาสร้างเส้นใยอย่างดี และมีสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากพวก *Bacillus*

นอกจากนั้นกลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยชูขึ้นในอากาศพวก *T. dichotomous* มีสีเหลืองส่วนพวกอื่นจะมีสีขาวทุกสปีชีส์เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ และเป็นพวกที่ชอบย่อยสลายซากและเกือบทั้งหมดเป็นพวกที่ชอบเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูง เจริญได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียสผนังเซลล์กลุ่มนี้เป็นแบบที่ III แต่จะไม่มีลักษณะของน้ำตาลและ amino acid ส่วน menaquinone เป็นแบบไม่อิ่มตัวเช่น MK-7 หรือ MK-9 ในสปอร์ dipicolinic acid อยู่

3.8 กลุ่มอื่นๆ

แอกติโนมัยสิทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ดังนี้ *Glycomyces*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatosporia* และ *Saccharothrix* เป็นกลุ่มที่ยังหาความสัมพันธ์กับแอกติโนมัยสิทกลุ่มอื่นๆไม่ได้

ตารางที่ 5 ลักษณะของแอกติโนมัยสิททั้ง 7 กลุ่ม

ที่มา : Glszer และ Nikiado

Group	Cell wall type	Cell sugar patterns	Mol % G+C	Sporangia
Nocardioforms	I	A	59-79	-
Multilocular sporangia	III	B,C,D	57-75	+ / -
Actinoplanetes	II	D	71-73	+
Streptomycetes	I	-	69-78	-
Maduromycetes	III	B,C	64-74	+ / -
Thermomonospora	III	major C	64-73	-
Thermoactinomyces	III	C	52-55	-

4. ประโยชน์ของแอกติโนมัยสิท

4.1 สร้างสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารปฏิชีวนะกว่า 10,000 ชนิดที่รู้จัก ผลิตโดยจุลินทรีย์ สัตว์ส่วน 2 ใน 3 ผลิตโดย จุลินทรีย์ ในกลุ่มแอกติโนมัยสิทและ 74 เปอร์เซ็นต์ มาจากแอกติโนมัยสิทในสกุล *Streptomyces* รองลงมาคือ สกุล *Actinomadura* และ *Micromonospora* (Miyadoh, 1993)

Castillo et al. (2003) รายงานว่าสารปฏิชีวนะ kakadumycins ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. NRRL 30566 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ส่วนสารปฏิชีวนะ meroparamycin ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. MAR01 สามารถยับยั้งได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และ *Candida albicans* (El-Naggaret al., 2006) หรือ *Streptomyces padanus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ fungichromin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctoniasolani* ได้ (Shih et al., 2003)

แอกติโนมัยสิทหลายชนิด โดยเฉพาะจีส *Streptomyces* มีรายงานว่าสามารถสร้าง protease inhibitor ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง human immune-deficiency virus type1 (Clercq, 2001), cytomegalovirus (Shu et al., 1997) และไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Lozitsky et al., 2002; Angelova et al., 2006) ได้ นอกจากนี้ Kim and Park (2008) รายงานว่า *Streptomyces clavuligerus* สามารถผลิต tacrolimus ซึ่งเป็นยาระงับภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) ได้

สารปฏิชีวนะ ivermectin จาก *Streptomyces avermectinius* ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลาย ในปศุสัตว์ สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากปรสิตทั้งที่อยู่บนผิวหนังและภายในร่างกายสัตว์ เช่น หนอนตัวกลม เห็บ พยาธิ ตัวไร นิยมนำมาใช้ในสัตว์จำพวกโค แกะ ม้า หมู เป็นต้น (Omura and Crump, 2004) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยสิทแสดงไว้ในตารางที่ 5

4.2 ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer)

แอกติโนมัยสิทเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในดิน สามารถผลิตเอนไซม์ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่ช่วยย่อยสลายสารต่างๆ เช่น ลิกนิน ไคติน เซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้บางชนิดสามารถย่อยสลายยาปราบศัตรูพืช เช่น diuron (Castillo et al., 2006) และ alachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง (Sette et al., 2005) และย่อยสลายยาฆ่าแมลง lindane (γ -hexachloro cyclohexane) (Benimeli et al., 2008)

แอกติโนมัยสิทสามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น สารประกอบจากพวก chlorobenzene, dichlorobenzene และ phenol (Rehfuss and Urban, 2005) รวมทั้งของเสียที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น 1,4-dioxane (Parales et al., 1994) และสามารถย่อยสลายพลาสติกชนิด Polytetramethylene succinate (PTMS) (Jarerat and Tokiwa, 2001)

แอกติโนมัยสิทหลายชนิดสามารถทนและดูดซับสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ เช่น Polti et al. (2007) รายงานว่าแอกติโนมัยสิทสกุล *Streptomyces* และ *Amycolatopsis* สามารถทนต่อสารประกอบโครเมียม (Cr (VI)) และสะสมสารดังกล่าวไว้ในเซลล์ ซึ่งสามารถนำมาใช้บำบัดการปนเปื้อนโครเมียมในสิ่งแวดล้อมได้ (Amoroso et al., 2001)

ตารางที่ 6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยสิตที่มีรายงานในช่วงปี ค.ศ. 2003-2005
ที่มา : Lam (2006)

สาร	แอกติโนมัยสิต	กิจกรรมการยับยั้ง
Abyssomicins	<i>Verrucosispora</i> sp.	Antibacterial
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anticancer
Bonaectin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; antifungal
Caprolactones	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chandrananimycins	<i>Actinomadura</i> sp.	Antialgal; antibacterial; anticancer; antifungal
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chloro-dihydroquinones	Novel actinomycete	Antibacterial; anticancer
Diazepinomicin	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial; anticancer; anti-inflammatory
3,6-disubstituted indoles	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial
Himalomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Komodoquinone A	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial
Marinomycins	' <i>Marinispora</i> '	Antibacterial; anticancer
Mechercharmycins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer
Sporolides	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown biological activity
Trioxacarcins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anticancer; antimalarial

4.3 ผลิตเอนไซม์และวิตามิน

จุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยสิตสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น เอนไซม์ transglutaminase ซึ่งผลิตโดย *Streptoverticillium* และ *Streptomyces* มีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ (Ando *et al.*, 1989; Cui *et al.*, 2008) เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ทนร้อนซึ่งผลิตโดย *Streptosporangium* sp. ที่คัดแยกจากใบข้าวโพด ซึ่งอาจมีประโยชน์ต่อการนำมาประยุกต์เพื่อปรับปรุงอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง (Stamford *et al.*, 2002) เอนไซม์ไซลาเลส (xylanase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ ผลิตโดย

Thermomonosporafusca BD25 และ *Streptomyces cyaneus* SN32 (Tuncer et al., 1999; Ninawe et al., 2008)

แอกติโนมัยสิทสามารถผลิตวิตามินได้หลายชนิด เช่น *Streptomyces olivaceus* ผลิตวิตามิน B12 (Maitra and Roy, 1960) Strzelczyk and Leniarska (1985) รายงานว่าแอกติโนมัยสิทที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบราก รากและดินอิสระสามารถผลิตกลุ่มของวิตามินบีได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไทอะมีน (thiamine) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) วิตามินบี 12 และโคเอนไซม์ เอ (coenzyme A) (Santos et al., 1976)

4.4 การประยุกต์ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol)

มีการศึกษาการใช้แอกติโนมัยสิทเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อควบคุมแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรครากพืชหลายชนิด เช่นการคลุกดินด้วยสปอร์ของแอกติโนมัยสิทสกุล *Streptomyces* สามารถควบคุมโรครากเน่าและลดจำนวนพยาธิตัวกลม (nematode) ในถั่วอัลฟัลฟาได้ (Jones and Samac, 1996; Samac and Kinkel, 2001; Xiao et al., 2002)

การเคลือบเมล็ดพันธุ์พืชด้วยสปอร์หรือน้ำเลี้ยงเซลล์แอกติโนมัยสิทสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ เช่น งานวิจัยของ Shih et al. (2003) เมื่อนำเมล็ดกะหล่ำมาเคลือบด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *Streptomyces padanus* พบว่าสามารถลดการเกิดโรค damping off ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ได้ นอกจากนี้มีรายงานการใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรค damping off และ root rot ที่เกิดจาก *R. solani* ในถั่วและมะเขือเทศด้วยเช่นกัน (Rothrock and Gottlieb, 1984; Sabaratnam and Traquair, 2002)

Singh and Mehrotra (1980) เคลือบเมล็ดถั่วเขียวด้วยสปอร์ของ *Streptomyces* sp. พบว่าสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *Rhizoctonia bataticola* และช่วยเพิ่มความยาวของราก นอกจากนี้ยังสามารถลดอาการใบร่วงที่เกิดจาก *Phomamedicaginis* ในถั่วอัลฟัลฟา (Samac et al., 2003)

El-Abyad et al. (1993) เคลือบเมล็ดมะเขือด้วยสปอร์ของ *Streptomyces* sp. ก่อนนำไปปลูก พบว่าสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ดี นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. pulcher* และ *Serratia canescens* เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์จาก *Fusarium oxysporum* sp. lycopersici, *Verticillium albo-atrum* และ *Alternaria solani* และยังมีการศึกษาการใช้สเตรปโตมัยสิทควบคุมเชื้อราที่รากและเชื้อราที่รากในเมล็ด (Kortemaa et al., 1994; Tahvonen et al., 1995)

Mycostop เป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้ทางการค้าซึ่งมี *Streptomyces griseoviridis* เป็นองค์ประกอบ (ภาพ 5) นำมาประยุกต์ใช้กับระบบชลประทาน เพื่อควบคุมเชื้อจุลินทรีย์โรครากพืชที่สำคัญหลายชนิด เช่น *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* และ *Alternaria brassicicola* (Tahvonen, 1982a, 1982b, 1993)



ภาพที่ 5 Mycostop

ที่มา <http://agrobio.hu/hu/termek/mycostop-biologiai-gombaolo-szer/>

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์เป็นหนึ่งในผืนป่าตะวันตกที่มีพื้นที่ป่าสมบูรณ์มากที่สุด มีพื้นที่ 894 ตร.กม. หรือประมาณ 558,750 ไร่ พื้นที่ครอบคลุม 2 จังหวัด คือ จังหวัดกำแพงเพชร และ จังหวัดนครสวรรค์ ครอบคลุมพื้นที่อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร และอำเภอแม่วงก์ และกิ่งอำเภอแม่เปิน จังหวัดนครสวรรค์ พื้นที่ทิศเหนือของอุทยานฯ ติดกับอุทยานแห่งชาติคลองลาน ทิศใต้ติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี และทิศตะวันตกติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าอัมผาง จังหวัดตาก ได้รับการประกาศเป็นอุทยานแห่งชาติเมื่อวันที่ 14 กันยายน 2530 พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นแหล่งกำเนิดต้นน้ำลำธาร ประกอบไปด้วยป่าหลายชนิดเช่น ป่าดิบเขา ป่าดิบแล้ง ป่าดิบแล้งผสมป่าเบญจพรรณ ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง มีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและสัตว์สูง สภาพภูมิประเทศเป็นเทือกเขาสูงสลับซับซ้อนเรียงรายกันอยู่ตามเทือกเขาถนนธงชัย ลดหลั่นลงมาจนถึงพื้นราบ ประมาณ 40 - 50 ลูก ยอดที่สูงที่สุดคือ “ยอดเขาโมโกจู” สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,964 เมตร เป็นแหล่งต้นน้ำลำธารต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ส่วนพื้นที่ราบมีไม่มาก ส่วนใหญ่อยู่บริเวณริมแม่น้ำ และเป็นแหล่งแร่ธาตุสำคัญ เช่น แร่ไมก้า

สภาพภูมิอากาศของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในช่วงฤดูหนาวเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน - เดือนกุมภาพันธ์ เป็นช่วงที่เหมาะสมแก่การไปท่องเที่ยวมากที่สุด เพราะอากาศค่อนข้างหนาวเย็น อันเนื่องมาจากลมความกดอากาศสูงมาจากประเทศจีนแผ่ลงมาทางตอนใต้เข้าสู่ประเทศไทยตอนบนและปกคลุมทั่วประเทศ ลมที่พัดสู่ประเทศไทยในฤดูนี้คือ ลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนช่วงฤดูร้อนเริ่มต้นจากเดือนมีนาคม - เดือนพฤษภาคม อากาศค่อนข้างร้อนจัดและมีฝนตกน้อย ทำให้สังคมพืชป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณผลัดใบ สำหรับฤดูฝนเริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายน - เดือนตุลาคม มีปริมาณน้ำฝนโดยเฉลี่ย 1,100 มิลลิเมตรต่อปี

ป่าส่วนใหญ่ของอุทยานฯ ประกอบด้วยป่าเบญจพรรณ ป่าดงดิบ และป่าเต็งรัง มีพันธุ์ไม้ที่สำคัญและมีค่ามากมาย เช่น สัก ประดู่ มะค่าโมง ยางแดง เต็ง รัง นอกจากนี้ ยังมีสัตว์ป่าที่หายาก เช่น ช้างป่า กระตัง กวาง หมูแมวลาย และนกมากกว่า 305 ชนิด จาก 53 วงศ์ซึ่งนกบางชนิดพบเพียงไม่กี่แห่งในประเทศไทยเช่น นกกระเต็นขาวดำใหญ่ นกเงือกคอแดง นกนางเขนดงนกโพระดกหูเขียว นกพญาปากกว้างหางยาว เป็นต้น



ภาพที่ 6 อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ช่องเย็น กม.ที่ 93 อยู่ห่างจากที่ทำการอุทยานฯ 28 กิโลเมตร เป็นจุดสูงสุดของถนนคลองลาน-อุ้มผาง สูง 1,340 เมตร จากระดับน้ำทะเล มีสายลม พัดผ่านและหมอกปกคลุมอยู่เสมอ อากาศหนาวเย็นตลอดทั้งปี และเป็น ที่ดูพระอาทิตย์ตกได้อย่างสวยงามอีกจุดหนึ่ง อุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส เนื่องจากบริเวณนี้เป็น ช่องเขาที่มีสายลมพัดผ่านตลอดเวลา จึงถูกขนานนามว่า “ช่องเย็น” ตามสภาพภูมิอากาศของพื้นที่แห่งนี้ เนื่องจากช่องเย็นมีสภาพอากาศที่เย็นและชื้น จึงพบพันธุ์ไม้ที่ชอบความชุ่มชื้นบริเวณนี้ ได้แก่ กัลยไม้ เฟิร์น มหัสดำ (Treefern) นอกจากนี้ช่องเย็น ยังเป็นถิ่นอาศัยของนกหลากหลายชนิด



ภาพที่ 7 ช่องเย็น

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยเริ่มเก็บตั้งแต่บริเวณทางเข้าอุทยานจนถึงบริเวณช่องเย็น รวมทั้งสิ้น 15 จุด ดังตารางที่ 7 การเก็บทำได้โดยขุดดินลึกลงไปจากผิวดินประมาณ 5-10 เซนติเมตร นำดินใส่ถุงพลาสติก จดบันทึกค่าความสูงจากระดับน้ำทะเล และพิกัดทางภูมิศาสตร์

ตารางที่ 7 จุดเก็บตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์เพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยสิท

จุดเก็บตัวอย่างที่	บริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน
1	บริเวณที่ทำการอุทยาน
2	บริเวณที่ทำการอุทยาน
3	บริเวณที่ทำการอุทยาน
4	บริเวณที่ทำการอุทยาน
5	บริเวณที่ทำการอุทยาน
6	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน
7	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน
8	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน
9	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน
10	ทางเข้าอุทยานจนถึงที่ทำการอุทยาน
11	ช่วงระหว่างที่ทำการอุทยานไปช่องเย็น
12	ช่วงระหว่างที่ทำการอุทยานไปช่องเย็น
13	ช่วงระหว่างที่ทำการอุทยานไปช่องเย็น
14	บริเวณช่องเย็น
15	บริเวณช่องเย็น

2. การเตรียมตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่มาทำการเตรียมเพื่อทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสิท โดยนำตัวอย่างดินมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า เกลี่ยดินให้กระจายทั่วจานอาหาร ผึ่งให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่ร่ม เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แบ่งตัวอย่างดินที่แห้งแล้ว 1 กรัม ใส่ลงในสารละลาย phenol 1.5% ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลง เขย่าให้ดินกระจายตัว แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที (ทำใน Hood) เป็นระดับความเจือจางแรก (10^{-1}) เจือจางตัวอย่างดินในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เป็นระดับความเจือจาง 10^{-2} , 10^{-3} ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

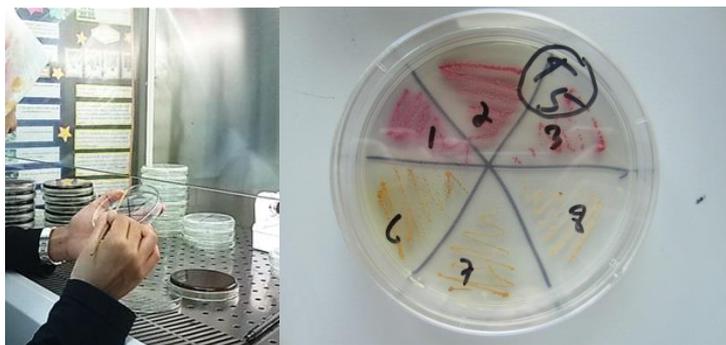


ภาพที่ 8 การเตรียมตัวอย่างดินเพื่อนำมาทำการแยกเชื้อแอสเพอริลลัส

3. การแยกเชื้อแอสเพอริลลัสที่หายากจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

3.1 นำสารละลายที่เตรียมในขั้นตอนมาปริมาณความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate เพื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Starch casien agar ที่เติม Nalidixic acid ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอื่นและเติม Cycloheximide ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งเชื้อราที่เจริญเร็วกว่าเชื้อแอสเพอริลลัส แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15 วัน แล้วสังเกตโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกเอาโคโลนีที่มีขนาดเล็ก และมีลักษณะยึดติดที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 ใช้ไม้เสียบลูกชิ้นปลายแหลมที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อเขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะของแอสเพอริลลัสที่แยกได้จากข้อ 3.1 มาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร HT agar plate โดยใช้วิธี simple streak และเก็บรักษาในอาหาร HT agar slant เพื่อทำการทดสอบต่อไป (ภาพที่ 9)



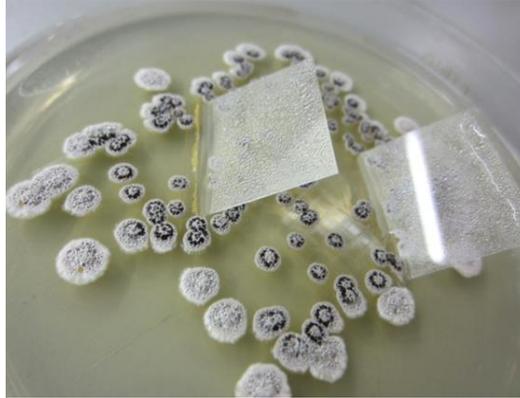
ภาพที่ 9 Restreak แอสเพอริลลัสที่แยกได้บนอาหาร HT agar plate และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร HT agar slant

4. การจัดกลุ่มและจัดจำแนกเชื้อแอสเพอริลลัสที่แยกได้

จัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HT agar plate โดยสังเกตจากลักษณะของ aerial mycelium, substrate mycelium และการสร้างสารสี จากนั้นนำตัวแทนของเชื้อในแต่ละกลุ่มมาทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางเคมีดังนี้

4.1 ศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำได้โดยตรงจากโดยนำเชื้อที่เจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาส่งดูสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และโดยอาศัยเทคนิคการปักสไลด์ โดยทำการปัก cover slip ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนอาหารที่มีการเจริญของเชื้อแอสคิตินัมยีส (ภาพที่ 10) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อมีการสร้างสปอร์ จากนั้นนำ cover slip ไปทำการย้อมด้วยสี crystal violet แล้วทำการตรวจดูการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 10 เทคนิคการปักสไลด์เพื่อศึกษาสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 ศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ (ชนิดของ DAP isomer และ น้ำตาลที่ผนังเซลล์) ตามวิธีของ Lechevalier และ Ruan (Lechevalier and Lechevalier, 1980; Ruan, 1994) มีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมเซลล์ของเชื้อแอสคิตินัมยีสเพื่อนำไปวิเคราะห์

4.2.1 เพาะเลี้ยงปลูกเชื้อแอสคิตินัมยีสในอาหาร HT agar จนเชื้อเจริญดี จากนั้นใช้ cock borer กดลงไปบริเวณที่มีเชื้อเจริญอยู่เพื่อตัดให้ได้ชิ้นวุ้น จากนั้นนำชิ้นอาหารวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ 5 ชิ้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Glucose Yeast Extract broth ปริมาณ 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเพื่อให้อากาศ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

4.2.2 เก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาทีล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดิมอีกครั้ง นำเซลล์ที่ได้แช่ในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้แห้งบนกระดาษกรอง (พยายามอย่าให้เซลล์แห้งติดกระดาษกรอง) จากนั้นนำเซลล์แห้งที่ได้ไปวิเคราะห์ไอโซเมอร์ ของ diaminopimelic acid (DAP) และน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมดต่อไป

การวิเคราะห์ชนิดของกรดไดอะมิโนไพมิลิก

4.2.3 นำเซลล์และเส้นใยที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 ปริมาณ 10 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ในหลอดทดลอง มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 6 N ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดฝาปิดสนิท นำมาอบที่อุณหภูมิ 100 °C 18 ชั่วโมง หรือนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที 2 ครั้ง แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองกากเซลล์ทิ้งไป

4.2.4 นำสารละลายที่กรองได้มาระเหยให้แห้ง ล้างตะกอนที่แห้งแล้วด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อล้างให้ความเป็นกรดหมดไป ครั้งละ 3-4 หยด โดยหลังจากหยดน้ำกลั่นทุกครั้งต้องระเหยให้แห้งบน แผ่นความร้อน (hot plate)

4.2.5 นำส่วนของตะกอนที่แห้งติดกันตลอด มาเติมด้วยน้ำกลั่น 0.3 มล. หรือประมาณ 3-4 หยด ขึ้นกับปริมาณสารที่ได้ คูดสารประมาณ 20 ไมโครลิตรด้วย capillary tube (ถ้าสารเจือจางต้องใช้ปริมาณมากขึ้น) นำมาจุดลงบนกระดาษโครมาโทกราฟีหรือแผ่น silica gel โดยมีสาร meso- DAP (หรือ L-DAP) ไกลซีน และ ไลซีน เป็นสารมาตรฐาน

4.2.6 เตรียมสารละลายชะ ซึ่งประกอบด้วย methanol: H₂O: 10N HCl: pyridine ในอัตราส่วน 80: 17.5: 2.5: 10 โดยปริมาตร โดยต้องทำการเตรียมในตู้ดูดควัน เทลงใน TLC tank ปิดฝา tank ให้สนิทโดยทาด้วยวาสลีน หรือ grease เพื่อไม่ให้สารละลายใน tank ระเหยไป ทิ้งไว้ให้สารละลายอิ่มตัวอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำแผ่น TLC วางใน Tank ใช้เวลาชะประมาณ 2 ชั่วโมง

4.2.7 นำแผ่นโครมาโทแกรมออกมาผึ่งให้แห้งภายในตู้ควัน ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดย ฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน 0.2 % น้ำหนักต่อปริมาตรในสารละลายของบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (water saturated n-butanol) ทิ้งให้แห้งสักครู่ จากนั้นจึงนำกระดาษไปอบที่ 100 °C 5 นาที หรือจนกว่าจะเห็น spot ของสาร ใช้ดินสอวงตำแหน่งของสารไว้ วิเคราะห์ว่าแบคทีเรียแต่ละตัวอย่างพบ meso- DAP หรือ L- DAP ถ้าเป็น meso-DAP ค่า Rf ของสารจะเท่ากับสารมาตรฐาน L- DAP จะถูกชะได้ไกลกว่าและให้ค่า Rf ที่มากกว่าเล็กน้อย

วิธีการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมด

4.2.8 นำเซลล์และเส้นใยที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 ปริมาณ 50 มก. (น้ำหนักแห้ง) มาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N ปริมาตร 1 มล. ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที 2 ครั้ง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองกากเซลล์ทิ้งไป เก็บส่วนใส (filtrate) ไว้ทดสอบต่อไป

4.2.9 นำ filtrate ที่ได้จากข้อ 3.2.8 มาปรับ pH ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้เท่ากับ 5.0-5.5 ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนสีขาวของแอมโมเนียมซัลเฟตตกตะกอน

4.2.10 นำส่วนใสที่ได้มาจุดลงบนแผ่น TLC (Silica gel 60) ในปริมาณ 20 ไมโครลิตร ใช้น้ำตาลกาแลคโทส แมนโนส ซาโลส อะราบิโนส มาดูโรส ฟิวโคส ไรโบส และแรมโนส เป็นสารละลาย มาตรฐาน

4.2.11 เตรียมสารละลายชะ (ในตู้ควัน) โดยประกอบด้วย n-butanol: pyridine: H₂O : toluene ในอัตราส่วน 5 : 3 : 3 : 4 โดยปริมาตร ใน TLC tank ปิดฝา tank ให้สนิทโดยทาด้วยวาสลีน หรือ grease เพื่อไม่ให้สารละลายใน tank ระเหยไป ทิ้งไว้ให้สารละลายอิ่มตัวอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

4.2.12 วางแผ่น silica gel 60 ที่มีสารแล้วลงไปอย่างระมัดระวัง โดยจับที่ขอบ ใช้เวลาในการชะประมาณ 2 ชั่วโมง นำแผ่นโครมาโทแกรมออกมาผึ่งให้แห้งภายในตู้ควัน เมื่อแผ่นโครมาโทแกรมแห้งแล้วฉีดพ่นด้วยสารละลายกรดของ aniline phthalate (กรด phthalic 3.25 กรัม ในบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำ 100 มล. และเติม aniline 2 มล.) ทิ้งให้แห้งสักครู่ แล้วนำแผ่นโครมาโทแกรมไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่เกิดขึ้น ใช้ดินสอวงตำแหน่งของสารไว้ นำมาวิเคราะห์ว่าแอสตีโนมายสิท ชนิดนั้น ๆ พบน้ำตาลชนิดใดบ้าง

4.3 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณของแอสตีโนมายสิทครั้งนี้ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Phire Plant

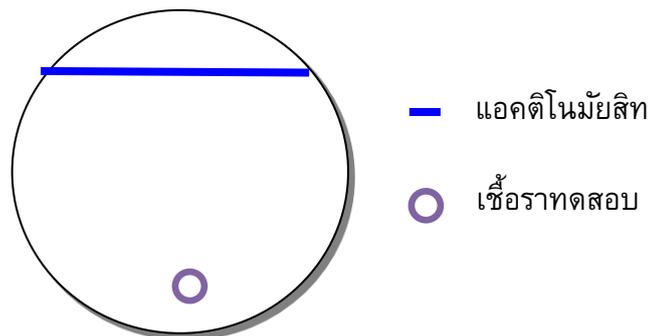
Direct PCR Kit โดยเริ่มจากคัดเลือกโคลนนี้เดี่ยวของเชื้อแอกติโนมัยสิทไปเพาะเลี้ยงใน ISP2 broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่ตั้งไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บเซลล์ของแอกติโนมัยสิทโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบน (supernatant) ที่ทิ้งไป เติม Dilution buffer ปริมาตรประมาณ 2 เท่าของเซลล์ บดเซลล์ด้วยปลายปิเปตทิป ขนาด 100 ไมโครลิตร กับข้างหลอดเพื่อให้เซลล์แตก สังเกตจากสารละลายมีลักษณะ ชุ่นและข้นขึ้น นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสด้านบนไปเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ 16S rRNA ยีน ด้วยเทคนิค PCR

4.3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ 16S rRNA ยีน ด้วยเทคนิค PCR ทำด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine) ใช้ส่วนใสจากข้อ 3.3.1 จะใช้ปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร องค์ประกอบของ PCR reagent จะประกอบด้วย 2x Phire[®] Plant PCR Buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร Phire[®] Hot Start II DNA Polymerase ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร primer: ACT283F (5'-GGG TAG CCG GCC UGA GAG GG-3') และ 1360R (5'-CTG ATC TGC GAT TAC TAG CGA CTC C-3') (McVeigh et al., 1996) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแอกติโนมัยสิท มี Thermal Cycling ในช่วง Pre-denature ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีจำนวน 1 รอบ ในช่วง Denature จะใช้อุณหภูมิที่ 98 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วินาที , Annealing จะใช้ อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาทีและช่วง Extension จะใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 40 รอบ และ Final extension อีก 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแอกติโนมัยสิทโดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่คือ ACT283F และ 1360R ให้ผลผลิต PCR ขนาด ประมาณ 1100 คู่เบส หลังจากที่ได้ผลผลิต PCR แล้วจะทำการตรวจสอบความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product โดยการใช้เทคนิค agarose gelelectrophoresis โดยเทียบกับเอ็นเอขนาดมาตรฐาน (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) โดยใช้ agarose gel 1.2 % จากนั้นย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ดู ภายใต้ UV

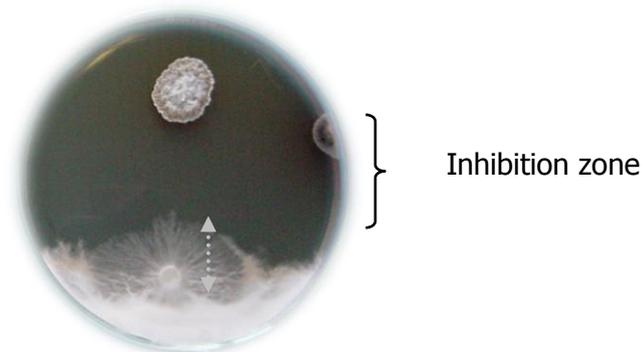
4.3.3 ส่วนการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ในแอกติโนมัยสิท จะดำเนินการส่งไปวิเคราะห์ยังบริษัท Macrogen Inc. Service ที่ประเทศเกาหลีใต้ ตรวจสอบความถูกต้องของ Chrommatograms ด้วยโปรแกรม Bioedit โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสิทในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือนกัน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแอกติโนมัยสิทโดยการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.2 (Tamura et al., 2011) ตาวโหนดลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ เพื่อนำมาเทียบเคียงกัน ด้วยวิธี multiple sequences alignment ด้วยการใช้โปรแกรม Clustal W version 5.2 (Higgins et al., 1994) แกะลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการตัดบางส่วนออก (Trim) จากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนประมาณ 1000 เบส ของยีน 16S rRNA ในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย Neighbor-Joining tree (Bootstrap 1,000 ครั้ง)

5. ทดสอบการสร้างสรรค์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1 ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ ด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett et al., 1996) ทำได้โดยเพาะเชื้อแอคติโนมัยสิท ลงบนด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะเชื้อราทดสอบลงไปในด้านตรงข้ามกับเชื้อแอคติโนมัยสิท ดังภาพที่ 11 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อราเจริญเต็มเพลท เทียบกับชุดควบคุมที่เป็นจานอาหารที่เลี้ยงแต่เชื้อราอย่างเดียว วัดขนาดของโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) ดังภาพที่ 12 บันทึกในตารางบันทึกผล



ภาพที่ 11 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay



ภาพที่ 12 การวัดขนาดของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone)

5.2 ทดสอบการสร้างสรรค์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*, *Staphylococcus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ในชั้นปฐมภูมิ ด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett et al., 1996) ทำได้โดยการเพาะเชื้อแอคติโนมัยสิทไว้ด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะแบคทีเรียโดยใช้ห้วงถ่ายเชื้อขีดเป็นแนวตั้งฉากกับเชื้อแอคติโนมัยสิท จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตดูโซนการยับยั้ง (Inhibition Zone) ที่เกิดขึ้น

5.3 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์อะมัยเลส แมนนาเนส โปรตีเอส และเซลลูเลส โดย ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารเหลว basal medium ที่เติมสับสเตรทของเอนไซม์แต่ละชนิด คือ Starch, (Locust bean gum) LBG, skim milk และ carboxymethylcellulose (CMC) ชนิดละ 1%

ตามลำดับ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเพื่อให้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้นำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธี gel diffusion assay (Downie *et al.*, 1994) ดังนี้

เอนไซม์เซลลูเลส

โดยเตรียม CMC ผสมกับ agar 1% เทลงในจานอาหารในปริมาณที่เท่าๆ กัน เจาะหลุมแล้วนำน้ำเลี้ยงมาหยอดลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเท congo-red (1 % W/V) ลงบนจานทดสอบทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วย 1 M NaCl เป็นเวลา 15 นาที (Teather and Wood, 1982). ถ้ามีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จะให้สีเหลือง = + แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลาย cellulase จะให้สีแดง = -

เอนไซม์แมนนาเนส

โดยเตรียม LBG ผสมกับ agar 1% เทลงในจานอาหารในปริมาณที่เท่าๆ กัน เจาะหลุมแล้วนำน้ำเลี้ยงมาหยอดลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเท congo-red (1 % W/V) ลงบนจานทดสอบทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วย 1 M NaCl เป็นเวลา 15 นาที (Teather and Wood, 1982). ถ้ามีการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส จะให้สีเหลือง = + แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลาย cellulase จะให้สีแดง = -

เอนไซม์อะมัยเลส

โดยเตรียม soluble starch ผสมกับ agar 1% เทลงในจานอาหารในปริมาณที่เท่าๆ กัน เจาะหลุมแล้วนำน้ำเลี้ยงมาหยอดลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายไอโอดีนลงไปบนจานทดสอบ ถ้ามีการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสจะเกิดโซนใส = + แต่ถ้าไม่มีการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสจะไม่เกิดโซนใส = -

เอนไซม์โปรตีเอส

โดยเตรียม Skimmilk ผสมกับ agar 1% เทลงในจานอาหารในปริมาณที่เท่าๆ กัน เจาะหลุมแล้วนำน้ำเลี้ยงมาหยอดลงในหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตโซนใสรอบๆหลุม บนจานทดสอบ ถ้ามีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจะเกิดโซนใส = + แต่ถ้าไม่มีการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสจะไม่เกิดโซนใส = -

5.4 ทดสอบความสามารถในการสร้างสาร anticancer และ ทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์คน และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยปฏิบัติการกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งตั้งอยู่ที่ตำแหน่งละติจูด $16^{\circ}33'29''$ เหนือ และลองจิจูด $99^{\circ}30'40''$ ตะวันออก โดยประมาณ โดยเริ่มเก็บตั้งแต่บริเวณทางเข้าอุทยานจนถึงบริเวณช่องเย็น ซึ่งมีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1340 เมตร รวมทั้งสิ้น 15 จุด ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 จุดเก็บตัวอย่างดินบางบริเวณ

A: จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 B: จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 C: จุดเก็บตัวอย่างที่ 3
 D: จุดเก็บตัวอย่างที่ 4 E: จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 F: จุดเก็บตัวอย่างที่ 6

2. การแยกเชื้อแอกติโนมัยสิทธิ์ที่หายากจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วังก์

ผลการแยกเชื้อจากดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแม่วังก์ ทั้งหมด 15 จุด พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสิทธิ์ทั้งหมด 166 ไอโซเลท ดังตาราง 8

ตารางที่ 8 ผลการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแห่งชาติแม่วังก์

จุดเก็บ ตัวอย่าง	ไอโซเลท	จำนวน ไอโซเลท
1	MW101, MW102, MW103, MW104, MW105, MW106, MW107, MW108, MW109, MW110	10
2	MW201, MW202, MW203, MW204, MW205, MW206, MW207, MW208, MW209, MW210, MW211, MW212, MW213, MW214, MW215, MW216, MW217, MW218, MW219, MW220, MW221, MW222, MW223, MW224, MW225	25
3	MW301, MW302	2
4	MW401, MW402, MW403, MW404, MW405, MW406, MW407, MW408, MW409, MW410, MW411	11
5	MW501, MW502, MW503, MW504, MW505, MW506, MW507, MW508, MW509, MW510, MW511, MW512, MW513, MW514, MW515	15
6	MW601, MW602, MW603, MW604, MW605, MW606, MW607, MW608, MW609	9
7	MW701, MW702, MW703, MW704, MW705, MW706, MW707, MW708, MW709, MW710, MW711, MW712, MW713, MW714, MW715, MW716, MW717, MW718, MW719, MW720	20
8	MW801, MW802, MW803, MW804, MW805, MW806, MW807, MW808, MW809, MW810, MW811, MW812, MW813, MW814, MW815, MW816, MW817, MW818, MW819, MW820, MW821, MW822, MW823, MW824, MW825, MW826, MW827	27
9	MW901, MW902, MW903, MW904	4
10	MW1001, MW1002, MW1003, MW1004, MW1005, MW1006, MW1007, MW1008, MW1009, MW1010, MW1011, MW1012, MW1013, MW1014	14
11	MW1101, MW1102, MW1103, MW1104	4
12	MW1201, MW1202, MW1203, MW1204, MW1205, MW1206, MW1207, MW1208, MW1209, MW1210, MW1211, MW1212, MW1213, MW1214, MW1215, MW1216, MW1217, MW1218	18
13	MW1301, MW1302, MW1303	3
14	MW1401, MW1402	2
15	MW1501, MW1502	2
รวมทั้ง		166

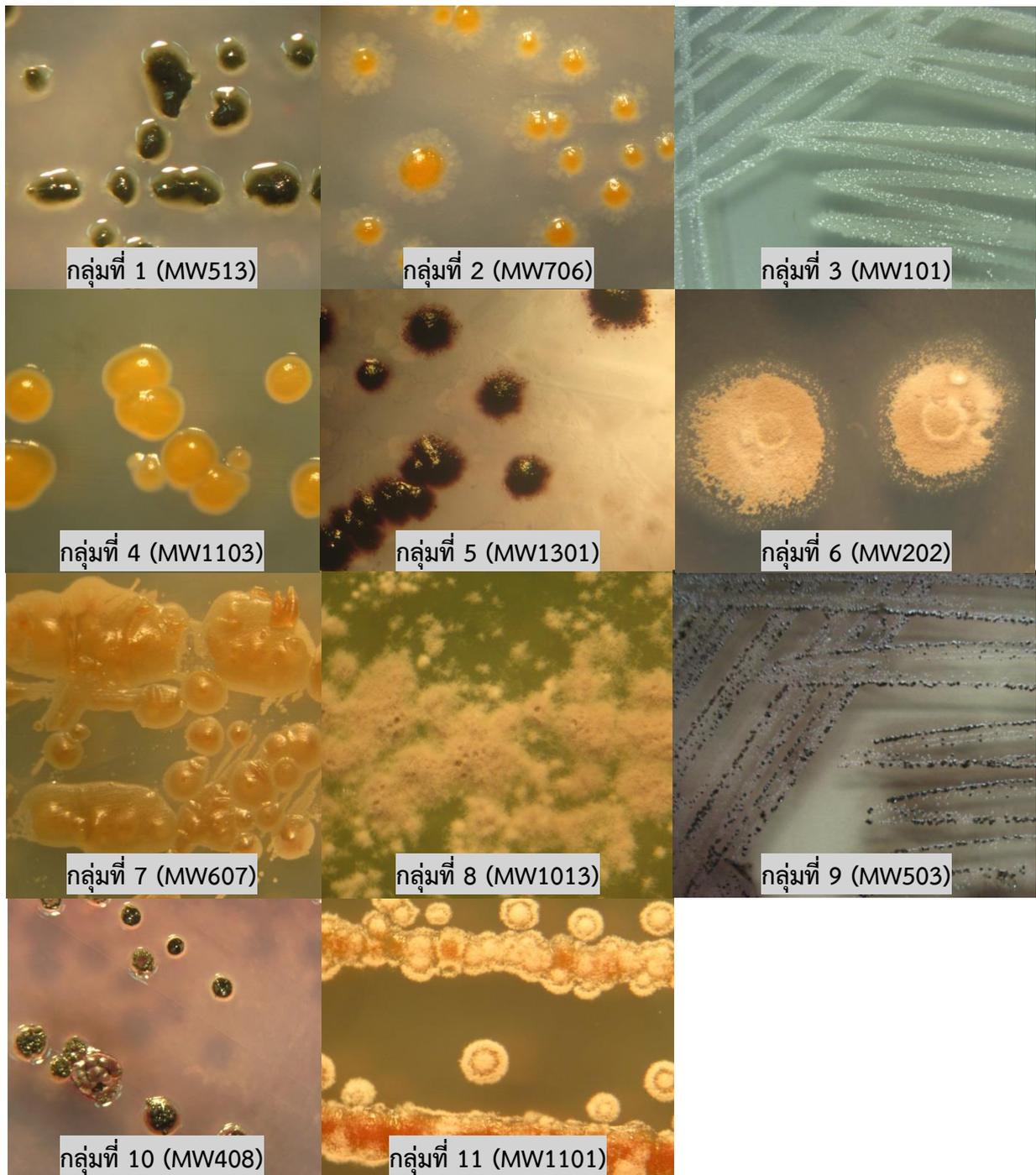
3. การจัดกลุ่มและจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้

จัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HT agar plate โดยสังเกตจากลักษณะของ aerial mycelium, substrate mycelium และการสร้างสารสี พบว่าได้จำนวนทั้งหมด 11กลุ่ม (ตารางที่ 9) และเมื่อนำตัวแทนของเชื้อในแต่ละกลุ่มมาทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate ดังภาพ 14 และมีการสร้างสปอร์ดดังภาพ 15 และมีลักษณะทางเคมีได้ผลดังตาราง 10

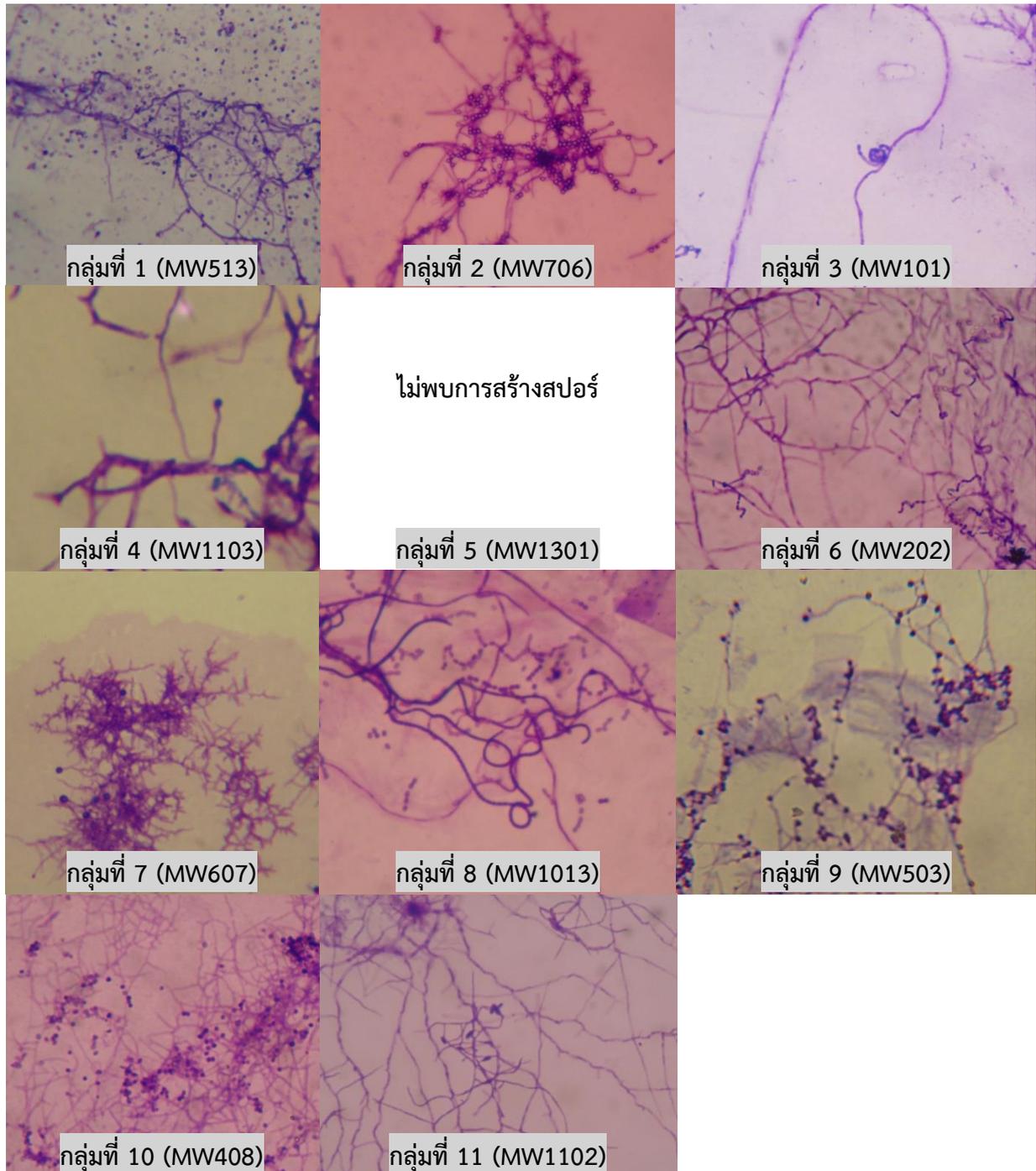
ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ตามลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate

กลุ่ม ที่	ลักษณะเชื้อบนอาหาร HT			ไอโซเลท	จำนวน
	สีตัว เซลล์	สีสปอร์	สี pigment		
1	ส้ม	ดำ	-	MW110 MW410 MW411 MW506 MW507 MW508 MW509 MW510 MW511 MW512 MW514 MW515 MW702 MW703 MW704 MW705 MW707 MW1001 MW1002 MW1003 MW1004 MW1005 MW1006 MW1007 MW1008 MW1009 MW1010	27
2	ส้ม	-	-	MW104 MW105 MW106 MW107 MW108 MW701 MW706 MW806 MW807 MW808 MW809 MW810 MW811 MW812 MW813 MW814 MW815 MW816 MW817 MW818 MW819 MW901 MW902 MW903 MW904 MW1201 MW1202 MW1203 MW1204 MW1205 MW1206 MW1207 MW1208 MW1209 MW1210 MW1211 MW1212 MW1213 MW1214 MW1215 MW1216 MW1217 MW1218 MW1401 MW1402 MW1501 MW1502	47
3	ขาวครีม	ขาว	-	MW101 MW102 MW103 MW217 MW218 MW219 MW220 MW401 MW402 MW403 MW404 MW405 MW406 MW407 MW603 MW604 MW605 MW606 MW827	19
4	เหลืองสด	-	-	MW302 MW820 MW821 MW822, MW823 MW1011 MW1103	7
5	แดงเข้ม	-	-	MW301 MW501 MW502 MW503 MW1301 MW1302 MW1303	7
6	ครีม	น้ำตาลเทา	-	MW201 MW202 MW203 MW204 MW205 MW206 MW207 MW208 MW209 MW210 MW211 MW212 MW213 MW214 MW215	30

กลุ่ม ที่	ลักษณะเชิอบนอาหาร HT			ไอโซเลท	จำนวน
	สีตัว เซลล์	สีสปอร์	สี pigment		
				MW216 MW224 MW225 MW714 MW715 MW716 MW717 MW718 MW719 MW720 MW720 MW824 MW825 MW826 MW1014	
7	ครีม	น้ำตาล	-	MW607 MW221 MW222 MW223	4
8	ครีม	เทาขอบขาว	เหลือง	MW109 MW507 MW608 MW609 MW1013	5
9	ดำ	ดำ	น้ำตาลเข้ม	MW513	1
10	ม่วงแดง	ดำ	น้ำตาลดำ	MW408 MW409 MW504 MW505 MW601 MW602 MW801 MW802 MW803 MW804 MW805	11
11	ส้มอม ชมพู	ขาวอมส้ม	ส้มอ่อน	MW708 MW709 MW710 MW711 MW712 MW713 MW1101, MW1102	8
					166



ภาพที่ 14 ลักษณะการเจริญบนอาหาร HT agar plate ของแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม



ภาพที่ 15 ลักษณะการสร้างสปอร์เมื่อมีการเจริญบนอาหาร HT agar plate เป็นเวลา 15 วัน ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม

ตาราง 10 ชนิดของ DAP isomer และ น้ำตาลที่ผนังเซลล์ ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่	ไอโซเลท	ชนิดของDAP isomer	ชนิดของน้ำตาลที่ผนังเซลล์
1	MW513	meso-DAP	xylose, Glucose and arabinose
2	MW706	meso-DAP	Xylose and glucose
3	MW101	LL-DAP	Glucose, galactose and xylose
4	MW1103	meso-DAP	Xylose and glucose
5	MW1301	meso-DAP	madurose and glucose.
6	MW202	LL-DAP	Glucose, galactose and xylose
7	MW607	meso-DAP	Glucose and galactose
8	MW1013	LL-DAP	Glucose and galactose
9	MW503	meso-DAP	glucose, xylose, arabinose, mannose and ribose
10	MW408	meso-DAP	xylose, arabinose and glucose
11	MW1102	meso-DAP	mudrose and glucose

4. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีนของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มโดยการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ 16S rRNA ยีน ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นส่งไปวิเคราะห์ยังบริษัท Macrogen Inc. Service ที่ประเทศเกาหลีใต้ พบว่าเชื้อที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มมีความยาวของลำดับในบริเวณ 16S rRNA ยีน ประมาณ 800- 1000 bp ดังตาราง 11 เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาเทียบเคียงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสิทในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ด้วยวิธี BLASTN search เพื่อตรวจสอบความเหมือนกัน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเชื้อที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อแอกติโนมัยสิท 3 จีแนส คือ *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* และ ยังไม่ทราบชนิด อีก 2 กลุ่ม โดยมีเปอร์เซ็นต์ identity 99% ดังตาราง 12

ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ไอโซเลท	ลำดับเบส
1	MW513	CACACTGGGACTGAGACACGGCCATACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGG AAGCCTGATGCACGACGCAAGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGA AGCGTAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGCCAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGG GTGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCTTGTGCGGTGACCGTGAAAAC TTGGGGCTCAACTCCAAGCCTGCGGTGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCT GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACT GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTG AAGCGTAGGTGTGGGGGCTCTCCGGTTCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGG AGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTA ATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGGCCGAAAACCTCCAGAGATGGGGGTCTCT TCGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGGTTATGGCGGGGACTCATCGAAGACTGCCGGGGCAA CTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAAT GGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCCAATGCCAAATTAGCCGGTCTCAGTTCGGATCG GGTCTGCAACTCGACCCGTGAAGTCGGAGTCGCTACTAATCCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATAC

ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทธิ์ที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ไอโซเลท	ลำดับเบส
		GTTCCCGGGCCTTG
2	MW706	CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGC CTGATGCAGCGACGCCCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCG AGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAGGGTGC GAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGGGGGCGGCTTGTGCGCTCGACCGTGAACACTTGG GGCTCAACCCCAAGCCTGCGGTGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGGCG CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCG CTAGGTGTGGGGACCTCTCCGTTTCTGTGCCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGGCATGCGGATTAATTCG ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGGCCGCAAACTCGCAGAGATGTGAGTCCCTTCGGG GGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG CGCAACCTCGTTCGATGTTGCCAGCGGTTATGGCGGGACTCGTCAAGACTCGCGGGTCAACTCGG AGGAAGGTGGGGATAACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCG GTACAATGGGCTGCGATACCGGAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCT GCAACTCGACCCGTAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCC GGCCTTGTACACACCG
3	MW101	ACCACTTCGGTGGGATTAGTGGCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC CTGATGCAGCGACGCCCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAAGAGCG CAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGC AAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGATGTGAAAGCCCGG GGCTTAACCCCGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTG TAGCGGTGAAATGCGCAGCTATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACG CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGGTGGGCA CTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCTCCGCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGCTAAAACGGAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCG ACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTG GTCGGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA GCGCAACCTTGTCCCGTGGAGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGT AACTCGGAGGAAGGTGGGGACCAGTCAAGTCATCATGCCCTTATGCTTGGGTGCACACGTGCTACA ATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATT GGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAGTGTGCAAGCCGGT GGCCCAACC
4	MW1103	TGATCTGGCTCAGGACCGGCCAGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGAT GCAGCGACGCCCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTAAGT GACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAAGACGTAGGGTGCAGGCG TTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTGACTGTGAAAACCCGAGCTC AACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCG GTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAG GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTNGTCAACGCTGTAACGTTGGGCGCTAGG TGTGGGGGGCCTCTCCGTTCCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAACCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCG CAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCA ACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTACATGGCCGCAAACTCGCAGAGAAGTGGGGTCTTCGGGGGCGG TCACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCTCGTTCGATGTTGCCAGCGGTTATGGCGGGACTCATCGAAGACGGCCGGGTCAACTCGGAGGAA GGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACA ATGGGCTGCGATACCGTGGAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAAC TCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACAACAAGGTAGC

ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทธิ์ที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ไอโซเลท	ลำดับเบส
		CG
5	MW1301	ไม่สามารถสกัด DNA และ เพิ่มปริมาณยีน16S rRNA
6	MW202	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAACAGTGGGGAATATTGCACAAT GGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAG GGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGACCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA CGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGCGCTTGTACAGTCCGGATGT GAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGTCTGCATTGCATACGGCAGGCTAGAGTTCCGGTAGGGAAGATCGGA ATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCCCGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC GATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGTTGGGAAGTGGTGTGGGCGACATCCACGTCGTCGGTCCGCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCGGCC TGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTG GCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCACCGCTTGACATACACCGAAACGTCTGGAGACAGGCG CCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTAAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCTTTATTTCTGTGTTGCCAGCACGCCCTTCGGGGTGGTGGGACTCACAGGAG ACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGC ACACGTGCTACAATGGCCGATACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTC TCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTG CTGCGGTGAATACAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT
7	MW607	ไม่สามารถสกัด DNA และ เพิ่มปริมาณยีน16S rRNA
8	MW1013	CAGGACGCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGC AGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGA CGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTT GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGATTGTGAAAGCCCGAGGCTTAA CCTCGGGTCTGCAGTCGATACCCGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATCCTGGTGTAGCGGT GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGA GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGAAGTGGTGG TTGGCGACATCCACGTCGTCGAAACGACGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAAC GCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGAAACGCTCTGGAGACAGGCGCCCTTGTGGTGGTG TACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGGGCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCTTGTG-CCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCG- GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCC GGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTC TGCAACTCGACCCATG-AAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATAC
9	MW503	TAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA TGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCA GGGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAG ACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGCTTGTGCGCTCGACTG TGAAAACCCGAGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGG AATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATACAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCGAGTCTCTGGGC CGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGGGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTA AACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGCTCTCCGGTCCCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGC CTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGC GGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGGCCGAAAACCTCGCAGAGATGTGA GGTCTTCGGGGCGGTCACAGGTGGTGCATGGCTGTAGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT CCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTCGATGTTGCCAGCGGTTATGGCGGGGACTTCTCGAAGACTGCCGG GGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATAA

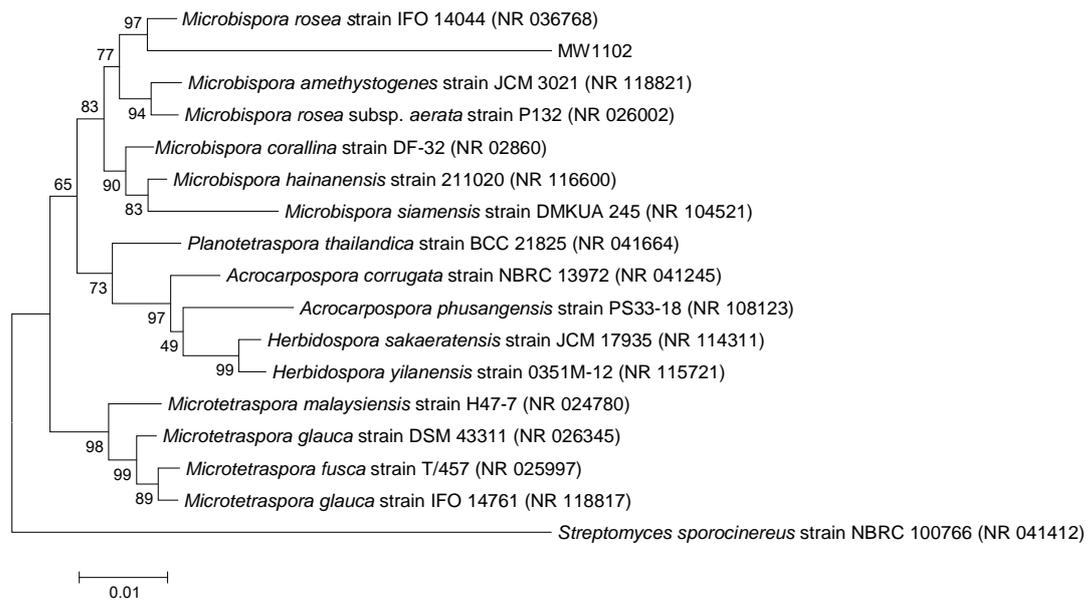
ตารางที่ 11 ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน ของแอกติโนมัยสิทธิ์ที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ไอโซเลท	ลำดับเบส
		TACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCG GATCGGGGTCTGCAACTCGACCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTG AATA
10	MW408	CGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAGACGACCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG GGGAATATTGCACAATGGGCGGACCCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT AAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCCAACTACGTGCC AGCAGCCGCGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGC TTGTGCGCTGACTGTGAAAACCGCGGCTCAACTGCGGGCCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTC GGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTATTGGTAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAA GGCGGGTCTCTGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGTAGGTGTGGTTGGCCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGACGTAACG CATTAAGCGCCCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA GCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCACCTGGGTTTGACATGGCCGCAAAAC CTGCAGAGATGTAGGGTCTTCGGGGCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAG ATGTTGGGTTAAGTCCCAGCACGAGCGCAACCCTCGTTGATGTTGCCAGCGGTTATGGCGGGAACCTCA TCGAAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAG GGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAG CCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCA GCAACGCTGCGG
11	MW1102	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGCGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAAT GGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAG GGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTA GGGCGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTCGCTGCTGCCGTGAAA GCCCCGTGGCTTAACACTACGGTCTGCGGTGGATACGGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGCAAGCGGAATTC CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGCTTGTGGCCAGTT CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGCGGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGT TGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTCCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGG AGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTA ATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCC TTTGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATAACTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCA ACGAGCGCAACCCTTGTTCATGTTGCCAGCACGCCCTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCG GGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAACATG CTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGACGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTC GGATTGGGTCTGCAACTCGACCCATGAATTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGT GAATACAACAAGGTAGCCGTACCGGAGGGTGGGCTGGATCACCTCCT

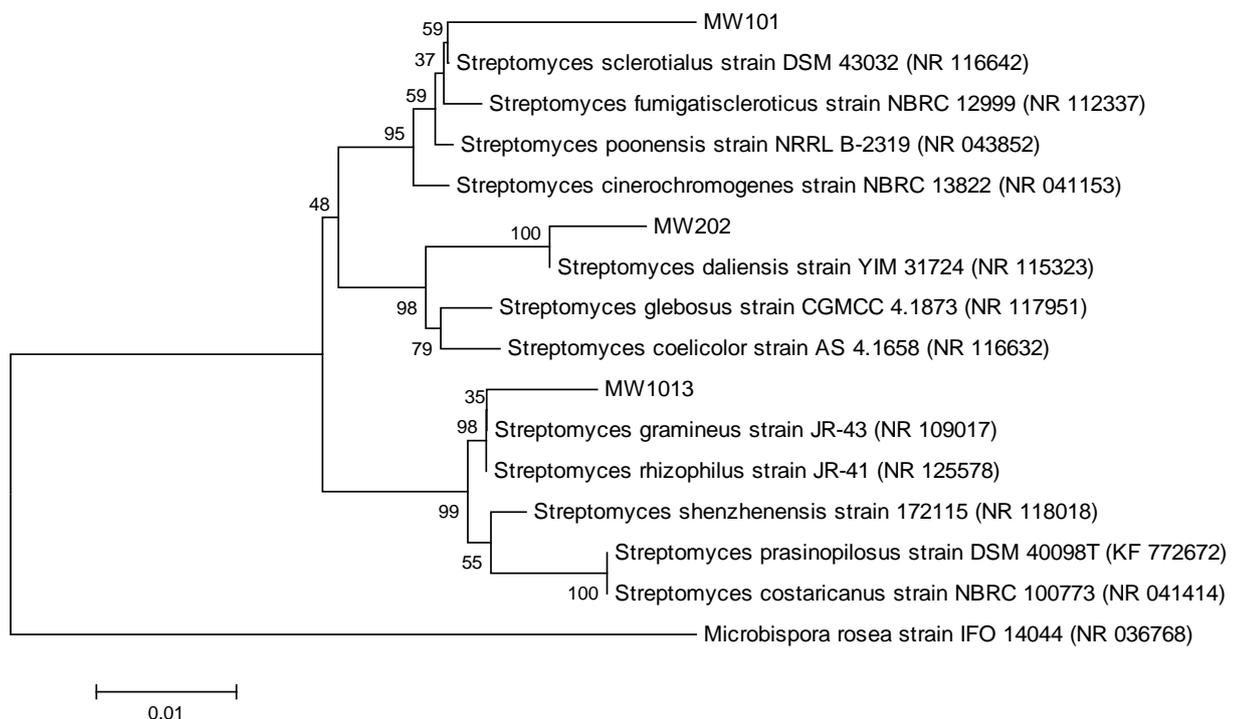
ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์ identity ของ ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีนของเชื้อที่แยกได้เมื่อเทียบเคียงกันกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอสโคไมซีตาในฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน NCBI

กลุ่ม ที่	ไอโซเลต	สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด	Identities
1	MW513	<i>Micromonospora mirobrigensis</i> strain WA201 (NR 042236)	1056/1064(99%)
2	MW706	<i>Micromonospora jinlongensis</i> strain NEAU-GRX11 (NR125650)	1063/1067(99%)
3	MW101	<i>Streptomyces sclerotialus</i> strain DSM 43032 (NR116642)	1013/1019(99%)
4	MW1103	<i>Micromonospora echinofusca</i> strain DSM 43913 ^T (X92625)	1010/1014(99%)
6	MW202	<i>Streptomyces daliensis</i> strain YIM 31724 (NR115323)	1036/1043(99%)
8	MW1013	<i>Streptomyces rhizophilus</i> strain JR-41 (NR125578)	1033/1041(99%)
9	MW503	<i>Micromonospora coriariae</i> strain NAR01 ^T (AJ784008)	1028/1033(99%)
10	MW408	<i>Micromonospora haikouensis</i> strain 232617 ^T (GU130129)	1024/1034(99%)
11	MW1102	<i>Microbispora rosea</i> IFO 14044 (NR 036768)	1022/1037(99%)

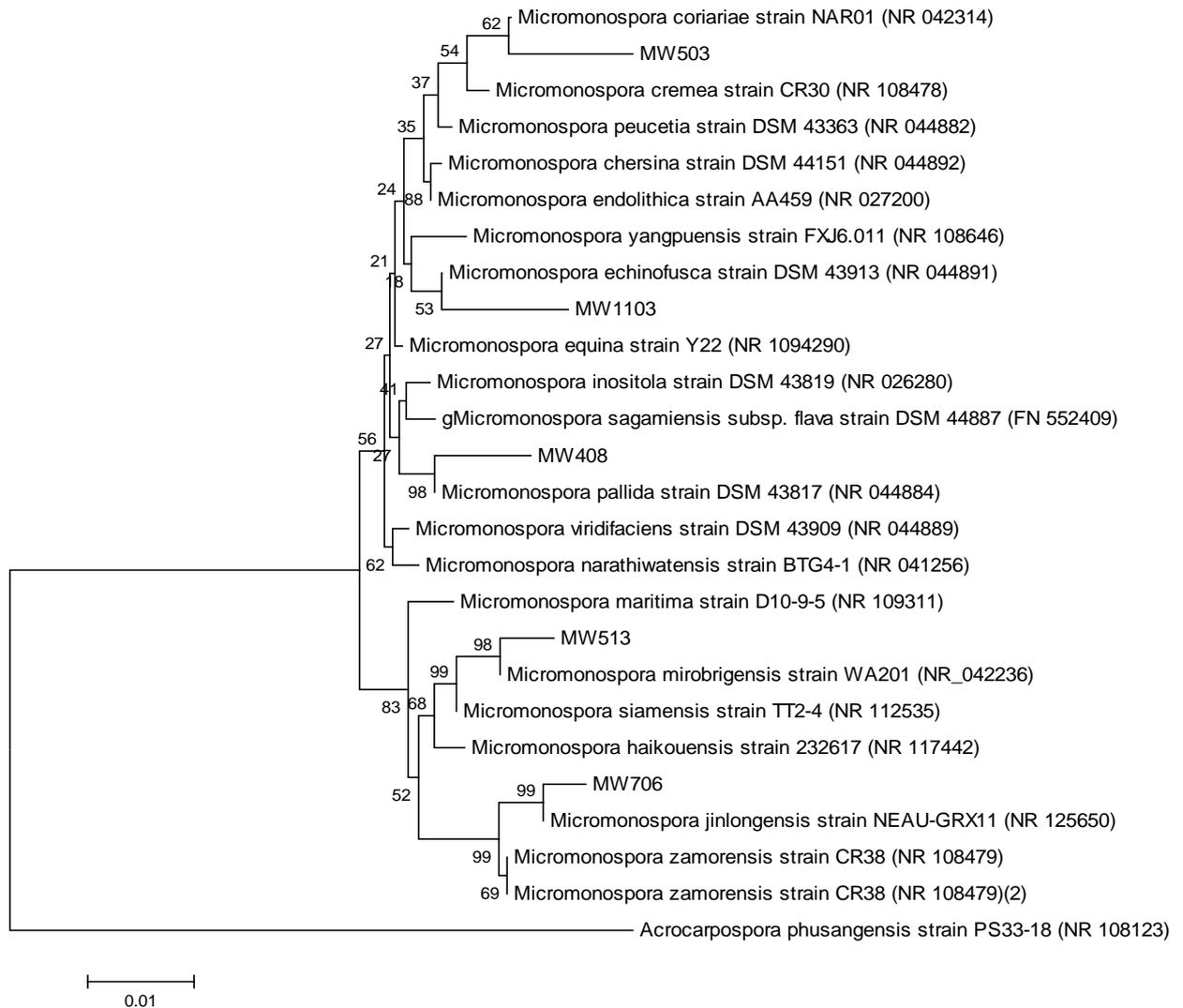
ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแอสโคไมซีตาโดยการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) ดาวิโหลด ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อแอสโคไมซีตาที่แยกได้ เพื่อนำมาเทียบเคียงกัน ด้วยวิธี multiple sequences alignment ด้วยการใช้โปรแกรม Clustal W version 5.2 (Higgins *et al.*, 1994) แก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการตัดบางส่วนออก (Trim) จากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนประมาณ 1000 เบส ของยีน 16S rRNA ในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย Neighbor-Joining tree (Bootstrap 1,000 ครั้ง) พบว่าเชื้อที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มมีความสัมพันธ์กับเชื้อที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI ในแต่ละจีนัสดังภาพที่ 16-18



ภาพที่ 16 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มจิ้นัส *Microbispora* เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ *Streptomyces sporocinereus* เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .



ภาพที่ 17 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มจิ้นัส *Streptomyces* เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ *Microbispora rosea* เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .



ภาพที่ 18 Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยสิทที่แยกได้ในกลุ่มจีนิส *Micromonospora* เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ใช้ลำดับเบสของ *Acrocarpospora phusangensis* เป็นกลุ่ม Outgroup สำหรับ rooting tree และจำนวนแสดงบนกิ่ง (%) มาจาก 1000 bootstrap tree Bar, 0.01 K_{nuc} .

5. ทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antifungal, anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial) เอนไซม์ anticancer โดยการทดสอบกับเชื้อจำนวน 38 ไอโซเลท จาก 166 ไอโซเลท พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารได้ 4 ชนิด คือ anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, เอนไซม์โปรตีเอส และ เอนไซม์เซลลูเลส มี จำนวน 1 ไอโซเลท คือ MW1103 ความสามารถในการสร้างสารได้ 3 ชนิด มี 4 ไอโซเลท คือ MW203 MW206 MW225 และ MW1102 ดังตาราง 13 และ ภาพที่ 19-20

ตารางที่ 13 ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

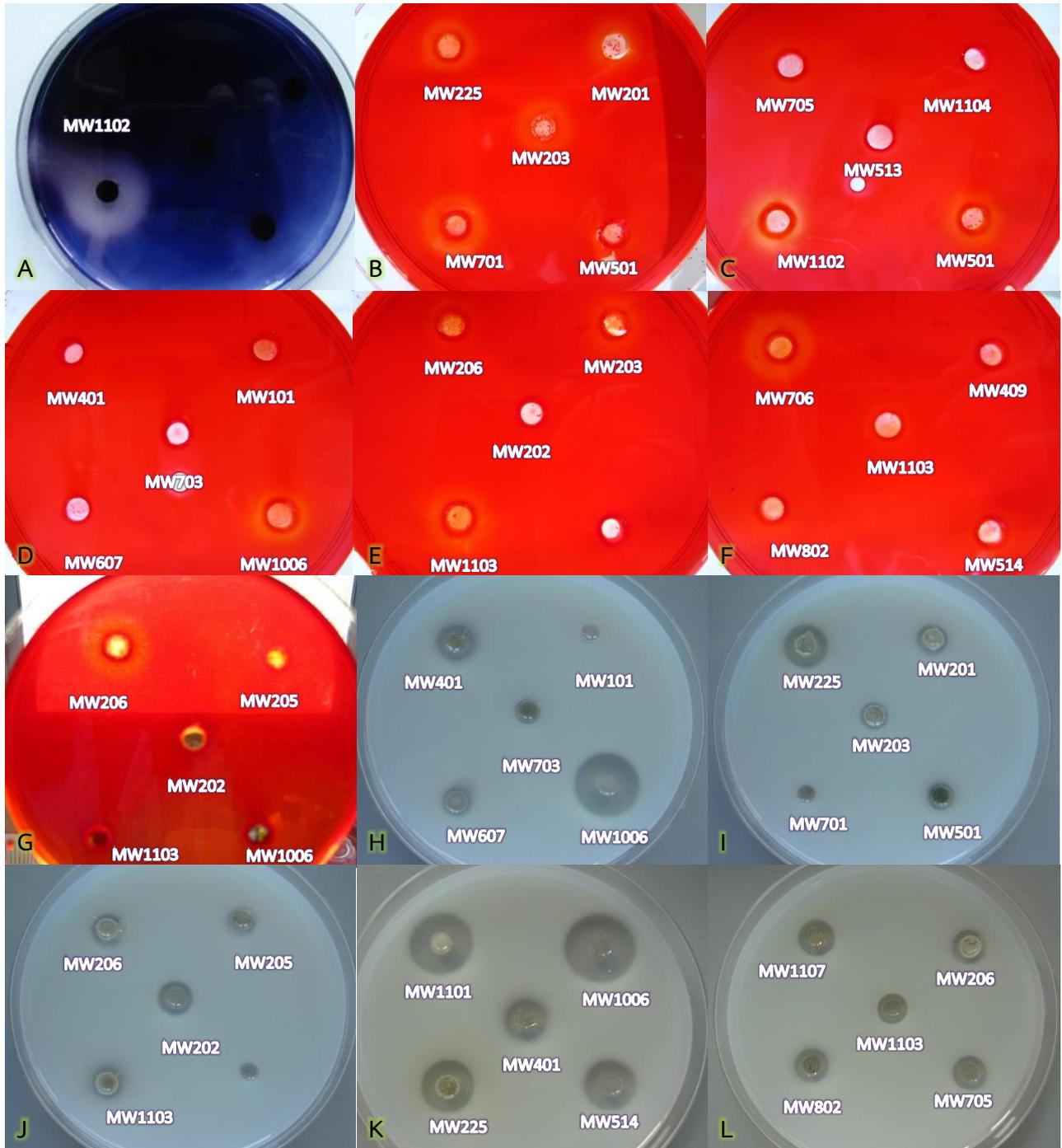
ลำดับที่	isolate	Inhibition zone/clear zone (mm.)							anticancer	ความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์
		antifungal	Anti-G+ bacteria	Anti-G- bacteria	protease	cellulase	mannase	amylase		
1	MW101	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	MW201	0	0	0	8	9	0	0	ND	ND
3	MW 202	0	0	0	9	0	0	0	ND	ND
5	MW 203	0	0	0	7	12	12	0	0	0
6	MW 205	0	0	0	8	11	0	0	0	0
7	MW 206	0	0	0	9	8	13	0	0	0
8	MW 225	0	38	0	14	10	0	0	0	0
9	MW 401	0	8	0	13	0	0	0	0	0
10	MW 408	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
11	MW 409	0	0	0	6	0	0	0	ND	ND
12	MW 410	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
13	MW 411	0	0	40	0	0	0	0	ND	ND
14	MW 501	0	40	0	8	0	0	0	ND	ND
15	MW 503	11	0	0	0	0	0	0	ND	ND
16	MW 513	0	0	0	8	0	0	0	ND	ND
17	MW 514	0	0	0	14	0	12	0	0	0
18	MW 607	0	0	0	8	0	0	0	0	0
20	MW 701	0	0	0	0	15	0	0	0	0
22	MW 703	0	0	0	7	0	0	0	ND	ND
23	MW 705	0	0	0	9	0	0	0	ND	ND
24	MW 706	0	0	0	0	15	0	0	ND	ND

ลำดับที่	isolate	Inhibition zone/clear zone (mm.)							anticancer	ความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์
		antifungal	Anti-G+ bacteria	Anti-G- bacteria	protease	cellulase	mannase	amylase		
25	MW 802	12	0	0	9	0	0	0	ND	ND
26	MW 1006	0	0	0	18	10	0	0	ND	ND
27	MW 1102	0	0	0	10	14	0	21	0	0
28	MW 1013	0	0	0	9	13	0	0	ND	ND
29	MW 1011	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
30	MW 1103	0	20	20	8	8	0	0	0	0
31	MW 1104	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
32	MW 1201	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
33	MW 1202	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
34	MW 1203	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
35	MW 1204	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
36	MW 1505	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
37	MW 1506	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
38	MW 1507	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND

หมายเหตุ: ND คือ ไม่ได้ทดสอบ เนื่องจากในการทำการทดสอบ anticancer และ ความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ ต้องใช้งบประมาณค่อนข้างสูง ด้วยงบประมาณที่มีจำกัดจึงได้ทำการทดสอบในเชื้อบางสายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ที่คัดเลือกไปทำการทดสอบเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างดีมากกว่า 3 ชนิด



ภาพที่ 19 ความสามารถของแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียทดสอบ



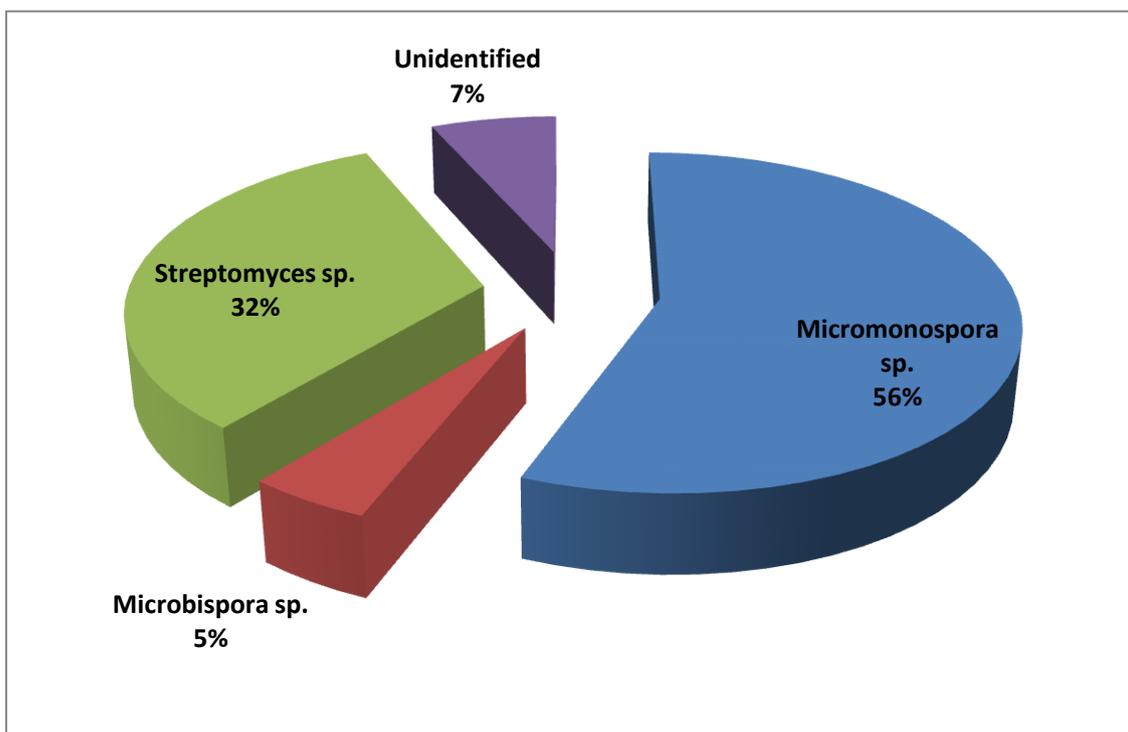
ภาพที่ 20 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ของเชื้อแอสเพอร์จิลที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

A: amylase; B-F: cellulose; G: mannase; H-L: protease

อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

ความหลากหลายของเชื้อแอกติโนมัยสิที่หายากที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วังก์

ผลการแยกเชื้อจากดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแม่วังก์ ทั้งหมด 15 จุด พบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสิทั้งหมด 166 ไอโซเลท ทำการจัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดโดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HT agar plate โดยสังเกตจากลักษณะของ aerial mycelium, substrate mycelium และการสร้างสปอร์ พบว่าได้จำนวนทั้งหมด 11 กลุ่มและเมื่อนำตัวแทนของเชื้อในแต่ละกลุ่มมาทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับลักษณะทางเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน พบว่าจัดอยู่ใน 3 จีนัส คือ *Streptomyces* sp., *Microbispora* sp, *Micromonospora* sp จำนวน 54 8 และ 93 ไอโซเลทตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 33 5 และ 56 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด โดยมีเปอร์เซ็นต์ identity 99% นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ยังไม่ทราบชนิดเนื่องจากยังมาพบการสร้างสปอร์บนอาหาร HT และยังไม่สามารถสกัด DNA เพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน อีก 2 กลุ่ม คิดเป็น 7 % ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 กราฟแสดงจำนวนร้อยละของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละจีนัส

ความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่หายากที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antifungal, anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial) เอนไซม์ และ anticancer โดยทดสอบกับเชื้อจำนวน 38 ไอโซเลท จาก 166 ไอโซเลท และจากเชื้อ 38 ไอโซเลท พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จำนวน 21 ไอโซเลท คิดเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่นำมาทดสอบ และจากเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดพบว่าเป็น *Streptomyces* 8 ไอโซเลท และ non-*Streptomyces* (แอกติโนมัยสิทที่หายาก) 13 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 38 และ 62 ตามลำดับ สรุปได้ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 สรุปผลความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยสิทที่แยกได้

จำนวนชนิดของ สารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพที่สร้างได้	isolate				รวม
	<i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Microbispora</i>	Unidentified	
4		MW1103			1
3	MW203 MW206 MW225		MW1102		4
2	MW201 MW401 MW1013	MW205 MW514	MW1006	MW501	7
1	MW202	MW802 MW703 MW705 MW706 MW513 MW409 MW411		MW503	9
รวม	8	10	1	2	21

จากตารางที่ 15 มีเชื้อแอกติโนมัยสิทที่หายากที่มีความน่าสนใจดังนี้

1. เชื้อไอโซเลท MW1103 ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Micromonospora* ซึ่งเป็นแอกติโนมัยสิทที่หายาก มีความสามารถในการสร้างสารได้ 4 ชนิดคือ anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, เอนไซม์โปรตีเอส และ เอนไซม์เซลลูเลส

2. เชื้อไอโซเลท MW1102 ซึ่งอยู่ในจีนัส *Microbispora* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ 3 ชนิดคือ เซลลูเลส อะมัยเลส โปรตีเอส และยังไม่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการสร้างสาร anti-Gram positive

bacterial, anti-gram negative bacterial และ anticancer ทั้ง MW1103 และ MW1102 แยกได้จากดิน บริเวณข้างถนนเส้นทางจากที่ทำการอุทยานไปยังช่องเย็น

3. เชื้อไอโซเลท MW501 และ MW503 ซึ่งแยกได้จากบริเวณที่ทำการอุทยานเป็นแอคติโนมัยสิทธิ์ที่หายากที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ ซึ่งอาจจะจัดเป็นเชื้อชนิดใหม่ ซึ่งไอโซเลท MW501 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากถึง 40 มิลลิเมตร ส่วน MW503 ได้ทำการทดสอบเพียงการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้นซึ่งไอโซเลทนี้ก็สามารถยับยั้งเชื้อราได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ผลการแยกเชื้อจากดินที่เก็บมาจากเขตอุทยานแม่วงก์ ทั้งหมด 15 จุด พบว่าได้เชื้อแอคติโนมัยสิททั้งหมด 166 ไอโซเลท เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาาร่วมกับลักษณะทางเคมี และการวิเคราะห์ ลำดับเบสในบริเวณ 16S rRNA ยีน พบว่าจัดอยู่ใน 3 จีนิส คือ *Streptomyces* sp., *Microbispora* sp, *Micromonospora* sp จำนวน 54 8 และ 93 ไอโซเลทตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 33 5 และ 56 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ยังไม่ทราบชนิด อีก 2 กลุ่ม คิดเป็น 7 % ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด

ความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากที่แยกได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antifungal, anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial) เอนไซม์ และ anticancer โดยทดสอบกับเชื้อจำนวน 38 ไอโซเลท จาก 166 ไอโซเลท และจากเชื้อ 38 ไอโซเลท พบว่ามีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จำนวน 21 ไอโซเลท คิดเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่นำมาทดสอบ และจากเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมดพบว่าเป็น *Streptomyces* 8 ไอโซเลท และ non-*Streptomycete* (แอคติโนมัยสิทที่หายาก) 13 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 38 และ 62 ตามลำดับ โดยมีเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากที่มีความน่าสนใจ เช่น เชื้อไอโซเลท MW1103 ซึ่งจัดอยู่ในจีนิส *Micromonospora* มีความสามารถในการสร้างสารได้ 4 ชนิดคือ anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial, เอนไซม์โปรตีเอส และ เอนไซม์เซลลูเลส เชื้อไอโซเลท MW1102 ซึ่งอยู่ในจีนิส *Microbispora* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ 3 ชนิดคือ เซลลูเลส อะมัยเลส โปรตีเอส และยังไม่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการสร้างสาร anti-Gram positive bacterial, anti-gram negative bacterial และ anticancer ทั้ง MW1103 และ MW1102 แยกได้จากดินบริเวณข้างถนนเส้นทางจากที่ทำการอุทยานไปยังช่องเย็น เชื้อไอโซเลท MW501 และ MW503 ซึ่งแยกได้จากบริเวณที่ทำการอุทยานเป็นแอคติโนมัยสิทที่หายากที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ ซึ่งอาจจะจัดเป็นเชื้อชนิดใหม่ ซึ่งไอโซเลท MW501 มีศักยภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยให้ขนาดของโซนยับยั้งมากถึง 40 มิลลิเมตร ส่วน MW503 ได้ทำการทดสอบเพียงการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้นซึ่งไอโซเลทนี้ก็สามารถยับยั้งเชื้อราได้

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการวิจัยพบว่าเชื้อที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีความน่าสนใจมาก ทั้งในเรื่องของชนิดที่พบและความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่หายากในบริเวณอื่นๆ ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ที่ยังไม่ได้ศึกษาต่อไป
2. ควรมีการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อไอโซเลทอื่นๆ เพิ่มเติม โดยเฉพาะเชื้อบางไอโซเลทที่มีความน่าสนใจ เช่น MW503 และ MW1102

บรรณานุกรม

- Ando, H., M. Adachi, K. Umeda, A. Matsuura, M. Nonaka, R. Uchio, H. Tanaka and M. Motoki. 1989. Purification and characterization of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agri. Biol. Chem.* 53: 2613-2617.
- Bais, H.P., T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy and J.M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57: 233-266.
- Beltrametti, F., Lazzarini A., Brunati, C., Marazzi, A., Jovetic, S., Selva, E. and Marinelli, F. (2003). Production and characterization of monochlorinated and dechlorinated A40926 derivatives. *J Antibiot* 56(9): 773-782.
- BeomSeok, K., SurkSik, M., ByungKook, H., 1999. Isolation, antifungal activity, and structure elucidation of the glutarimide antibiotic, streptimidone, produced by *Micromonospora coerulea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3372–3380.
- Benimeli, C.S., M.S. Fuentes, C.M. Abate and M.J. Amoroso. 2008. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61: 233-239.
- Bertin, C., H.W. Yang and L.A. Weston. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Pl. Soil* 256: 67-83.
- Carlsohn, M.R., I. Groth, G.Y.A. Tan, B. Schütze, H.P. Saluz, T. Munder, J. Yang, J. Wink and M. Goodfellow. 2007. *Amycolatopsis saalfeldensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a medieval alum slate mine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 57: 1640-1646.
- Castillo, U.F., G.A. Strobel, E.J. Ford, W.M. Hess, H. Porter, J.B. Jensen, H. Albert, R. Robinson, M.A.M. Condrón, D.B. Teplow, D. Stevens and D. Yaver. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigrisca*. *Microbiology* 148: 2675-2685.
- Castillo, U., J.K. Harper, G.A. Strobel, J. Sears, K. Alesi, E. Ford, J. Lin, M. Hunter, M. Maranta, H. Ge, D. Yaver, J.B. Jensen, H. Porter, R. Robinson, D. Millar, W.M. Hess, M. Condrón and D. Teplow. 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 224: 183-190.
- Ceylan, O., Okmen, G., Ugur, A. (2008). Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *EurAsia J BioSci* 2: 73-82.
- Check Republic, Prague. Maitra, P.K. and S.C. Roy. 1960. Trace elements and the synthesis of vitamin B12 by *Streptomyces olivaceus*. *Biochem. J.* 75: 483-487.

- Cheeptham, N., Sadoway, T., Rule, D., Watson, K., Moote, P., Soliman, L.C., Azad, N., Donkor, K.K. and Horne, D. 2013. Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. *International Journal of Speleology*, 42 (1), 35-47.
- Cheng, J., Zhang, Y.G., Chen, W., Li, L., Zhang, D.F., Wang, H.F., Lu, X.H., Duan, Y.Q., Li W.J. 2013. *Saccharopolyspora cavernae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Swallow Cave in Yunnan, south-west China. *Antonie van Leeuwenhoek* DOI 10.1007/s10482-013-9996-z
- Clercq, E.D. 2001. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* 8: 1543-1572.
- Cross, T. 1968. Thermophilic actinomycetes. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 369-353.
- Colquhoun, J.A., J. Mexson, M. Goodfellow, A.C. Ward, K. Horikoshi and A.T. Bull. 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 27-40.
- Cui, L., G. Du, D. Zhan and J. Chen. 2008. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. *Bioresour. Technol.* 99: 3794-3800. Cummins, C.S. and H. Harris. 1956.
- Duangmal, K., Mingma, R., Pathom-aree, W., Niyomvong, N., Inahashi, Y., Matsumoto, A., Thamchaipenet, A., and Takahashi, Y. 2012. *Microbispora thailandensis* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil. *J Antibiot* 65: 491-494.
- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Riedlinger J., Bull, A.T., Knutsen, G., Goodfellow, M., Jones, A., Maldonado, L., Pathom-aree, W., Beil, W., Schneider, K., Keller, S. and Sussmuth, R.D. (2008). Proximicin A, B and C, Novel Aminofuran Antibiotic and Anticancer Compounds Isolated from Marine Strains of the *Actinomycete Verrucosispora*. *J Antibiot* 61(3): 158-163.
- Furumai, T., Igarashi, Y., Higuchi, H., Saito, N. and Oki, T. (2003). Kosinostatin, a quinocycline antibiotic with antitumor activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. *J Antibiot* 55(2): 128-133.
- Goodfellow, M. 1985. The actinomycetes, pp. 211-231. In N. A. Logan, ed. *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications, London.
- Groth, I. and Saiz-Jimenez, C. (1999) Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiol J* 16: 1-8.
- Guerrieri, E., G.M. Poppy, W. Powell, R. Rao and F. Pennacchio. 2002. Plant-to-plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *J. Chem. Ecol.* 28: 1703-1715.

- Hasegawa, T., Takizawa, M. and Tanida, S. (1983). A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* 29: 319–322.
- Hayakawa, M. and Nonomura, H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 65: 501-509.
- In E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, London. Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 399-405.
- Jarerat, A. and Y. Tokiwa. 2001. Degradation of poly (tetramethylene succinate) by thermophilic actinomycetes. *Biotechnol. Lett.* 23: 647-651. Jayasinghe, B.A.T.D and D. Parkinson. 2008.
- Jurado, V., Groth, I., Gonzalez, J.M., Laiz, L. & Saiz-Jimenez, C. (2005b). *Agromyces subbeticus* sp. nov., isolated from a cave in southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, :1897-1901.
- Kortemaa, H., H. Rita, K. Haahtela and A. Smolander. 1994. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Pl. Soil* 163: 77-83.
- Laakso, J.A., Mocek U.M., Van Dum, J., Wouters, W. and Janicot, M. (2003). R176502, a new bafilolide metabolite with potent antiproliferative activity from a novel *Micromonospora* species. *J Antibiot* 56: 909-916.
- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 245-251. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175.
- Lee, S. D. (2006a). *Actinocorallia cavernae* sp. nov., isolated from a natural cave in Jeju, Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1085–1088.
- Lee, S. D. (2006b). *Amycolatopsis jejuensis* sp. nov. and *Amycolatopsis halotolerans* sp. nov., novel actinomycetes isolated from a natural cave. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 549-553.
- Lee, S. D. (2006c). *Nocardia jejuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a natural cave on Jeju Island, Republic of Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 559-562.
- Lee, S. D., Kang, S. O. and Hah, Y. C. (2000b). *Catellatospora koreensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a gold-mine cave. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1103–1111.
- Lee, S. D., Kang, S. O. and Hah, Y. C. (2000d). *Hongia* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 191-199.
- Lee, S. D., Kim, E. S. and Hah, Y. C. (2000c). Phylogenetic analysis of the genera

- Pseudonocardia* and *Actinobispora* based on the 16S rDNA sequence studies. *FEMS Microbiol Lett* 182: 125-129.
- Lee, S. D., Kim, E. S., Roe, J.-H., Kim, J., Kang, S.-O. and Hah, C. (2000a). *Saccharothrix violacea* sp. nov., isolated from a gold mine cave, and *Saccharothrix albidocapillata* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1315–1323.
- Lozitsky, V.I., A.P. Kashkin, M.A. Shneider, A.S. Fedchuk, E. Puzis and N.G. Alexander. 2002. Antiviral action of proteolysis inhibitor from *Streptomyces* species, pp. A75. In Abstracts 15th International Conference on Antiviral Research. 17-21 March 2002.
- Malet-Cascón, L., Romero, F., Espliego-Vázquez, F., Grávalos, D. and Fernández-Puentes, J.L. (2003). IB-00208, a new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. I. Isolation of the strain, taxonomy and biological activities. *J Antibiot* 56(3): 219-225.
- Maskey, R.P., Li, F., Qin, S., Fiebig, H.H, Laatsch, H. (2003). Chandrananimycins A approximately C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. *J Antibiot* 56(7): 622-629.
- Miyadoh, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. *Actinomycetol.* 7: 100-106. _____. 1997. Atlas of Actinomycetes. Asakura Publishing, Tokyo, Japan.
- Moon, S.S., Hwang, W.H., Chung, Y.R. and Shin, J. (2003). New cytotoxic bafilomycin C1-amide produced by *Kitasatospora cheerisanensis*. *J Antibiot* 56(10): 856-861.
- Morris, P.F., E. Bone, B.M. Tyler. 1998. Chemotropic and contact responses of *Phytophthorasojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiol.* 117: 1171-1178.
- Nakaew N, Sungthong R, Yokota A, Lumyong S (2012) *Nonomuraea monospora* sp. nov., an antimicrobial and anticancer compound-producing actinomycete isolated from Thai cave soil and emended description of the genus *Nonomuraea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:3007-3012.
- Nakaew, N., Lumyong, S. and Pathom-aree, W. (2009). First record on isolation, identification and biological activities of new strain of *Spirillospora albida* from Thai Cave Soil. *Actinomycetologica* 23(1):1-7.
- Nakaew, N., Lumyong, S. and Pathom-aree, W. (2009). Generic Diversity of Rare Actinomycetes from Thai Cave Soils and Possible Use as New Bioactive Compound Resources *Actinomycetologica* 23(2): 1-6.

- Ninawe, S., M. Kapoor and R.C. Kuhad. 2008. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresour. Technol.* 99: 1252-1258.
- Omura, S. and A. Crump. 2004. The life and times of ivermectin - a success story. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 984-989.
- Pathom-aree, W., J.E.M. Stach, A.C. Ward, K. Horikoshi, A.T. Bull and M. Goodfellow. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10: 181-189.
- Parales, R.E., J.E. Adamus, N. White and H.D. May. 1994. Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4527-4530.
- Perry, L.G, C. Johnson, E.R. Alford, J.M. Vivanco and M.W. Paschke. 2006. Screening of grassland plants for restoration after spotted knapweed invasion. *Restoration Ecol.* 13: 725-735.
- Peters, N.K., J.W. Frost, S.R. Long. 1986.
- Polti, M.A., M.J. Amoroso and C.M. Abate. 2007. Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. *Chemosphere* 67: 660-667.
- Quintana, E., L. Maldonado and M. Goodfellow. 2003. *Nonomuraeaterrinata* sp. nov., a novel soil actinomycete. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 1-6.
- Ranjala, R., Lacey, E., Tennant, S., Jennifer H.G., Robert, J.C. (2007). Kibdelones: Novel Anticancer Polyketides from a Rare Australian Actinomycete *Chemistry: A European Journal* 13: 1610-1619.
- Rehfuss, M. and J. Urban. 2005. *Rhodococcusphenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 695-701.
- Rothrock, C.S. and D. Gottlieb. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctoniasolani* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30: 1440-1447.
- Sabaratnam, S. and J.A. Traquair. 2002. A formulation of *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplant. *Biol. Control.* 23: 245-253.
- Samac, D.A., A.M. Willert, M.J. McBride and L.L. Kinkel. 2003. Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. *Appl. Soil Ecol.* 22: 55-66.
- Santos, P.S., E.J. Abad, A.G. Pagueia and B.S. Lat. 1976. Vitamin B12 and antibiotics of actinomycetes isolated by a selective method from soil samples. *Philips J. Res.* 103: 208-220.

- Shih, H., Y. Liu, F. Hsu, V. Mulabagal, R. Dodda and J. Huang. 2003. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctoniasolani*. *J. Agricult. Food Chem.* 51: 95-99.
- Sette, L.D., V.M. de Oliveira and G.P. Manfio. 2005. Isolation and characterization ofalachlor-degrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 81-89. Shearer, M.C. 1997.
- Shu, Y.Z., Q. Ye, J.M. Kolb, S. Huang, J.A. Veitch, S.E. Lowe and S.P. Manly. 1997. Bripiodionen, a new inhibitor of human cytomegalovirus protease from *Streptomyces* sp. WC76599. *J. Nat. Prod.* 60: 529-532.
- Stamford, T.L.M., N.P. Stamford, L.C.B.B. Coelho and J.M. Araújo. 2002. Production and characterization of a thermostableglucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresour. Technol.* 83: 105-109. Staneck, J.L. and G.D. Robert. 1974.
- Steenhoudt, O. and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol.Rev.* 24: 487-506. Strzelczyk, E. and U. Leniarska. 1985.
- Tahvonen, R. 1982a. Preliminary experiments into the use of *Streptomyces* spp. isolated from peat in the biological control of soil and seed-borne diseases in peat culture. *J. Sci. Agric. Soc. Finl.* 54: 357-369.
- Takahashi, Y. and Omura, S. (2003). Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol* 49: 141-154.
- Takizawa, M., Colwell, R. R. and Hill, R. T. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake bay. *Appl Environ Microbiol* 59(4): 997-1002.
- Thaiwai, C., Kittakooop, P., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Sriklung, K. and Thebtaranonth, Y. (2004). Micromonosporin A, a novel 24-membered polyene lactam macrolide from *Micromonospora* sp. isolated from peat swamp forest. *Chemitry & Biodiversity* 1: 640-645.
- Thomas, A., Rajeswari, R., F. R., Jaggarajamma, T. S., Selvakumar, N., Nalini K., Nalini, S., Sundaram V., Fraser, W. and Narayanan P.R., (2007). Mnagement of multi drug resistance tuberculosis in the field: tuberculosis research centre experience. *Indian Journal of Tuberculosis* 117-124.

- Torres-Bacete, J., M. Arroyo, R. Torres-Guzman, I.D.L. Mata, C. Acebal and M.P. Castillon. 2005. Optimization of culture medium and conditions for penicillin acylase production by *Streptomyces lavendulae* ATCC 13664. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 126: 119-131.
- Tuncer, M., A.S. Ball, A. Rob and M.T. Wilson. 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 38-47.
- Uren, N.C. 2000.
- Wang, L., Y. Huang, Z. Liu, M. Goodfellow and C. Rodríguez. 2006. *Streptacidiphilus oryzae* sp. nov., an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 56: 1257-1261.
- Wardle, D.A., K.S. Nicholson, M. Ahmed and A. Rahman. 1994. Interference effects of the invasive plant *Carduus nutans* L. against the nitrogen fixation ability of *Trifolium repens* L. *Pl. Soil* 163: 287-297.

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร. นารีลักษณ์ นาก้าว (Dr. Nareeluk Nakaew)

ตำแหน่ง พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์)

สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ : 055964622 โทรสาร 055964770

E-mail address: nnakaew@hotmail.com

ผู้ร่วมงานวิจัย

1. ดร. รักษิณา พลสีลา (Dr. Raxina Polseela) (10%)

ตำแหน่ง พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์)

สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์: 0-5596-4610 โทรสาร: 0-5596-4770

E-mail: polseela@hotmail.com

2. ดร. อภิชาติ วิทย์ตะ (Dr. Apichat Vitta) (10%)

ตำแหน่ง พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์)

สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์: 0-5596-4653 โทรสาร: 0-5596-4770

E-mail: pexvitta@hotmail.com



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของชนิดรีนฝอยทรายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ประเทศไทย
Biodiversity of Phlebotomine Sand Flies in National Park of
Mae Wong, Thailand

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รักษิณา พลสีลา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ
ดร.นาริลักษณ์ นาแก้ว
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปี พ.ศ.2559

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2556 จึงทำให้การดำเนินงานของโครงการวิจัยนี้สามารถดำเนินการได้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชำนาญ อภิวัฒนศร คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษาตลอดโครงการ ขอขอบคุณ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่ได้อนุญาตให้เข้าไปทำการสำรวจรังฝอยทรายในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร และหัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ นายสุธน เวียงดาว ที่ได้ช่วยประสานงานและอำนวยความสะดวกรวมทั้งช่วยเหลือในการสำรวจวิจัยในพื้นที่เป็นอย่างดี รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของอุทยานทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยในการสำรวจและการเก็บข้อมูลวิจัย และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยทุกคน รวมทั้งนายบรรจง ดีเหลือ ที่มีส่วนช่วยในการวางแผน ดำเนินการเก็บตัวอย่าง อีกทั้งดูแลทีมงานและเครื่องมือที่ใช้ทำการศึกษาวิจัยให้มีประสิทธิภาพ และนายวีระ เอี่ยมสอาด และนายประสาท ปันครอง ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่างรังฝอยทรายภายในเขตอุทยานตลอดการศึกษา นอกจากนี้ขอขอบคุณผู้อำนวยการโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ และผู้ร่วมวิจัยในโครงการชุดทุกท่านที่ได้ประสานงานดำเนินงานวิจัยในโครงการนี้อย่างเต็มที่จนงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ครุภัณฑ์และสถานที่ในการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการจนสำเร็จลุล่วง รวมทั้งนิสิตสาขาวิชาจุลชีววิทยาและนิสิตสาขาวิชาปรสิตวิทยาทุกคนที่ได้มีส่วนในการสำรวจพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างรังฝอยทราย นอกจากนี้ขอขอบคุณผู้ร่วมงาน เพื่อน พี่ และน้องๆ รวมทั้งผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่ได้มีส่วนทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้นับเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ทั้งต่อเจ้าหน้าที่อุทยาน นักท่องเที่ยว ประชาชนในพื้นที่ สังคมและประเทศชาติเพื่อใช้ในการเฝ้าระวังโรคพิษสุนัขบ้าในพื้นที่นี้และพื้นที่อื่นต่อไป

ภาษาไทย : ความหลากหลายของชนิดรึ้นฝอยทรายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ประเทศไทย
 ภาษาอังกฤษ : Biodiversity of Phlebotomine Sand Flies in National Park of Mae Wong, Thailand

บทคัดย่อ

โรคลิซมาเนียจัดเป็นโรคติดต่อที่สำคัญมีรึ้นฝอยทรายเป็นแมลงพาหะที่สามารถนำเชื้อลิซมาเนียมาสู่คนได้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการสำรวจชนิดและความหนาแน่นของรึ้นฝอยทรายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร โดยทำการวางกับดักแสงไฟ ตั้งแต่เวลา 18.00-06.00 นาฬิกา จำนวน 35 ตำแหน่งต่อเดือน เดือนละครั้ง ทำการศึกษาในช่วงเดือนสิงหาคม 2557 ถึงสิงหาคม 2558 ผลการศึกษาพบรึ้นฝอยทรายจำนวน 34,113 ตัว (เพศผู้ 20,146 ตัว : เพศเมีย 13,967 ตัว สัดส่วน 1.4 ต่อ 1) จำแนกได้ 2 สกุล คือ *Phlebotomus* และ *Sergentomyia* จำนวน 11 ชนิด คือ *Phlebotomus stantoni*, *P. asperulus*, *P. philippinensis gouldi*, *Sergentomyia anodontis*, *S. gemmea*, *S. perturbans*, *S. quatei*, *S. indica*, *S. barraudi*, *S. silvatica*, และ *S. iyengari* ส่วนที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้คือ unidentified group B, C และ H และชนิดที่พบมากที่สุดคือ *S. anodontis* (33.02%) รองลงมาคือ *S. silvatica* (17.24%) นอกจากนี้ความหนาแน่นของรึ้นฝอยทรายที่พบสูงสุดในเดือนมิถุนายนคือ 1,877 ตัวต่อกับดักต่อคืน และความหนาแน่นเฉลี่ยของรึ้นฝอยทรายที่พบตลอดการศึกษาค้นครั้งนี้คือ 75.81 ตัวต่อกับดักต่อคืน นอกจากนี้ช่วงที่พบรึ้นฝอยทรายมากที่สุดคือ เดือนมิถุนายน (33.34%) รองลงมาคือเดือนกรกฎาคม (20.82%) และพบน้อยที่สุดคือเดือนมกราคม (2.48%) จากผลของการศึกษาค้นครั้งนี้ พบรึ้นฝอยทรายหลากหลายชนิดอีกทั้งมีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นแตกต่างกันตามฤดูกาลที่ทำการศึกษา อาจจะเนื่องจากมีสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันซึ่งอาจจะเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความสำคัญต่อระบาดวิทยาของรึ้นฝอยทรายที่อาจเป็นพาหะนำโรคลิซมาเนียในแต่ละพื้นที่ได้เช่นกัน

คำสำคัญ: รึ้นฝอยทราย, กับดักแสงไฟ, ความหลากหลาย, ความหนาแน่น

Abstract

Leishmaniasis is an infectious disease, transmitted by the bite of female sand flies. This study investigated the species composition and density of the sand flies found in the areas from National Park of Mae Wong, Kamphaengphet Province. Sand flies were captured using Centers for Disease Control (CDC) light traps between 1800-0600 hours. The collections of sand flies were undertaken between August 2014 and August 2015. We collected a total of 34,113 sand flies, representing 11 species and 3 unidentified species were collected with a male:female (20,146:13,967). The specimens were identified belonging to two genera *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, and comprised of *Phlebotomus stantoni*, *P.asperulus*, *P. philippinensis gouldi*, *Sergentomyia anodontis*, *S. gemmea*, *S. perturbans*, *S. quatei*, *S. indica*, *S. barraudi*, *S. silvatica*, *S. iyengari*, unidentified group B, unidentified group C, and unidentified group H. *Sergentomyia anodontis* (33.02%) was the predominant species followed by *S.silvatica* (17.24%). The highest average density of sand flies was found in June (1,877 sand flies per trap per night). The highest number of species of sand flies found in June (33.34 %) and lowest found in February (2.48%). The widespread distribution of sand flies may be an indicator of the epidemiologic importance of the vector sand flies in different habitat.

Keywords: sand flies, CDC light traps, diversity, density

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ/คำสำคัญ	II
เนื้อหางานวิจัย	
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	7
ขอบเขตของโครงการวิจัย	8
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	21
การอภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	31
สรุปผลการศึกษา	33
ข้อเสนอแนะ	33
บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง	34
คณะนักวิจัย	37

สารบัญตาราง (List of Tables)

		หน้า
ตารางที่ 1	พิกัดตำแหน่งที่ดักจับริ้นฝอยทรายจำนวน 35 จุด ในบริเวณที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่वंงก์	11
ตารางที่ 2	อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ภายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่वंงก์ จ.กำแพงเพชร ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2557 ถึงเดือนสิงหาคม 2558	21
ตารางที่ 3	สรุปจำนวนริ้นฝอยทรายในพื้นที่ช่องเย็น อุทยานแห่งชาติแม่वंงก์ ที่ทำการดักจับระยะเวลา 4 เดือน (จำนวน 110 กับดัก)	22
ตารางที่ 4	สรุปจำนวนริ้นฝอยทรายในพื้นที่แม่เระวา อุทยานแห่งชาติแม่वंงก์ ที่ทำการดักจับระยะเวลา 2 เดือน (จำนวน 40 กับดัก)	22
ตารางที่ 5	สรุปจำนวนริ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่वंงก์ ที่ทำการดักจับระยะเวลา 13 เดือน (เดือนสิงหาคม 2557-เดือนสิงหาคม 2558) (จำนวน 450 กับดัก)	23
ตารางที่ 6	สรุปชนิดของริ้นฝอยทรายเพศเมียในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่वंงก์ ในช่วงเวลา 13 เดือน (สิงหาคม 2557-สิงหาคม 2558)	24

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

	หน้า	
รูปที่ 1	Δ คือบริเวณที่จะทำการศึกษาเบื้องต้น เพื่อเลือกพื้นที่ในการศึกษา	9
รูปที่ 2	แผนผังบริเวณที่ดักจับแมลงบริเวณแก่งลานนกยูง (แม่เรา) อุทยานแห่งชาติแม่วงก์	9
รูปที่ 3	แผนผังบริเวณที่ดักจับแมลงบริเวณที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	10
รูปที่ 4	แผนผังบริเวณที่ดักจับแมลงบริเวณช่องเย็น กม.93 อุทยานแห่งชาติแม่วงก์	10
รูปที่ 5	รีนฝอยทรายเทศเมีย (original)	13
รูปที่ 6	รูปแบบของกับดักแสงไฟ (CDC light traps) ที่ใช้สำหรับดักจับรีนฝอยทราย (original)	13
รูปที่ 7	พื้นที่ภายในเขตที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	14
รูปที่ 8	พื้นที่รอบเขตที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	15
รูปที่ 9	กับดักแสงไฟที่ใช้ดักจับรีนฝอยทรายในพื้นที่ที่ทำการศึกษา	16
รูปที่ 10	เครื่องวัดอุณหภูมิและเครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ (Hygro thermometer)	16
รูปที่ 11	เครื่องวัดพิกัดของตำแหน่งที่ทำการดักจับรีนฝอยทราย Garmin รุ่น GPSmap 60CSx	16
รูปที่ 12	แมลงที่ดักจับได้แต่ละตำแหน่ง นำมาแยกรีนฝอยทรายออกจากแมลงอื่น	17
รูปที่ 13	การแยกรีนฝอยทรายออกจากแมลงอื่นโดยใช้กล้องสเตอริโอ	15
รูปที่ 14	รีนฝอยทรายเทศเมีย (a) และเทศผู้ (b) ที่แยกออกจากแมลงอื่นแล้ว	16
รูปที่ 15	สไลด์รีนฝอยทรายเทศเมียที่เตรียมสำหรับการจำแนกชนิด ภายใต้กล้อง Compound microscope	16
รูปที่ 16	ลักษณะของ Cibarium ที่บริเวณส่วนหัวของรีนฝอยทรายใช้สำหรับจำแนกชนิด	19
รูปที่ 17	ลักษณะของ Spermatheca ที่ส่วนท้องของรีนฝอยทรายใช้สำหรับจำแนกชนิด	20
รูปที่ 18	Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>P. stantoni</i>	26
รูปที่ 19	Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>S. anodontis</i>	26
รูปที่ 20	Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>S.gemmea</i>	26
รูปที่ 21	Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>S. barraudi</i>	27
รูปที่ 22	Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>S. silvatica</i>	27
รูปที่ 23	Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>S.indica</i>	27

สารบัญภาพ (List of Illustrations) ต่อ

	หน้า
รูปที่ 24 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>S. quatei</i>	28
รูปที่ 25 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>S. perturbans</i>	28
รูปที่ 26 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>S. iyengari</i>	28
รูปที่ 27 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>P. philippinensis gouldi</i>	29
รูปที่ 28 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ <i>P. asperulus</i>	29
รูปที่ 29 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ Unidentified group B	29
รูปที่ 30 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ Unidentified group C	30
รูปที่ 31 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ Unidentified group H	30

บทนำ (Introduction)

โรคไลชมาเนีย (Leishmaniasis) เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวในตระกูลไลชมาเนีย (Genus *Leishmania*) พบได้ทั้งในคนและสัตว์ เช่น สุนัข แมว วัว แกะ และหนู เป็นต้น การติดต่อของโรคเกิดจากริ้นฝอยทราย (Sand fly) ซึ่งเป็นแมลงที่สามารถกัดดูดเลือดคนและสัตว์เพื่อใช้ในการเจริญของไข่ เมื่อดูดเลือดคนหรือสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคไลชมาเนีย ริ้นฝอยทรายจะได้รับเชื้อและพัฒนาจนเป็นระยะติดต่อได้ จากนั้นจะสามารถแพร่เชื้อโรคไปสู่ผู้อื่นต่อไป อุบัติการณ์โดยประมาณมีผู้ได้รับเชื้อไลชมาเนียถึง 12 ล้านคนจากประชากรกว่า 350 ล้านคนใน 88 ประเทศที่มีความเสี่ยงต่อการติดต่อของโรคนี้ โดยอยู่ในเขตโลกเก่า (Old World) 66 ประเทศ เช่น ประเทศในทวีปแอฟริกา เอเชีย ยุโรป และในเขตโลกใหม่ (New World) 22 ประเทศ คือประเทศในทวีปอเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ เนื่องจากประเทศไทยไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคไลชมาเนีย โรคนี้จึงยังไม่เป็นที่รู้จักกันมากนักและจัดเป็นโรคอุบัติใหม่ ในอดีตผู้ป่วยโรคไลชมาเนียชนิด Visceral Leishmaniasis ซึ่งจัดเป็นชนิดที่ร้ายแรงที่สุดเนื่องจากการติดเชื้อที่อวัยวะภายในจึงทำให้เสียชีวิตได้ ช่วงแรกผู้ป่วยส่วนใหญ่เดินทางกลับจากประเทศในตะวันออกกลาง โดยในปี 2503 พบผู้ป่วยรายแรกของไทยเป็นผู้หญิงชาวปากีสถาน ปี 2520 ผู้ป่วยมาจากประเทศอินเดีย ปี 2527 เดินทางมาจากบังคลาเทศ และปี 2528-2529 มีรายงานผู้ป่วยถึง 5 รายที่เดินทางกลับจากประเทศทางตะวันออกกลางแล้วป่วยด้วยโรค Visceral Leishmaniasis ซึ่งแหล่งระบาดของโรคนี้ส่วนใหญ่จะอยู่ในแถบ Brazil, India, Nepal, Bangladesh และ Sudan ซึ่งบางประเทศนั้นอยู่ในภูมิภาคเดียวกับประเทศไทย (Desjeuk, 1996). นอกจากนี้ ยังมีผู้ป่วยโรค Cutaneous Leishmaniasis ไม่ต่ำกว่า 10 ราย โดยผู้ป่วยเป็นชาวต่างชาติหรือคนไทยที่เดินทางกลับจากทำงานที่ตะวันออกกลาง นอกจากการที่ได้รับเชื้อจากต่างประเทศมาก่อนแล้ว ยังมีการติดเชื้อไลชมาเนียที่เกิดขึ้นเองภายในประเทศโดยที่ผู้ป่วยไม่เคยมีประวัติเดินทางไปต่างประเทศหรือมีโอกาสได้รับเชื้อจากต่างประเทศมาก่อน (Autochthonous case) ซึ่งปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วยอย่างน้อย 6 รายที่ โดยมี 2 รายที่ติดเชื้อร่วมกับมี Anti-HIV ผลบวก ซึ่งมีแนวโน้มผู้ป่วยเพิ่มขึ้นโดยจังหวัดที่มีรายงานผู้ป่วยแล้วคือ สุราษฎร์ธานี น่าน พังงา นครศรีธรรมราช สงขลา และ กรุงเทพมหานคร เป็นต้น

โดยสรุปนับตั้งแต่ ปี 2524-2553 มีผู้ป่วยโรคไลชมาเนียในไทยทั้งหมด 58 ราย โดยแบ่งเป็น Visceral Leishmaniasis 13 รายและ Cutaneous Leishmaniasis 45 ราย ซึ่งมีทั้งติดเชื้อจากต่างประเทศและติดเชื้อภายในประเทศ ซึ่งจากการสอบสวนโรคในแต่ละพื้นที่ที่มีการรายงานพบว่าผู้ป่วยนั้น พบว่ามีสัตว์ที่เป็นรังโรค และมีหลักฐานการติดเชื้อไลชมาเนียทั้งในวัวและแมว นอกจากนี้แล้วยังสำรวจพบริ้นฝอยทรายซึ่งมีการรายงานว่าสามารถเป็นพาหะนำโรคไลชมาเนียได้คือ *Phlebotomus argentipes* จากรายงานของ Apiwathanasorn et al (1993) พบว่า *P. argentipes* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ แต่จากการสอบสวนโรคไลชมาเนียนั้นพบ

P. argentipes ในบางพื้นที่ที่ผู้ป่วยอาศัยอยู่ ที่สำคัญคือพบเชื้อไลชมาเนียสายพันธุ์ใหม่ในประเทศไทยคือ *Leishmania saimensis* แต่ริ้นฝอยทรายที่เป็นพาหะนำเชื้อชนิดนี้ยังไม่มีรายงาน จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าการติดต่อของโรคนี้มาสู่คนไทยนั้นมีปัจจัยใดเกี่ยวข้อง ในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมอยู่ตลอดเวลา เช่น การบุกรุกป่าเพื่อทำไร่ทำนา หรือสร้างที่อยู่อาศัย ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของขยะและสิ่งปลูกสร้างรวมทั้งการสร้างเขื่อน ซึ่งจะมีผลต่อทำให้แหล่งเพาะพันธุ์ของริ้นฝอยทราย แหล่งอาหารมีการเปลี่ยนแปลง เช่น การลดลงของสัตว์ป่า อีกทั้งมีภาวะโลกร้อนที่อาจส่งผลทำให้วงจรชีวิตของแมลงต่างๆ มีช่วงที่สั้นลง ทำให้แมลงพาหะมีจำนวนเพิ่มขึ้น อีกทั้งอาจมีผลต่อพฤติกรรมในการกัดดูดเลือดโดยกัดดูดเลือดคนเพิ่มขึ้นแทนการกัดดูดเลือดสัตว์ นอกจากนี้การเดินทางเพื่อท่องเที่ยวของชาวต่างชาตินั้น อาจเป็นปัจจัยหนึ่งส่งเสริมทำให้โรคมีโอกาสแพร่ระบาดในไทยได้ในอนาคตเนื่องจากเชื้อโรคต่างๆ อาจถูกนำเข้ามาในพื้นที่โดยนักท่องเที่ยว ดังนั้น

การสำรวจรึ้นฝอยทรายซึ่งเป็นพาหะนำโรคนั้น จึงมีความสำคัญเนื่องจากการเฝ้าระวังโรคไลมาเนียได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกทางหนึ่ง

การศึกษาในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาชนิด จำนวน การกระจายตัวและความหนาแน่นของรึ้นฝอยทราย โดยเฉพาะชนิดที่สามารถเป็นพาหะนำโรคได้ ข้อมูลการกระจายตัวของรึ้นฝอยทรายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์จะเป็นข้อมูลที่มีความจำเป็นที่จะบ่งบอกถึงความอุดมสมบูรณ์ของผืนป่า ความเหมาะสมของสภาพการณ์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตต่างๆ และสมดุลของระบบนิเวศน์ ซึ่งหากต้องเสียสมดุลย่อมส่งผลกระทบต่อทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อชีวิตความเป็นอยู่ของประชาชนที่อาศัยอยู่โดยรอบบริเวณนั้นๆ ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดที่สามารถเป็นพาหะและจำนวนของรึ้นฝอยทรายที่เป็นตัวแทนในพื้นที่หรือแหล่งที่ทำการสำรวจนั้นๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในอันที่จะนำไปสู่การเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่ “โรคไลมาเนีย” อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อไม่ให้โรคนี้อมีการระบาดในไทยได้นั่นเอง

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 รึ้นฝอยทราย

รึ้นฝอยทรายจัดอยู่ในวงศ์ (Family) Psychodidae, วงศ์ย่อย (Subfamily) Phlebotominae จำแนกได้ 6 สกุล (Genus) คือ *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, *Sergentomyia*, *Warileya*, *Brumtomyia* และ *Chinius* รึ้นฝอยทรายสกุล *Phlebotomus*, *Lutzomyia* และ *Sergentomyia* สามารถกัดดูดเลือดคนและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง มีเฉพาะสกุล *Phlebotomus* และ *Lutzomyia* เท่านั้นที่สามารถเป็นพาหะนำโรคไลมาเนียได้ (Leishmaniasis) (Lewis, 1978) ส่วนสกุล *Sergentomyia* มีส่วนน้อยที่กัดดูดเลือดคน ส่วนใหญ่กัดดูดเลือดสัตว์เลื้อยคลาน (Service, 1980). แต่เป็นที่น่าสนใจว่าอาจจะมีโอกาสเป็นพาหะนำโรคในคนได้เช่นกัน (Service, 1980) ปัจจุบันนี้มีรายงานการพบรึ้นฝอยทรายมากกว่า 700 ชนิด มีอยู่ประมาณ 70 กว่าชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถในการเป็นพาหะนำโรคมานสู่คนได้ (Lane and Crosskey, 1993) รึ้นฝอยทรายกระจายตัวอยู่ทั่วไปในเขตร้อน (Tropical), ใกล้เขตร้อน (Subtropical) และเขตอบอุ่น (Temperate) ซึ่งครอบคลุมทั้งเขตโลกเก่า (Old World) และเขตโลกใหม่ (New World) (Adler and Theodor, 1957). สกุล *Phlebotomus* พบเฉพาะเขตโลกเก่าเท่านั้น โดยเฉพาะบริเวณตอนใต้ของเขตอบอุ่นทางเหนือ เช่น เขตเมดิเตอร์เรเนียน และพบชุกชุมในเขตร้อนของโลกเก่า พบได้บ้างในเขตร้อนของทวีปแอฟริกา โดยเฉพาะทางภาคตะวันตก เนื่องจากรึ้นฝอยทรายในสกุลนี้ชอบภูมิอากาศ และภูมิประเทศแบบกึ่งแห้งแล้ง และทุ่งหญ้าในเขตร้อนมากกว่าในป่า ส่วนสกุล *Lutzomyia* พบได้ในเขตร้อนและใกล้เขตร้อนของโลกใหม่เท่านั้น โดยเฉพาะป่าในแถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ เช่น บราซิล ฝรั่งเศส เวเนซุเอลา ปานามา และสกุล *Sergentomyia* จะพบโดยทั่วไปเฉพาะเขตโลกเก่าเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบในทวีปแอฟริกาและเอเชียกลาง (Service, 1980)

รึ้นฝอยทรายเป็นแมลงที่มีขนาดเล็กมาก ขนาดประมาณ 1.3-3.5 มิลลิเมตร เล็กกว่ายุงประมาณ 3 เท่า มีสีเหลืองหรือเหลืองหม่น มีขนปกคลุมทั่วตัว ปีกแคบเป็นรูปใบหอก 1 คู่ ตั้งอยู่บนหลังในแนวตั้งทำมุมกันคล้ายอักษร ‘V’ ในขณะที่เกาะพัก เส้นปีกเป็นเส้นขนานทั้งหมด หนวดเรียวยาวมี 16 ปล้อง ขายาวมาก 3 คู่ Service, 1980) มีตาขนาดใหญ่ซึ่งเกิดจากตาขนาดเล็กประกบกัน (Mellor, 1996) ปากตัวเมียเป็นแบบแทงดูด Palp จะโค้งงออยู่ใต้ส่วนปาก ส่วนปากจะสั้นมาก ตัวเมียขนาดใหญ่กว่าตัวผู้เล็กน้อย (Herms, 1969) รึ้นฝอยทรายพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะเคลื่อนที่โดยการกระโดดไปมามากกว่าการบิน (Hopping) จะบินไม่ไกล ระยะประมาณ 100-200 เมตร ส่วนใหญ่เพื่อหาโฮสต์หรือผสมพันธุ์ แต่มีรายงานรึ้นฝอยทรายบางชนิดบินไกลเป็นระยะ 2.3 กิโลเมตร โดยไม่มีลมช่วย ตัวผู้และตัวเมียกินน้ำหวานเป็นอาหาร มีเฉพาะตัวเมียที่กัดดูดเลือดคนหรือสัตว์เพื่อการเจริญเติบโตของไข่ (Killick-Kendrick *et al.*, 1984).

วงจรชีวิตของริ้นฝอยทรายเป็นแบบ Complete metamorphosis ประกอบด้วย 4 ระยะคือ ระยะไข่ (Egg) ตัวอ่อน (Larva) ดักแด้ (Pupa) และตัวเต็มวัย (Adult) ริ้นฝอยทรายตัวเมียจะวางไข่บนบกโดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ รูปร่างยาวรี ขนาด 0.3-0.4 มิลลิเมตร สีน้ำตาลแก่เป็นมัน ผิวมีร่องเป็นตาข่ายหรือสี่เหลี่ยมเล็กๆ ไข่อยู่รวมกันตามพื้นดินที่ชื้นแฉะ เช่น คอกสัตว์ กองขยะ หรือตามรอยแยกรอยแตกของหินหรืออิฐ รอยแตกของบ้าน ตัวอาคาร ห้องน้ำ ห้องส้วม รูที่สัตว์พื้นแพะอาศัยอยู่ โพรงไม้ ซึ่งมีความชื้นสูงมากๆ วางไข่แต่ละครั้งประมาณ 30-70 ฟอง ภายในเวลา 30-60 ชั่วโมงหลังจากการกักตุนเลือดโฮสต์ ระยะเวลาที่ใช้ในการฟักไข่ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ มีสีขาว ลักษณะคล้ายหนอนผีเสื้อ ขนาด 3-6 มิลลิเมตร ส่วนหัวและเขี้ยวขนาดใหญ่ ลำตัวมี 12 ปล้อง ที่ท้องปล้องสุดท้ายมีขนยาว 1 คู่ (Long caudal bristles) ปลายท้องตั้งขึ้นและกางออกคล้ายกับพัด ลำตัวมีขนหรือหนามคล้ายก้านไม้ขีด (Matchstick hair) จำนวนมาก ตัวจึงมีลักษณะหยาบ ส่วนปากมี Mandible ชัดเจน ตัวอ่อนจะกินสารอาหารที่อยู่ในดิน ส่วนใหญ่เป็นพืชที่เน่าเปื่อยอยู่ในดิน เศษอุจจาระ ขยะมูลฝอย รา มูลจิ้งจก และเศษอินทรีย์วัตถุอื่นๆ (Herms, 1969) ตัวอ่อนมีการเจริญเติบโตและลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ตัวอ่อนระยะที่ 1 มีขนยาว 1 คู่ ส่วนตัวอ่อนระยะที่ 2 มีขนยาว 2 คู่ ซอบอยู่ในบริเวณที่มีความชื้นแฉะ เพราะอยู่ในที่แห้งจะตายได้ ซึ่งใช้ระยะเวลา 19-60 วัน ริ้นฝอยทรายจึงเจริญเติบโตและลอกคราบเป็นระยะดักแด้โดยมีคราบสีดำที่ลอกครั้งสุดท้ายติดอยู่ที่ส่วนนอกคล้ายกับสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการแยกชนิดได้ ดักแด้มีผิวหยาบระยะนี้จะทนความแห้งแล้งได้ดีกว่าระยะตัวอ่อน หลังจากนั้นประมาณ 5-10 วัน ตัวเต็มวัยจะออกมาจากดักแด้โดยตัวผู้จะออกมาก่อนตัวเมีย และตัวเมียอายุยืนกว่าตัวผู้ การเจริญตั้งแต่ระยะไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 30-60 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของริ้นฝอยทราย อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และอาหารของตัวอ่อน (Brown, 1969; Service, 2000) ตัวเต็มวัยมีอายุอยู่ได้ประมาณ 14-30 วัน หลังฟักออกจากดักแด้แล้ว อาจบินออกหาน้ำหวาน, กัดตุดเลือดหรือผสมพันธุ์ (Lewis, 1974) แต่มีริ้นฝอยทรายบางชนิดมีการวางไข่และไข่ฟักเป็นตัวอ่อนได้โดยไม่ต้องกินเลือดเหยื่อ เรียกว่า autogeny ตัวผู้และตัวเมียผสมพันธุ์ครั้งเดียว ตัวผู้ล่อตัวเมียโดยอาศัยการสั่นของปีกหรือปล่อย Pheromone ออกมา (Morton and Ward, 1989) ตัวเมียสามารถเก็บน้ำเชื้อของตัวผู้ได้ตลอดชีวิต และเมื่อได้รับเชื้อลิชมาเนียแล้วสามารถนำเชื้อโรคได้ตลอดชีวิตเช่นกัน (Ward *et al.*, 1988). ปกติในเวลากลางวันตัวเต็มวัยของริ้นฝอยทรายมักจะอาศัยตามพื้นดิน ในที่มืด อากาศเย็น และมีความชื้น เช่น กองอิฐ กองหิน กองไม้พิน จอมปลวกเก่า รอยแตกของฝาผนังหรืออิฐ ต่อไม้ผุ หรือตามพื้นดินที่มีใบไม้ปกคลุมในป่าทึบ และใกล้คอกปศุสัตว์ เป็นต้น

การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายโดยใช้สัณฐานวิทยา (morphology)

การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทราย จะใช้ keys ของ Lewis (1978;1982) และ Key อื่นที่เกี่ยวข้องอวัยวะส่วนต่างๆ ที่สำคัญและใช้ในการจำแนกชนิด เช่น ปีก, ลักษณะของ terminalia, aedeagus, paramere, spines, spermatheca, pharynx, cibarium, pigment patch, hair และ sockets ที่ส่วนท้องของริ้นฝอยทราย

2.2 ความสำคัญทางการแพทย์ของริ้นฝอยทราย

ริ้นฝอยทรายเป็นพาหะของโรคที่สำคัญทางการแพทย์ได้หลายโรค เช่นทำให้เกิดโรคชานดิปุระ (Chandipura virus) , โรคปากอักเสบพุพอง (Vesicular stomatitis ; VS) , โรค Sand fly fever และโรคลิชมาเนีย (Leishmaniasis) ซึ่งมีความสำคัญมากเนื่องจากสามารถทำให้เสียชีวิตได้

โรคไลชมาเนีย (Leishmaniasis)

ริ้นฝอยทรายเป็นพาหะนำโรคที่มีความสำคัญมากเนื่องจากเป็นแมลงชนิดเดียวที่จำเพาะกับเชื้อไลชมาเนีย โดยสกุล *Phlebotomus* สามารถถ่ายทอดเชื้อ *Leishmania* spp. ได้มากกว่า 40 ชนิด ในเขตโลกเก่า ส่วนสกุล *Lutzomyia* สามารถถ่ายทอดเชื้อไลชมาเนียได้ถึง 30 ชนิดในเขตอเมริกา ส่วนในเขตคาบสมุทรอินเดีย (Indian sub-zone) พบว่า *Phlebotomus* ถ่ายทอดเชื้อไลชมาเนียได้ 11 ชนิดและ *Sergentomyia* ถ่ายทอดได้ 35 ชนิด ซึ่งเป็นเชื้อไลชมาเนียที่สามารถติดเชื้อได้ในคนและสัตว์ (WHO, 1990). โรคไลชมาเนียมีสุนัขเป็นรังโรคที่สำคัญ ทำให้การแพร่กระจายของโรคน่าเกรงขาม โดยเฉพาะในประเทศอินเดีย บังคลาเทศและเนปาล ในกลุ่มโลกเก่าชนิดของริ้นฝอยทรายที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อไลชมาเนียที่มีการยืนยันแล้วคือ

P. argentipes, *P. martini*, *P. celiae*, *P. ariasi*, *P. perfliewi*, *P. langeroni*, *P. sergenti*, *P. guggisbergi*, *P. duboscqi*, *P. papatasi*, *P. longipes* และ *P. pedifer* ส่วนในเขตโลกใหม่คือ *L. longipalpis*, *L. trapidoidi*, *L. ovallesi*, *L. umbratilis*, *L. anduzei*, และ *L. whitmani* (Killick-Kendrick, 1999).

เชื้อไลชมาเนียจัดเป็นโปรโตซัวชนิดหนึ่ง ในสกุล *Leishmania* มีรูปร่าง 2 แบบคือ ระยะเวลา amastigote มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-5 ไมครอน ไม่มี flagellum และระยะ promastigote รูปร่างคล้ายกระสวย มี flagellum ยาวประมาณ 20 ไมครอน วงจรชีวิตของไลชมาเนียในคนหรือสัตว์นั้นเกิดหลังจากริ้นฝอยทรายตัวเมียที่มีเชื้อไลชมาเนียระยะติดต่อกัดดูดเลือด แล้วปล่อยระยะ promastigote เข้าไปในร่างกายโดยการสำรอกเอาเชื้อออกมาเข้าทางผิวหนังที่เป็นแผลจากการกัดของริ้นฝอยทราย เชื้อจะเข้าสู่เส้นเลือดของคนที่ถูกกัด เมื่อเชื้ออยู่ใน macrophage แล้วมีการเปลี่ยนเป็นระยะ amastigote มีการแบ่งตัวแบบไม่อาศัยเพศ เพิ่มจำนวนมากขึ้น จากนั้น amastigote จะออกจาก macrophage เดิม เข้าสู่เซลล์ใหม่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอีกเรื่อยไป เมื่อริ้นฝอยทรายมากัดดูดเลือดแล้วได้ macrophage ที่มีระยะ amastigote อยู่เข้าไปในกระเพาะ (gut) เมื่อถึงกระเพาะส่วนกลาง (mid gut) เชื้อนี้จะถูกล้อมรอบด้วยเยื่อที่เกิดจากเซลล์บุผิวของกระเพาะริ้นฝอยทราย ระยะ amastigote จะออกจาก macrophage เปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยเริ่มยาวออกเรียกว่าระยะ promastigote หลังจากนั้น promastigote ออกจากเยื่อที่หุ้มแล้วแบ่งตัวเพิ่มจำนวน หลังจากแบ่งตัวแล้ว promastigote จะเคลื่อนตัวไปรวมตัวกันอย่างหนาแน่นบริเวณคอหอย (pharynx) แล้วหดตัวสั้นเข้า หยุดแบ่งตัวและไม่ค่อยเคลื่อนไหว ตัวที่แข็งแรงมักเคลื่อนตัวไปอยู่ที่บริเวณปาก (proboscis) เพื่อรอที่จะเข้าสู่กระแสเลือดของคนหรือสัตว์เมื่อมีการกัดดูดเลือดต่อไป โดยเชื้อระยะ promastigote ซึ่งเป็นระยะติดต่อนั้นมาอยู่ตรงบริเวณส่วนหัวหลังจากกินเลือดประมาณ 8-10 วันและพร้อมจะเข้าสู่คนเมื่อถูกริ้นฝอยทรายกัดถัดไปอีก 2-3 วัน เชื้อไลชมาเนียใช้เวลาในการเจริญเติบโตในริ้นฝอยทราย 4-15 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและอุณหภูมิสิ่งแวดล้อม การแพร่กระจายของโรคจะเกิดขึ้นได้เมื่อริ้นฝอยทรายกัดดูดเลือดตั้งแต่ครั้งที่สองเป็นต้นไป (www.Leishmaniasis.htm).

อาการแสดงทั่วไปของโรคไลชมาเนีย

โดยทั่วไปโรคไลชมาเนียมีลักษณะใกล้เคียงกับอาการของโรคอื่น เช่น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว โรคธาลัสซีเมีย โรคไขกระดูกฝ่อ โรคมาลาเรียและโรคเลือดชนิดอื่นๆ อาการแสดงของโรคเกิดจากการทำงานของระบบไขกระดูก ระบบโลหิต ระบบทางเดินน้ำเหลือง ระบบทางเดินอาหาร รวมถึงตับและม้ามทำงานผิดปกติ (ธีรยุทธ สุขุมและคณะ, 2554) อาการแสดงที่สำคัญซึ่งแบ่งตามประเภทของการเกิดโรคเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. ประเภทก่อเกิดแผลที่ผิวหนัง (Cutaneous leishmaniasis : CL) หรือเรียกอีกชื่อว่า Oriental sore โดยเฉพาะในตะวันออกกลาง มี 2 ชนิด คือ ชนิดแผลผื่นเปียกในเขตชนบท (wet rural form) เกิดจาก

เชื้อ *L. major* และชนิดแผลผื่นแห้งในเขตเมืองใหญ่ (dry urban form) เกิดจากเชื้อ *L. tropica* (Emanuel and John, 1994)

2. ประเภทก่อเกิดแผลที่เยื่อบุ (Mucocutaneous leishmaniasis : MCL) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับประเภทที่เกิดแผลที่ผิวหนัง แต่จะเกิดแผลลุกลามในอวัยวะที่มีเยื่อเมือก เช่น จมูก ปาก ลิ้น เหงือก ทวารหนัก และปากช่องคลอด ชนิดของเชื้อก่อโรคคือ *L. braziliensis* ส่วนชนิด Uta ซึ่งเกิดจากเชื้อ *L. peruviana* ไม่ร้ายแรงเท่ากับชนิดแรก และชนิด Ulcer ซึ่งเกิดจากเชื้อ *L. mexicana* เป็นชนิดไม่ร้ายแรง (Emanuel and John, 1994)

3. ประเภทก่อเกิดพยาธิสภาพอวัยวะภายใน (Visceral leishmaniasis :VL) เรียกอีกชื่อว่า Kala-azar หรือ dum dum fever หมายถึง “Black fever” เพราะเมื่อเป็นโรคนี้นาน ๆ จะทำให้ผิวหนังสีคล้ำขึ้น เชื้อที่เป็นสาเหตุคือ *L. donovani* เกิดการติดเชื้อในอวัยวะภายในร่างกาย โดยเฉพาะที่ไขกระดูก ม้าม ต่อม น้ำเหลือง และตับ เป็นลักษณะที่รุนแรงที่สุดและมีโอกาสเสียชีวิตสูงภายใน 2 ปี หากไม่ได้รับการรักษา (ธีรยุทธ สุขุมิ, 2553) ซึ่งระยะ 2-8 สัปดาห์แรก เริ่มมีไข้ต่ำ ๆ อ่อนเพลีย ไม่สบายในท้อง และปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ บางครั้งมีไข้สูงขึ้นมาคล้ายกับโรคมาลาเรีย ไอแห้ง ๆ ระยะไข้อาจเป็นอยู่ประมาณ 6 สัปดาห์หรือเป็นปี นอกจากนี้มีอาการท้องร่วง อาจมีเลือดออกผิดปกติ เช่น เลือดออกทางจมูก ไรฟัน มีจุดเลือดออกตามตัวและทางเดินอาหาร เป็นต้น หลังจากนั้นมีอาการอ่อนเพลียเพิ่มขึ้น ท้องอืด ท้องโต คลื่นไส้ อาเจียน ผื่นแห้งแห้ง ตกสะเก็ด และกลายเป็นสีเทา โดยเฉพาะที่บริเวณมือและใบหน้า มีเส้นกลางของหน้าท้องและท้องบวม ม้ามโตมากอาจถึงเชิงกราน บางรายมีต่อมน้ำเหลืองโต มีภาวะโลหิตจาง เม็ดเลือดขาวต่ำ (ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุลและคณะ, 2536; Garcia, 2007; Roberts and Janovy, 2009)

2.3 การสำรวจรื้อนฝอยทรายในประเทศไทยและต่างประเทศ

การสำรวจและศึกษาเกี่ยวกับรื้อนฝอยทรายอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ การสำรวจรื้อนฝอยทรายครั้งแรกในไทยเริ่มเมื่อปี 1938 โดย Causey และ Theodor ต่อมาในปี 1962 Quate ได้รายงานชนิดของรื้อนฝอยทรายเพิ่ม พบรวมทั้งหมดยังอีก 9 ชนิด ได้มีการศึกษาเพิ่มขึ้นอีกโดย Apiwathnasorn *et al.*, (1989) พบรื้อนฝอยทรายเพิ่มขึ้นจากเดิม 9 ชนิดเป็น 21 ชนิด และภายหลังได้มีการพบรื้อนฝอยทรายเพิ่มเป็น 27 ชนิด (Depaquit *et al.*, 2006 ; Muller *et al.*, 2007) ปัจจุบันในประเทศไทยมีรื้อนฝอยทรายอย่างน้อย 27 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย *P. argentipes*, *P. philippinensis gouldi*, *P. asperulus*, *P. hoepplii*, *P. stantoni*, *P. major major*, *P. teshi*, *P. betisi*, *P. pholetor*, *P. mascomai*, *Sergentomyia barraudi*, *S. anodontis*, *S. bailyi*, *S. dentata*, *S. iyengari*, *S. brevicaulis*, *S. silvatica*, *S. gemmea*, *S. hodgsoni hodgsoni*, *S. indica*, *S. perturbans*, *S. quatei*, *S. punjabensis*, *Nemopalpus vietnamensis*, *Chinius barbazani* *P. barguesae*, และ *S. phasukae* (Raynal and Gaschen, 1934; Causey, 1938; Theodor, 1938; Quate, 1962; Apiwathnasorn *et al.*, 1989; 1993; 2011 Depaquit *et al.*, 2006; 2009; Muller *et al.*, 2007; Curler, 2011) ซึ่งมีรายงานว่า *P. argentipes* และ *P. major major* สามารถเป็นพาหะนำโรคมาเนียได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่ในถ้ำ มีส่วนน้อยที่อาศัยอยู่นอกถ้ำ (Apiwathnasorn *et al.*, 1989) ซึ่งการศึกษาภายในประเทศไทยโดย Polseela *et al.*, (2007) ภายในถ้ำ พระโพธิสัตว์ จ.สระบุรี โดยใช้ กับดักแสงไฟดักในช่วงเวลา 18.00 - 06.00 น. พบรื้อนฝอยทรายทั้งหมด 13 ชนิด โดยชนิดที่พบมากที่สุด คือ *S. silvatica* (43.5%) รองลงมา คือ *S. anodontis* (31.5%) และ Polseela *et al.*, (2011) รายงานชนิดของรื้อนฝอยทรายภายนอกถ้ำพระโพธิสัตว์ จังหวัดสระบุรี 16 ชนิด โดยชนิดที่พบมากที่สุด *S. silvatica* (35.6%) รองลงมาคือ *S. barraudi* (18.1%) ซึ่งสายพันธุ์ที่ค้นพบทั้งหมดนี้เป็นสายพันธุ์ที่

ได้มีรายงานมาก่อนแล้วในไทย ต่อมา Polseela *et al.*,(2011) ได้ทำการสำรวจการกระจายตัวของริ้นฝอยทราย ภายในถ้ำนเรศวร อ.เนินมะปราง จ.พิษณุโลก พบทั้งสิ้น 13 ชนิด ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *N. vietnamensis* (49.15%) รองลงมา คือ *P. argentipes* (20.15%) ส่วนความหนาแน่นของริ้นฝอยทรายในถ้ำพระโพธิสัตว์พบความหนาแน่นเฉลี่ยของริ้นฝอยทราย 38.29 ตัวต่อกับดักต่อคืน โดยความหนาแน่นสูงสุดที่พบคือ 436 ตัว/กับดัก/คืน ส่วนภายนอกถ้ำพระโพธิสัตว์นั้นพบความหนาแน่นเฉลี่ยของริ้นฝอยทราย 56.46 ตัวต่อกับดักต่อคืน และในถ้ำนเรศวร มีความหนาแน่นเฉลี่ยของริ้นฝอยทราย 42.14 ตัวต่อกับดักต่อคืน (Polseela *et al.*,2007;2011)

การศึกษาในต่างประเทศเกี่ยวกับการกระจายตัวของริ้นฝอยทรายโดยการใช้กับดักแสงไฟในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของบราซิล ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค Visceral Leishmaniasis โดยมี *L. longipalpis* เป็นพาหะของโรคนี้ พบกับริ้นฝอยทรายดังนี้คือ *L. longipalpis* (40.13%) และ *L. evandroi* (45.82%) , *L. lenti* (5.94%), *L. walker* (6.10%) และ *L. migonei* (0.17%) พบอัตราการกระจายตัวสูงสุดและมีความหนาแน่นเฉลี่ยสูงสุดก็คือ 41 ตัว/กับดัก/คืน (Cortez *et al.*, 2007) และการศึกษาการกระจายตัวของริ้นฝอยทรายที่ประเทศอิสราเอลในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝนในปี 2009 โดยใช้กับดักพบริ้นฝอยทรายคือ *P. sergenti* (86%), *P. papatasi* (6%), *P. syriacus* (4%) และ *P. tobbi* (4%) พบความหนาแน่นเฉลี่ยสูงสุดคือ 7 ตัว/กับดัก/คืน (Faiman *et al.*, 2011) นอกจากนี้มีการศึกษาโดย Galati *et al.*,(2003) ได้ศึกษา เกี่ยวกับการกระจายตัวของริ้นฝอยทรายในถ้ำจำนวน 12 แห่งในประเทศบราซิล โดยเก็บริ้นฝอยทรายในช่วงเวลา 18.00 - 06.00 น. โดยใช้ light traps พบว่าภายในถ้ำแต่ละแห่งนั้นมี *L. almerioi* มากที่สุด (57%) ส่วนการศึกษาในประเทศมาเลเซีย ในช่วงปี 2000-2001 ในถ้ำบาตู (Batu cave) และพื้นที่ที่เป็นหินปูน พบริ้นฝอยทราย 2 สกุล 18 ชนิด โดย *Phlebotomus*(6 ชนิด) และ *Sergentomyia* (12 ชนิด) ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *P. major major* (38.6%) รองลงมาคือ *S. perturbans* (20.1%)(Shahar *et al.*, 2011)

เนื่องจากในประเทศไทยนั้นได้มีการศึกษาเกี่ยวกับริ้นฝอยทรายในหลายพื้นที่และเลือกใช้วิธีการศึกษาที่แตกต่างกัน แต่ส่วนใหญ่ใช้กับดักแสงไฟ พื้นที่อุทยานในประเทศไทยเป็นพื้นที่อนุรักษ์และอนุญาตให้มีการท่องเที่ยวในเขตอุทยานนั้น จึงเป็นพื้นที่ที่มีความน่าสนใจทั้งพรรณพืชและพันธุ์สัตว์ที่ต้องทำการอนุรักษ์ไว้เพื่อรักษาธรรมชาติให้สมดุล ในปัจจุบันการศึกษาชนิดของริ้นฝอยทรายที่พบอยู่ในประเทศนั้นยังไม่พบรายงานชนิดใหม่หรือชนิดที่สามารถก่อให้เกิดการติดต่อเชื้อมาสู่คนได้เพิ่มขึ้นจากเดิมเลย จากรายงานผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อลิซมาเนียในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *L. donovani* ซึ่งเคยมีรายงานว่านำเชื้อได้โดย *P. argentipes* ซึ่งชนิดนี้สามารถพบได้ในไทย มีเพียงรายเดียวที่เป็นเชื้อ *L. infantum* ซึ่งรายงานที่ผ่านมาในประเทศไทยยังไม่มีรายงานชนิดของริ้นฝอยทรายที่สามารถจะเป็นพาหะนำเชื้อชนิดนี้ได้ เช่น *P. ariasi*, *P. perniciosus*, และ *P. chinensis* เป็นต้น และในประเทศไทยยังมีรายงานเชื้อลิซมาเนีย *L. saimensis* ซึ่งเป็นชนิดใหม่ และยังไม่ทราบว่าริ้นฝอยทรายชนิดใดสามารถนำเชื้อนี้ได้ การศึกษารังนี้จึงเน้นที่การสำรวจริ้นฝอยทรายซึ่งเมื่อนำมาจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายแล้วอาจจะพบชนิดใหม่หรือเป็นชนิดที่สามารถนำโรคลิซมาเนียมาสู่คนไทยก็อาจเป็นได้ ทั้งนี้จะได้นำผลการศึกษาในแต่ละพื้นที่นั้นมาใช้เป็นฐานข้อมูลชนิดของริ้นฝอยทรายเพื่อป้องกันและควบคุมการนำโรคของริ้นฝอยทรายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ซึ่งเป็นแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญและสวยงามของไทย

2.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาอัตราการกระจายตัว และจำนวนของริ้นฝอยทรายที่ดักจับได้โดยใช้กับดักแสงไฟ (CDC light traps)

2. เพื่อจำแนกชนิดของรื้อนฝอยทราย โดยใช้ลักษณะทางกายภาพทั้งภายในและภายนอกของรื้อนฝอยทราย (Internal and external morphology)
3. เพื่อศึกษาความหนาแน่นของรื้อนฝอยทรายที่ดักจับได้โดยการใช้อับดักแสงไฟ
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของรื้อนฝอยทรายในแต่ละฤดูกาลที่มีผลต่อประชากรรื้อนฝอยทราย

2.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. การจำแนกชนิดของรื้อนฝอยทรายโดยใช้ Morphology จะจำแนกทุกชนิดที่สำรวจพบ
2. พื้นที่ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการกระจายตัวของรื้อนฝอยทรายเป็นระยะเวลา 12 เดือนนั้นจะเลือกเพียง 1 พื้นที่เท่านั้น
3. การเก็บรวบรวมรื้อนฝอยทราย ทำการรวบรวมโดยใช้อับดักแสงไฟเพียงวิธีเดียวเท่านั้น

3.ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

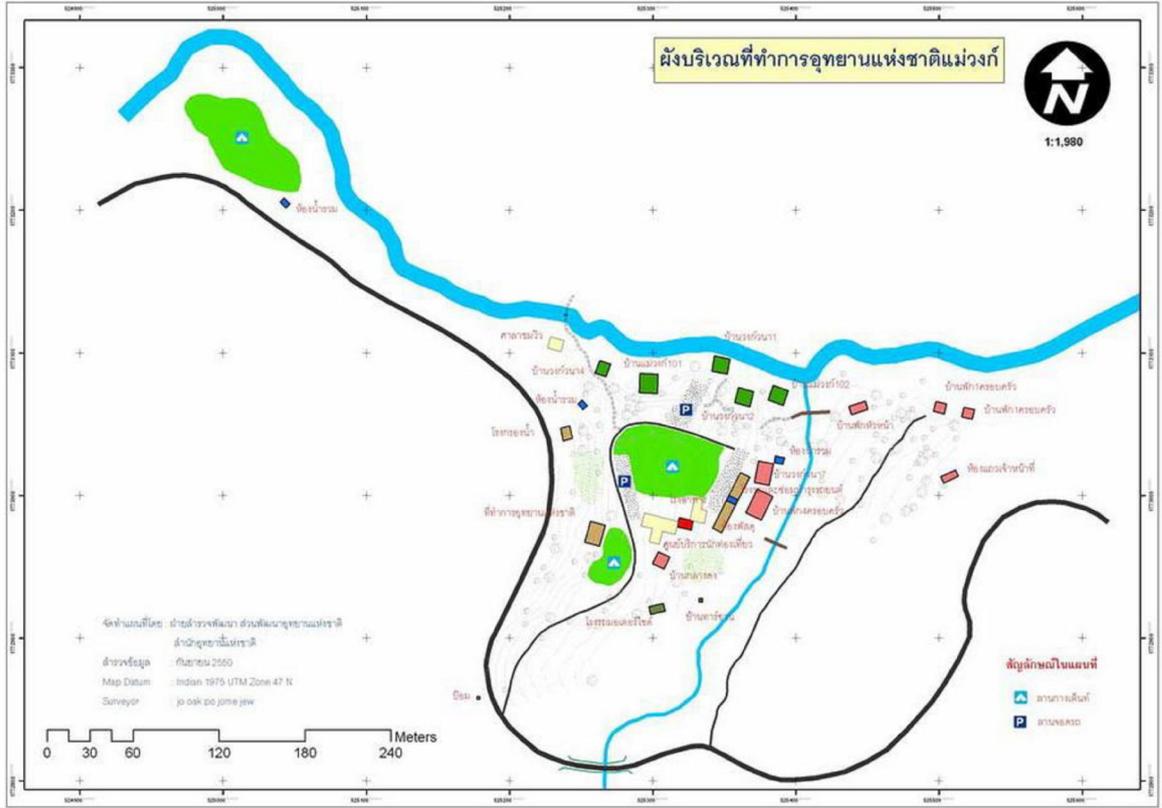
3.1.แผนการวิจัย (research design)

1. เลือกพื้นที่ที่จะทำการศึกษา
2. สำรวจข้อมูลเบื้องต้น (pre survey)
3. เก็บตัวอย่างรื้อนฝอยทราย
4. จำแนกชนิดของรื้อนฝอยทราย
5. รายงานผลการสำรวจ
6. วิเคราะห์ข้อมูลและแปลผล
7. เขียนรายงานการวิจัยและเผยแพร่ข้อมูล

3.2. ขั้นตอนและวิธีการในการเก็บข้อมูล

3.2.1 การเลือกพื้นที่ที่จะทำการศึกษา

การเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษา สุ่มเลือกพื้นที่หรือตำแหน่งที่เหมาะสมในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ ตำแหน่งที่จะทำการศึกษาหรือวางกับดักแสงไฟนั้น จะมีการ Pre study หรือสำรวจเบื้องต้นก่อนที่จะทำการศึกษาจริง โดยต้องเลือกบริเวณที่เหมาะสมสำหรับรื้อนฝอยทรายที่จะใช้เป็นแหล่งเพาะพันธุ์และอาศัยอยู่ เช่น ภายในเขตอุทยานซึ่งเป็นพื้นที่ป่าซึ่งอยู่ใกล้ภูเขาก หรือที่พักรักษา ในครั้งนี้จะทำการศึกษาเบื้องต้น 3 โซนคือ โซนที่ทำการอุทยานแห่งชาติ โซนช่องเย็น และโซนหน่วยพิทักษ์อุทยานแม่วังกา การดักจับนั้นจะใช้อับดักแสงไฟ (CDC light traps) หากดักจับรื้อนฝอยทรายได้อย่างน้อย 5-30 ตัวต่อ light trap ต่อคืนจะเลือกพื้นที่นั้นทำการศึกษาตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัยเพียงโซนเดียวเท่านั้น



รูปที่ 3 แผนผังบริเวณที่ดักจับแมลงบริเวณที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



รูปที่ 4 แผนผังบริเวณที่ดักจับแมลงบริเวณช่องเขน กม.93 อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ การดำเนินงานและผลการเลือกพื้นที่ในการศึกษา

1. เลือกทำการศึกษาในเขตที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ตลอด 1 ปี เพียงแห่งเดียว โดยเพิ่มตำแหน่งที่ดักแมลงจากที่กำหนดในโครงการ 20 ตำแหน่งเป็น 35 ตำแหน่ง ทั้งนี้เพื่อให้ครอบคลุมพื้นที่ที่การศึกษาให้มากยิ่งขึ้น ส่วนพื้นที่อื่นนั้นเป็นการสำรวจเพื่อ Pre-study หรือทำการศึกษาบางช่วงเวลาเท่านั้น ภาพพื้นที่ที่ทำการดักจับรื้อนฝอยทราย (รูปที่ 4 และรูปที่ 5)
2. ทำการจับพิกัดตำแหน่งที่ทำการดักจับรื้อนฝอยทราย จำนวน 35 ตำแหน่ง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 : พิกัดตำแหน่งที่ดักจับรื้อนฝอยทรายจำนวน 35 จุด ในบริเวณที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

จุดที่	Area	พิกัด	
1	อาคารไอโซน	47Q0524907	UTM1773340
2	ห้องน้ำ 1	47Q0524901	UTM1773371
3	ศาลาชมวิว1	47Q0524919	UTM1773395
4	ศาลาชมวิว2	47Q0524908	UTM1773408
5	บ้านวงกัวนา1	47Q0525020	UTM1773384
6	บ้านวงกัวนา2-1	47Q0524957	UTM1773407
7	บ้านวงกัวนา2-2	47Q0524942	UTM1773396
8	บ้านวงกัวนา3	47Q0525040	UTM1773364
9	บ้านวงกัวนา4-1	47Q0524939	UTM1773394
10	บ้านวงกัวนา4-2	47Q0524906	UTM1773404
11	บ้านวงกัวนา5-1	47Q0525070	UTM1773361
12	บ้านวงกัวนา5-2	47Q0525064	UTM1773397
13	บ้านพัก 1	47Q0525049	UTM1773310
14	บ้านพัก 2	47Q0525056	UTM1773322
15	ร้านอาหาร(ครัว) (310m)	47Q0525015	UTM1773306
16	บ้านค้ำคาว 1	47Q0525030	UTM1773280
17	บ้านค้ำคาว 2	47Q0525025	UTM1773285
18	บ้านค้ำคาว 3	47Q0525039	UTM1773284
19	บ้านหัวหน้า	47Q0525118	UTM1773345
20	ศาลาอเนกประสงค์	47Q0525110	UTM1773382
21	บ้านพัก จนท.	47Q0525166	UTM17733375
22	บ้านผู้ช่วย	47Q0525192	UTM1773364
23	ห้องน้ำ (บ้านพัก จนท.)	47Q0525186	UTM1773315
24	บ้านสายตรวจ	47Q0525138	UTM1773265
25	ป่าไผ่1 (293m)	47Q0525223	UTM1773329
26	ป่าไผ่2 (296m)	47Q0525199	UTM1773300
27	ป่าไผ่3(297m)	47Q0525183	UTM1773299
28	ป่าไผ่4(299m)	47Q0525175	UTM1773278
29	ป่าไผ่5 (293m)	47Q0525051	UTM1773222

30	บ้านพักเตาเผา1	47Q0525418	UTM1772840
31	บ้านพักเตาเผา2	47Q0525421	UTM1772829
32	ด้าน 65	47Q0524837	UTM1773156
33	สะพาน กม.65	47Q0524910	UTM1773118
34	ทาง Trail (302m)	47Q0525466	UTM1773089
35	บ้านทาร์ซาน (294m)	47Q0525004	UTM1773243

หมายเหตุ : ความสูงจากระดับน้ำทะเลอยู่ในช่วง 293-340 เมตร

3.2.2 การเก็บรวบรวมรีนฝอยทราย

- ทำการรวบรวมรีนฝอยทรายโดยใช้กับดักแสงไฟ (CDC light traps) จำนวน 20 ตำแหน่ง โดยการเก็บรวบรวมรีนฝอยทรายจะทำทุกเดือน เป็นระยะเวลา 1 ปี โดยเก็บตัวอย่างรีนฝอยทราย 20 ตำแหน่ง ต่อเดือน ให้มีระยะห่างในแต่ละตำแหน่งอย่างน้อย 10 เมตร โดยทำการศึกษาเพียง 1 พื้นที่เท่านั้น และวางกับดักแสงไฟตั้งแต่วันที่ 18.00-06.00 นาฬิกา

- แยกรีนฝอยทรายออกจากแมลงอื่น แล้วนำรีนฝอยทรายทั้งหมดที่รวบรวมได้ นำมาดองใน 80% Alcohol เฉพาะเพศเมียเท่านั้นจะนำมาทำเป็นสไลด์ถาวร โดยใช้ Hoyer's medium เตรียมสไลด์โดยการตัดแยกส่วนหัวและส่วนอกแยกออกจากกัน แล้วนำมาทำการจำแนกชนิดรีนฝอยทรายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การดำเนินงานในการเก็บรวบรวมรีนฝอยทราย

1. หลังจากสำรวจเบื้องต้นแล้วจึงกำหนดตำแหน่งที่จะทำการศึกษา จำนวน 35 ตำแหน่ง โดยใช้ตำแหน่งเดิมตลอดเวลา 12 เดือนที่ทำการศึกษา (เดิมกำหนด 20 ตำแหน่งต่อเดือน)
2. ทำการดักแมลงโดยวางกับดักแสงไฟตั้งแต่วันที่ 18.00-06.00 นาฬิกา เก็บกับดักในตอนเช้าวันถัดมา
3. นำแมลงที่ดักได้มาทำการคัดแยกภายใต้กล้องสเตอริโอและจัดเก็บรีนฝอยทรายแยกเพศผู้และเพศเมีย เก็บดองในหลอดที่มี 80% Alcohol
4. แมลงอื่นๆ ส่วนที่เหลือจากการคัดแยก ทำการเก็บรักษาในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
5. บันทึกผลจำนวนของรีนฝอยทรายที่คัดแยกได้ในแต่ละจุด และจำนวนที่เก็บได้แต่ละเดือน



รูปที่ 5 ริ่นฝอยทรายเทศเมีย (original)



รูปที่ 6 รูปแบบของกับดักแสงไฟ (CDC light traps) ที่ใช้สำหรับดักจับริ่นฝอยทราย (original)



รูปที่ 7 พื้นที่ภายในเขตที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



รูปที่ 8 พื้นที่รอบเขตที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



รูปที่ 9 กับดักแสงไฟที่ใช้ดักริ้นฝอยทรายในพื้นที่ทำการศึกษ



รูปที่ 10 เครื่องวัดอุณหภูมิและเครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ (Hygro thermometer)



รูปที่ 11 เครื่องวัดพิกัดของตำแหน่งที่ทำการดักจับริ้นฝอยทราย Garmin รุ่น GPSmap 60CSx



รูปที่ 12 แผลงที่ดักจับได้แต่ละตำแหน่ง นำมาแยกชิ้นฝอยทรายออกจากแผลงอื่น



รูปที่ 13 การแยกชิ้นฝอยทรายออกจากแผลงอื่นโดยใช้กล้องสเตอริโอ



a)



b)

รูปที่ 14 ริ้นฝอยทรายพศเมีย (a) และพศผู้ (b) ที่แยกออกจากแมลงอื่นแล้ว



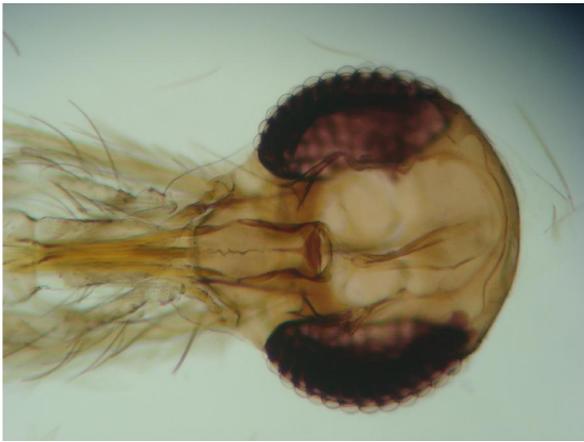
รูปที่ 15 สไลด์ริ้นฝอยทรายพศเมียที่เตรียมสำหรับการจำแนกชนิด โดยใช้กล้อง Compound microscope

4.2.3 การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทราย

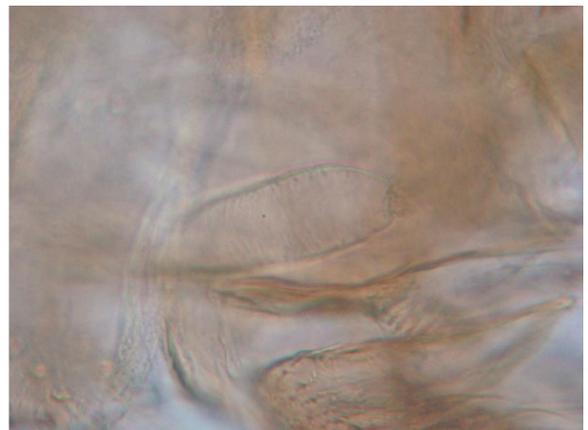
การจำแนกชนิดของรึ้นฝอยทราย จะใช้ keys ของ Lewis (1978;1982) รวมทั้ง keys อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง อวัยวะส่วนต่างๆ ที่สำคัญและใช้ในการจำแนกชนิด เช่น ปีก, ลักษณะของ terminalia, aedeagus, paramere, spines, spermatheca, pharynx, cibarium, pigment patch, hair และ sockets ที่ส่วนท้องของรึ้นฝอยทราย เป็นต้น

การดำเนินงานในการจำแนกชนิดของรึ้นฝอยทราย

1. ภายหลังจากเตรียมสไลด์และสไลด์แห้งแล้ว นำมาจำแนกชนิดภายใต้กล้อง Compound Microscope
2. บันทึกผลการจำแนกชนิดของรึ้นฝอยทราย



รูปที่ 16 ลักษณะของ Cibarium ที่บริเวณส่วนหัวของรึ้นฝอยทรายใช้สำหรับจำแนกชนิด



รูปที่ 17 ลักษณะของ Spermatheca ที่ส่วนท้องของรึ้นฝอยทรายใช้สำหรับจำแนกชนิด

4.2.4 การเก็บรักษาตัวอย่างที่ได้จากการศึกษา

1. ตัวอย่างสไลด์รึ้นฝอยทรายที่สำรวจในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ หลังจากทำการจำแนกชนิดและเสร็จสิ้นโครงการแล้ว จะส่งมอบตัวอย่างสไลด์ให้กับกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช เพื่อเก็บรักษาต่อไป

2. ตัวอย่างของแมลงอื่นๆ ที่เก็บได้จากกับดักแสงไฟภายหลังแยกออกจากรีนฝอยทรายแล้ว จะเก็บแช่ไว้ใน 70 % Alcohol หรือแช่ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส หากเสร็จสิ้นโครงการจะส่งมอบตัวอย่างแมลงให้กับกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช เพื่อเก็บรักษาหรือจัดเก็บในที่ที่กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช เห็นสมควรต่อไป

4.2.5 การวางแผนควบคุมและป้องกัน

เมื่อพบว่ามามีรีนฝอยทรายชนิดที่มีความสามารถเป็นพาหะนำโรคลิชมาเนียได้ จะดำเนินการให้สุขศึกษาแก่ประชาชนในพื้นที่บริเวณนั้นเพื่อให้ทราบถึงวิธีการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อจากรีนฝอยทรายชนิดนี้ต่อไป รวมทั้งประสานงานกับหน่วยงานที่มีหน้าที่ดูแลพื้นที่นั้นๆ เพื่อคอยเฝ้าระวังโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การดำเนินงานในการวางแผนควบคุมและป้องกัน

1. แจงข้อมูลเบื้องต้นให้กับหัวหน้าอุทยานและเจ้าหน้าที่อุทยานเพื่อทราบเกี่ยวกับชนิดและจำนวนของรีนฝอยทรายที่ดักจับได้
2. ดำเนินการให้สุขศึกษาแก่ผู้สนใจ
3. จัดทำรายงานและจัดส่งข้อมูลให้กับแหล่งทุน หน่วยงานหรือผู้ที่เกี่ยวข้อง

4.2.6 ขั้นตอนและวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล

การคำนวณหาอัตราการแพร่กระจายของรีนฝอยทราย (Prevalence rate) หน่วย %

$$\text{อัตราการกระจายตัวของรีนฝอยทรายแต่ละชนิด} = \frac{\text{จำนวนรีนฝอยทรายที่สำรวจพบชนิดนั้น}}{\text{จำนวนรีนฝอยทรายที่สำรวจพบทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ความหนาแน่นของรีนฝอยทราย(Density)} = \frac{\text{จำนวนรีนฝอยทรายที่สำรวจพบทั้งหมด}}{\text{จำนวนกับดักทั้งหมด}}$$

(ตัวต่อกับดักต่อคืน)

4.3. สถานที่ทำการทดลอง

- ห้องปฏิบัติการของภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก
- พื้นที่ที่สำรวจรีนฝอยทรายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ มีการบันทึกพิกัดด้วยเครื่อง GPS เพื่อจะได้ทราบตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง

5. ผลการวิจัย

5.1 ผลการวิจัย

จากการสำรวจเบื้องต้นในพื้นที่โนโซนช่องเย็นและหน่วยพิทักษ์อุทยานแม่เฒ่า และพื้นที่ทำการของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จึงได้ทำการเลือกพื้นที่โนโซนที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ในการดักจับรีนฝอยทรายตลอดระยะเวลาของการศึกษา เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมสำหรับเป็นแหล่งเพาะพันธุ์และการอยู่อาศัยของรีนฝอยทราย และสามารถดักจับรีนฝอยทรายในจำนวนที่กำหนดได้ ทั้งนี้เนื่องจากเดือนสิงหาคม 2557 มีการวางกับดักจำนวน 30 กับดัก จึงได้ทำการดักเพิ่มในเดือนสิงหาคม 2558 อีก 1 เดือน เพื่อให้ตำแหน่งและจำนวนกับดักที่ทำการศึกษา มีจำนวนเท่ากับการศึกษาทั้งหมด (รวมเป็น 13 เดือน) โดยเป็นการศึกษาต่อเนื่อง

ในพื้นที่เดิม ซึ่งผลจากการสำรวจในพื้นที่ทำการของอุทยานแห่งชาติแม่वंกั รวมระยะเวลา 13 เดือน (สิงหาคม 2557 ถึง สิงหาคม 2558)

หมายเหตุ : ได้มีการเพิ่มจำนวนกับดักจาก 30 กับดัก เป็น 35 กับดัก ตั้งแต่เดือนกันยายน 2557 จนถึง สิงหาคม 2558 เพื่อให้ครอบคลุมพื้นที่ทำการศึกษา (เดิมโครงการกำหนดไว้เพียง 20 กับดัก)

ข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ตลอดช่วงระยะเวลาทำการการศึกษา

ตารางที่ 2 อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ภายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่वंกั จ.กำแพงเพชร ตั้งแต่เดือน สิงหาคม 2557 ถึงเดือนสิงหาคม 2558

ลำดับ	เดือน	อุณหภูมิ °C (ต่ำสุด-สูงสุด)	ความชื้นสัมพัทธ์ % (ต่ำสุด-สูงสุด)
1	สิงหาคม 2557	21.4-29.2	85-90
2	กันยายน	23.5-26.3	92-94
3	ตุลาคม	22.5-29.6	74-89
4	พฤศจิกายน	22.4-27.1	82-97
5	ธันวาคม	20.4-27.3	77-95
6	มกราคม 2558	17.4-28.8	63-77
7	กุมภาพันธ์	18.4-28.3	48-74
8	มีนาคม	20.3-31.2	56-79
9	เมษายน	21.6-30.5	62-81
10	พฤษภาคม	22.5-29.8	65-85
11	มิถุนายน	23.4-33.9	55-67
12	กรกฎาคม	23.7-29.9	61-84
13	สิงหาคม	24.1-30.3	64-72

ตารางที่ 3 สรุปลักษณะดินฝอยทรายในพื้นที่ช่องเย็น อุทยานแห่งชาติแม่वंกั ที่ทำการดักจับระยะเวลา 4 เดือน (จำนวน 110 กับดัก)

ลำดับ	เดือนที่ดัก	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	รวม (ตัว)	ร้อยละ
1	กุมภาพันธ์ 2558	10	29	39	47.56
2	เมษายน 2558	4	11	15	18.29
3	กันยายน 2558	4	11	15	18.29
4	ตุลาคม 2558	2	11	13	15.86
	รวม	20	62	82	100.00
	ร้อยละ	24.39	75.61	100.00	-
	ความหนาแน่นเฉลี่ย (ตัว/กับดัก/คืน)	0.18	0.56	0.75	-

สรุปชนิดของรื้อนฝอยทรายที่ดักจับได้ในเขตช่องเย็น กม.93 อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

1. *S.tambori*
2. *S.gemmea*
3. *S.barraudi*
4. *S.anodontis*

หมายเหตุ เนื่องจากจำนวนรื้อนฝอยทรายมีจำนวนน้อยกว่าที่กำหนดจึงไม่ได้เลือกเป็นพื้นที่ที่ทำการศึกษาระยะ 1 ปี (เลือกเพียงพื้นที่เดียวคือพื้นที่ที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์)

ตารางที่ 4 สรุปจำนวนรื้อนฝอยทรายในพื้นที่แม่เระวา อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ทำการดักจับระยะเวลา 2 เดือน (จำนวน 40 กับดัก)

ลำดับ	เดือนที่ดัก	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	รวม (ตัว)	ร้อยละ
1	กันยายน 2558	92	304	396	89.59
2	ตุลาคม 2558	12	34	46	10.41
	รวม	104	338	442	100.00
	ร้อยละ	23.53	76.47	100.00	-
	ความหนาแน่นเฉลี่ย (ตัว/กับดัก/คืน)	2.6	8.45	11.05	-

ชนิดของรื้อนฝอยทรายที่ดักจับได้ในเขตหน่วยพิทักษ์อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (แม่เระวา)

1. *P.stantoni*
2. *S.iyengarii*
3. *S.gemmea*
4. *S.indica*
5. *S.baillyi*
6. *S.barraudi*

หมายเหตุ เนื่องจากจำนวนรื้อนฝอยทรายมีจำนวนน้อยกว่าในพื้นที่ที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จึงไม่ได้เลือกเป็นพื้นที่ที่ทำการศึกษาระยะ 1 ปี (เลือกเพียงพื้นที่เดียวคือพื้นที่ที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์)

ตารางที่ 5 สรุปจำนวนร้านฝอยทรายในพื้นที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ที่ทำการดับจับระยะเวลา 13 เดือน (เดือนสิงหาคม 2557-เดือนสิงหาคม 2558) (จำนวน 450 กับดัก)

ลำดับ	เดือนที่ดัก	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	รวม (ตัว)	ร้อยละ
1	สิงหาคม 2557	730	309	1039	3.05
2	กันยายน	623	631	1,254	3.68
3	ตุลาคม	712	1,012	1,724	5.05
4	พฤศจิกายน	381	870	1,251	3.67
5	ธันวาคม	306	678	984	2.89
6	มกราคม 2558	443	404	847	2.48
7	กุมภาพันธ์	798	779	1,577	4.62
8	มีนาคม	840	551	1,391	4.08
9	เมษายน	1,546	839	2,385	6.99
10	พฤษภาคม	875	541	1,416	4.15
11	มิถุนายน	7,654	3,719	11,373	33.34
12	กรกฎาคม	4,328	2,775	7,103	20.82
13	สิงหาคม	910	859	1,769	5.18
	รวม	20,146	13,967	34,113	100.00
	ร้อยละ	59.05	40.15	100.00	-
	ความหนาแน่นเฉลี่ย (ตัว/กับดัก/คืน)	44.77	31.04	75.81	

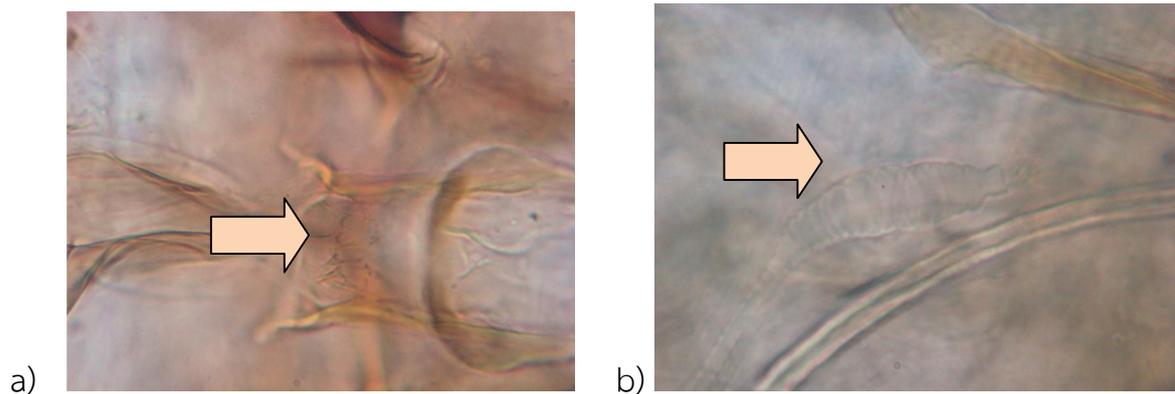
ตารางที่ 6 สรุปชนิดของรื้อนฝอยทรายเพศเมียในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ ในช่วงเวลา 13 เดือน (สิงหาคม 2557-สิงหาคม 2558)

ที่	เดือน	S. anod ontis	S. gem mea	S. silvat ica	S. barr audi	S. quat ei	S. iyeng ari	S. indic a	S. pertu rban s	P. stant oni	P. aspe rulus	B	C	H	P. phili pinn ensis	รวม (ตัว)	รื้อย ละ
1	ส.ค. 57	147	9	0	21	14	12	0	0	95	0	3	8	0	0	309	3.05
2	ก.ย.	246	92	6	57	9	3	0	0	163	0	40	15	0	0	631	3.68
3	ต.ค.	392	112	28	24	181	0	0	0	127	0	125	11	12	0	1012	5.05
4	พ.ย.	219	38	285	47	148	16	0	0	75	0	33	4	5	0	870	3.67
5	ธ.ค.	195	35	93	74	166	0	0	1	58	0	28	4	20	4	678	2.89
6.	ม.ค. 58	154	59	0	72	28	0	2	0	54	0	17	2	16	0	404	2.48
7	ก.พ.	228	148	1	55	5	57	6	0	111	1	81	76	10	0	779	4.62
8	มี.ค.	276	69	41	54	0	0	0	0	71	0	15	23	0	2	551	4.08
9	เม.ย.	471	113	102	28	0	0	0	0	73	1	25	18	0	8	839	6.99
10	พ.ค.	305	36	44	62	9	0	0	0	62	0	16	7	0	0	541	4.15
11	มิ.ย.	747	336	1076	214	224	142	149	2	169	0	498	11 4	48	0	3719	33.34
12	ก.ค.	934	291	589	95	103	34	25	0	302	0	332	16	54	0	2775	20.82
13	ส.ค.	298	196	143	75	4	0	0	0	126	0	13	2	2	0	859	5.18
	รวม	4612	1534	2408	878	891	264	182	3	1486	2	1226	30 0	16 7	14	13,96 7	100
	รื้อย ละ	33.02	10.98	17.24	6.29	6.38	1.89	1.3	0.02	10.64	0.01	8.78	2.1 5	1.2	0.1	100	-

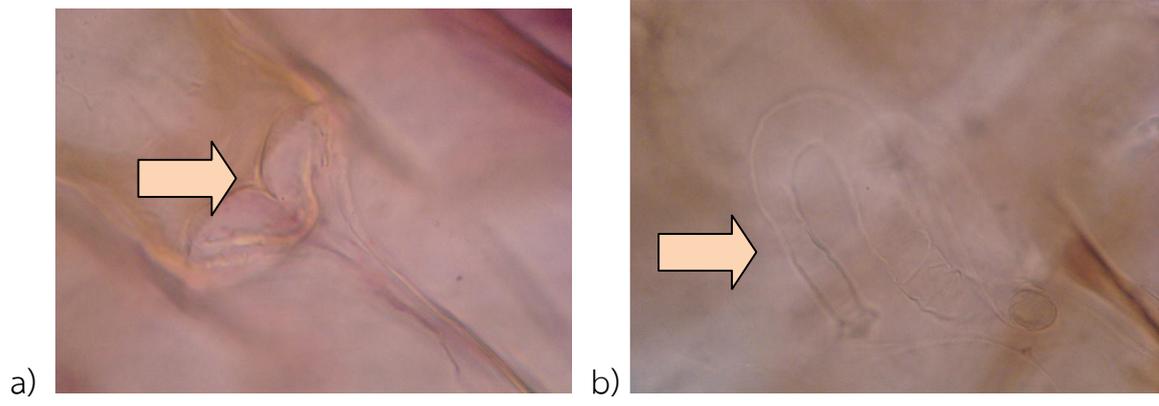
ผลการจำแนกชนิดของริ้นฝอยทรายด้วยลักษณะภายนอก (morphology)

ลักษณะของ Cibarium และ Spermatheca ของริ้นฝอยทรายเพศเมียที่ใช้ในการจำแนกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งหมด 11 ชนิด และ Unidentified 3 กลุ่ม ดังนี้

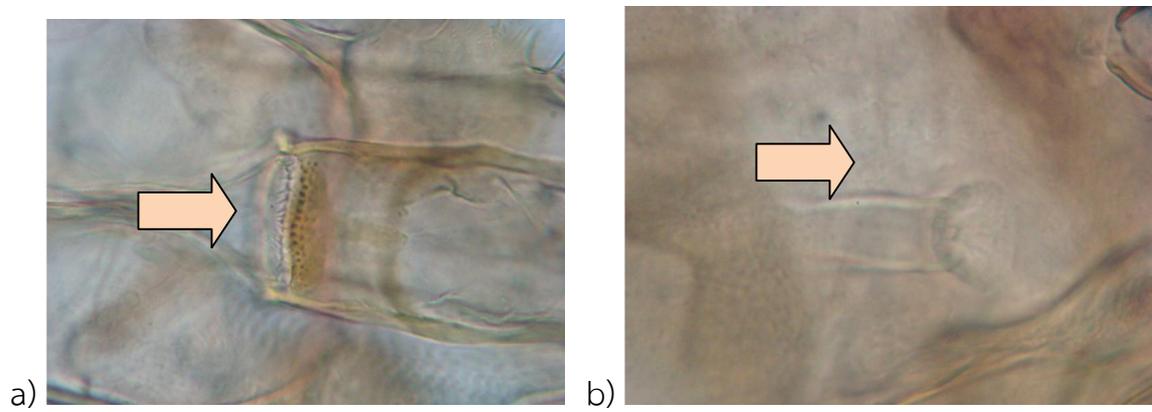
ลำดับ	ชนิดของริ้นฝอยทราย	รูปที่
1	<i>Phlebotomus stantoni</i>	รูปที่ 18
2	<i>Sergentomyia anodontis</i>	รูปที่ 19
3	<i>Sergentomyia gemmea</i>	รูปที่ 20
4	<i>Sergentomyia barraudi</i>	รูปที่ 21
5	<i>Sergentomyia silvatica</i>	รูปที่ 22
6	<i>Sergentomyia indica</i>	รูปที่ 23
7	<i>Sergentomyia quatei</i>	รูปที่ 24
8	<i>Sergentomyia perturbans</i>	รูปที่ 25
9	<i>Sergentomyia iyengari</i>	รูปที่ 26
10	<i>Phlebotomus philippinensis gouldi</i>	รูปที่ 27
11	<i>Phlebotomus asperulus</i>	รูปที่ 28
12	Unidentified group B	รูปที่ 29
13	Unidentified group C	รูปที่ 30
14	Unidentified group H	รูปที่ 31



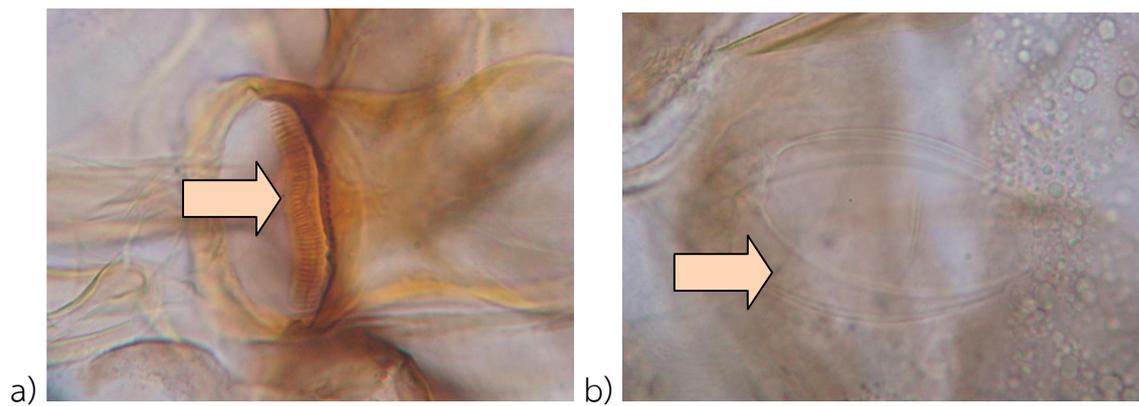
รูปที่ 18 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *P. stantoni*



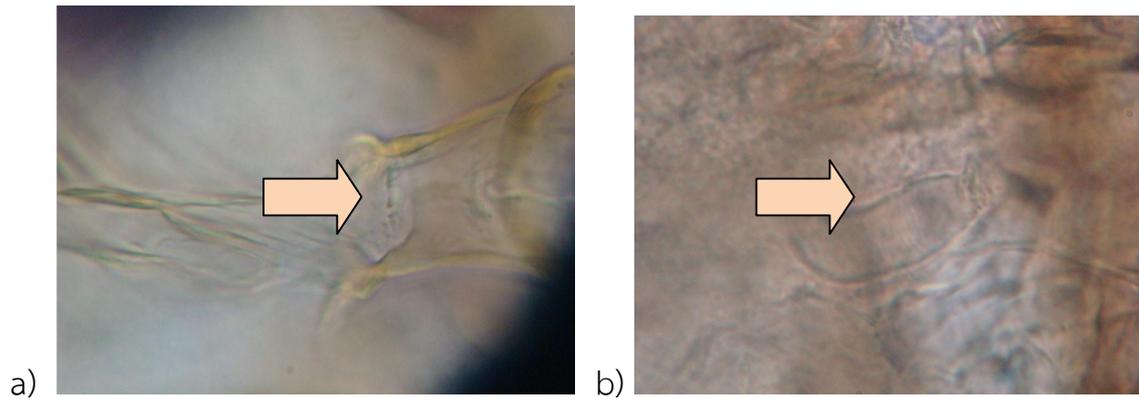
รูปที่ 19 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *S. anodontis*



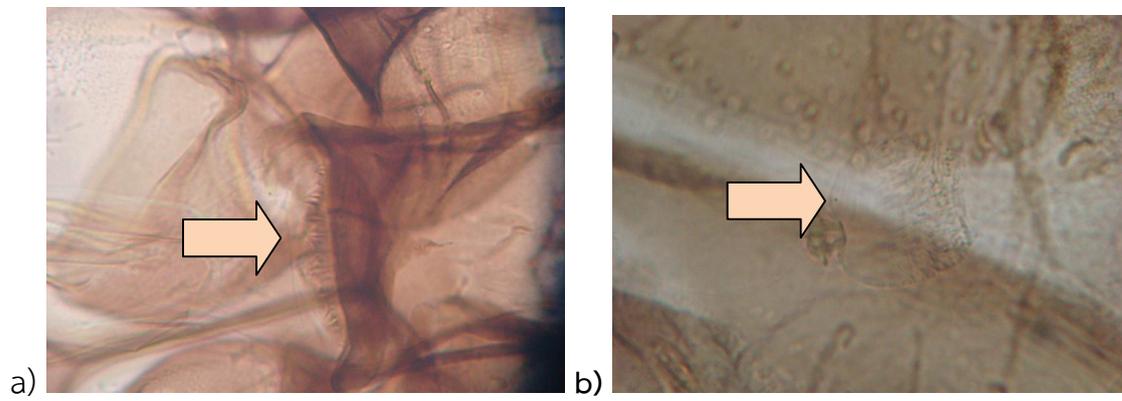
รูปที่ 20 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *S. gemmea*



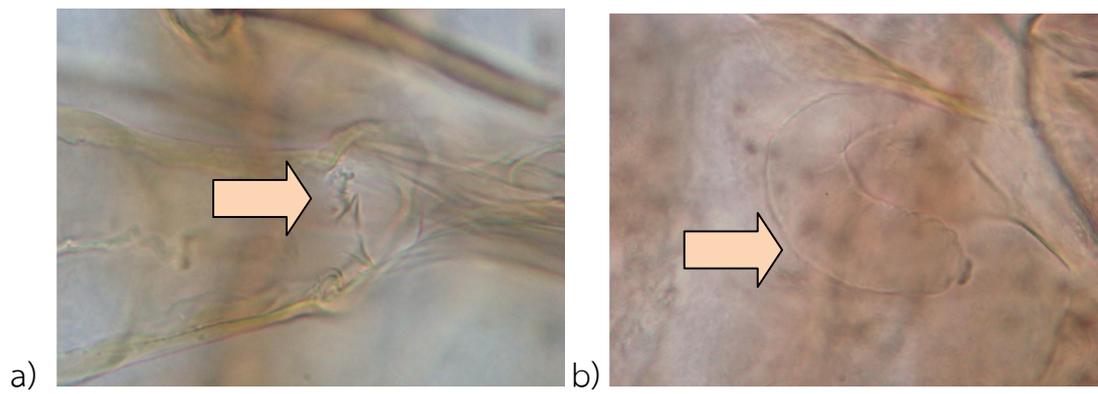
รูปที่ 21 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *S. barraudi*



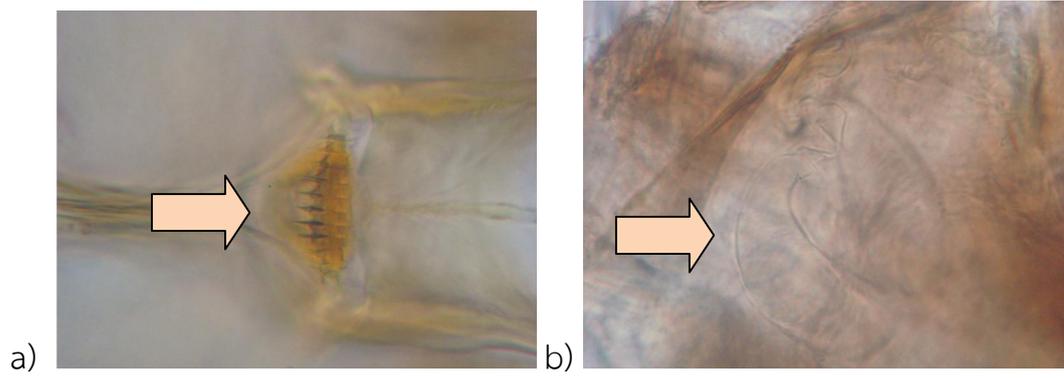
รูปที่ 22 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *S. silvatica*



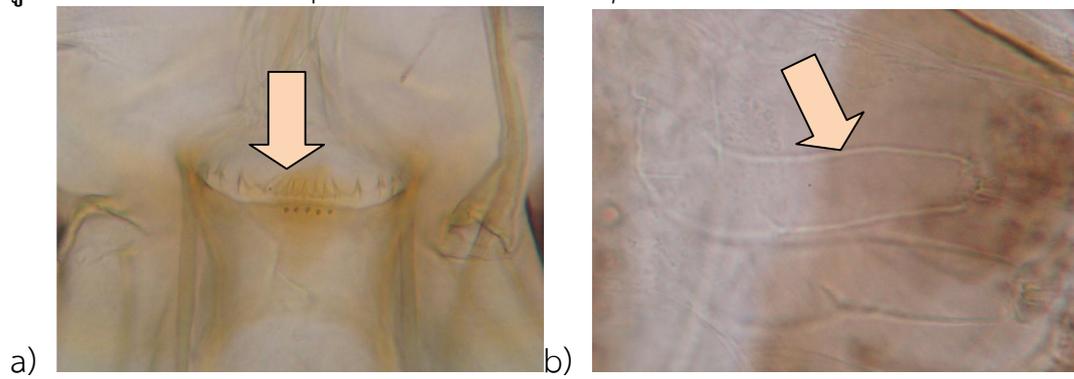
รูปที่ 23 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *S. indica*



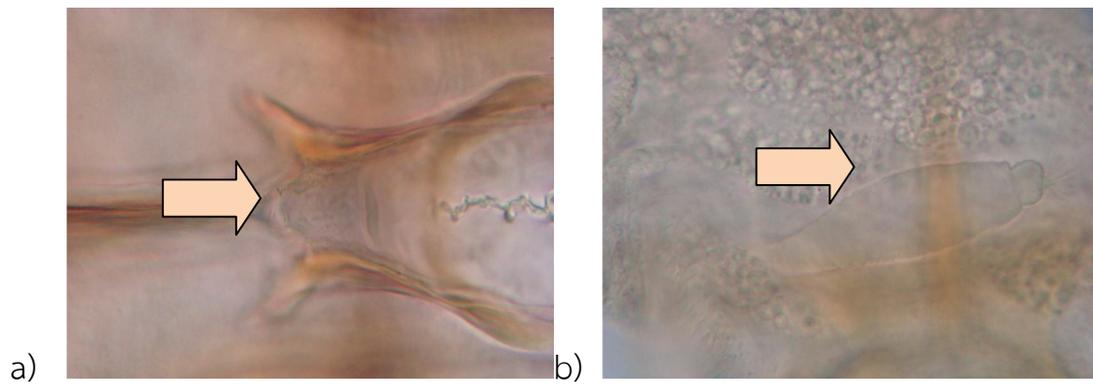
รูปที่ 24 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *S. quatei*



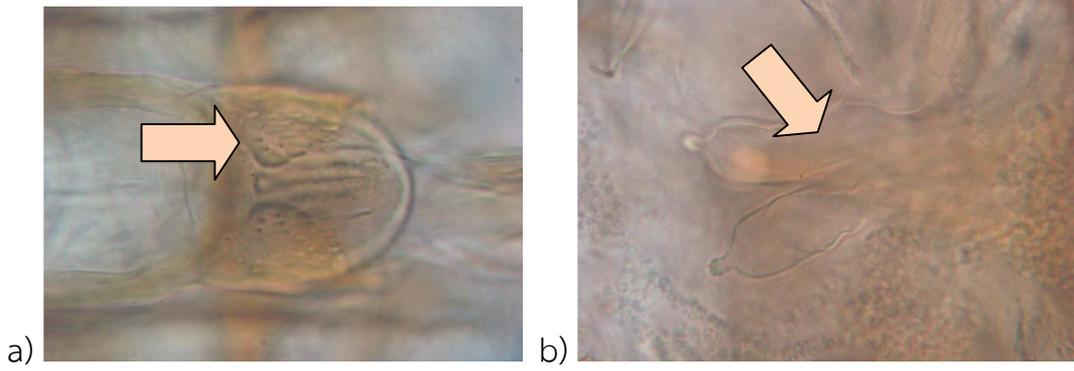
รูปที่ 25 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *S. perturbans*



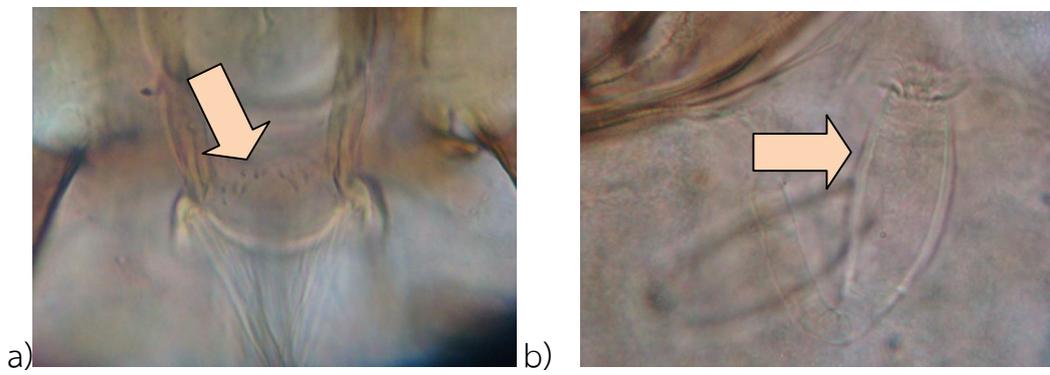
รูปที่ 26 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *S. iyengari*



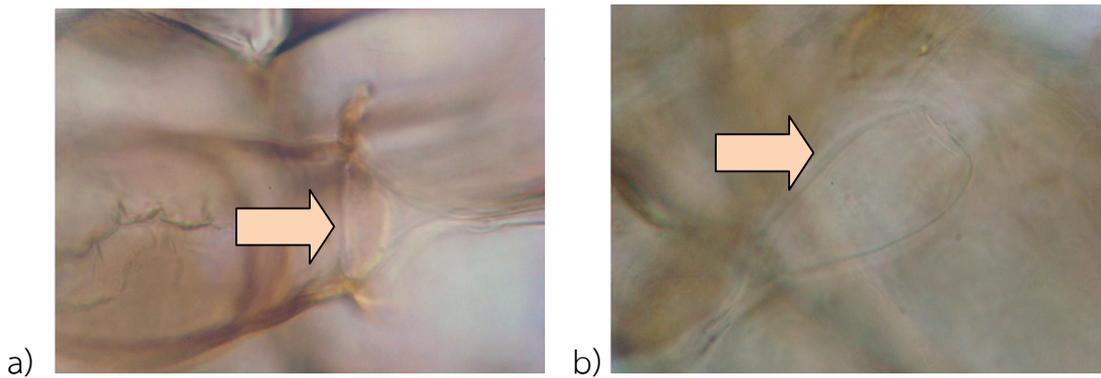
รูปที่ 27 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *P. philippinensis gouldi*



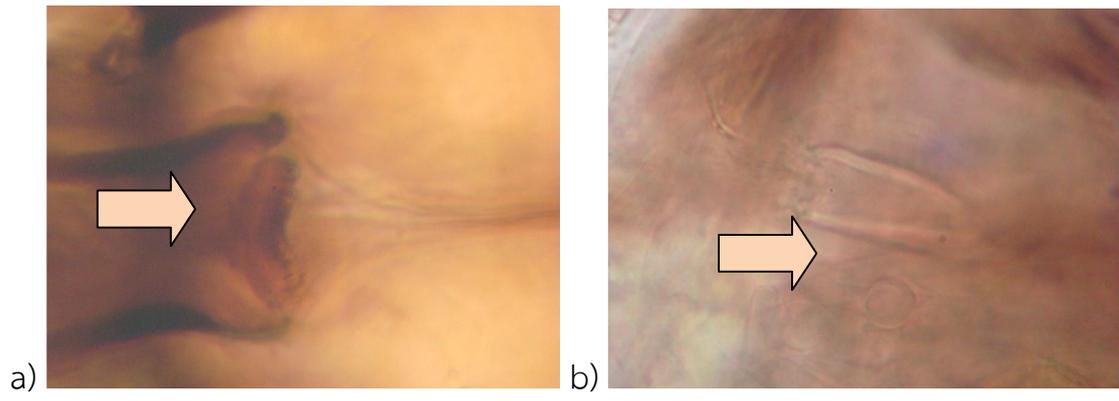
รูปที่ 28 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ *P. asperulus*



รูปที่ 29 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ Unidentified group B



รูปที่ 30 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ Unidentified group C



รูปที่ 31 Cibarium (a) Spermatheca (b) ของ Unidentified group H

5. การอภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษ้อัตราการกระจายตัวและจำนวนของริ้นฝอยทรายที่ดักจับได้โดยใช้กับดักแสงไฟ ตั้งแต่ช่วงเดือนสิงหาคม 2557 ถึงเดือนสิงหาคม 2558 ได้ทำการสำรวจโดยวางกับดักตั้งแต่เวลา 18.00-06.00 นาฬิกาในตำแหน่งที่แตกต่างกันภายในเขตที่ทำการอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ทั้งนี้การเลือกตำแหน่งที่สำรวจนั้นตลอดการศึกษาจะเป็นตำแหน่งเดิมทั้ง 35 ตำแหน่งต่อเดือน ผลการศึกษาพบริ้นฝอยทรายทั้งหมด จำนวน 34,113 ตัว (เพศผู้ 20,146 ตัว เพศเมีย 13,967 ตัว) สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย คือ 1.4 ต่อ 1 โดยจะพบว่าริ้นฝอยทรายมีจำนวนและการกระจายตัวที่แตกต่างกันในตำแหน่งที่ดักและช่วงเดือนที่ทำการการศึกษา เดือนที่พบจำนวนการกระจายตัวของริ้นฝอยทรายสูงสุดคือเดือนมิถุนายน 2558 พบเพศผู้จำนวน 7,654 ตัว และเพศเมียจำนวน 3,719 ตัว รวมทั้งหมด 11,373 ตัว (ร้อยละ 33.34) รองลงมาคือเดือนกรกฎาคม ร้อยละ 20.82 และน้อยที่สุดในเดือนมกราคม ร้อยละ 2.48 ของริ้นฝอยทรายทั้งหมดที่ดักจับได้ตลอดการศึกษา อัตราการกระจายตัวที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสภาพดิน ความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหาร เช่น หนูหรือสัตว์อื่นที่อาศัยอยู่ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ นอกจากนี้สิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์มีผลต่อการเจริญเติบโตของริ้นฝอยทราย โดยพบว่าในแต่ละตำแหน่งและช่วงฤดูกาลที่ทำการศึกษามีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่แตกต่างกัน พบว่าในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีช่วงอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) และความชื้นสัมพัทธ์ (%) คือ $17.4\text{-}33.9^{\circ}\text{C}$ และ $48\text{-}97\%$ ตลอดช่วงฤดูกาลที่ทำการการศึกษา ดังนั้นจากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของพื้นที่และสภาพแวดล้อมของริ้นฝอยทรายนั้นมีผลต่อชนิดและจำนวนของริ้นฝอยทราย เช่นกัน

การจำแนกชนิดของริ้นฝอยทราย โดยใช้ลักษณะทางกายภาพทั้งภายในและภายนอกของริ้นฝอยทรายนั้น ตลอดการศึกษา พบริ้นฝอยทรายที่จำแนกชนิดได้ จำนวน 11 ชนิด ดังนี้ *Phlebotomus stantoni*, *P. asperulus*, *P. philippinensis gouldi*, *Sergentomyia anodontis*, *S. gemmea*, *S. perturbans*, *S. quatei*, *S. indica*, *S. barraudi*, *S. silvatica* และ *S. iyengari* และยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ แต่แบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะที่ต่างกันจำนวน 3 กลุ่ม คือ Unidentified Group B, C, และ H ส่วนชนิดที่พบมากที่สุดคือ *S. anodontis* (33.02%) รองลงมาคือ *S. silvatica* (17.24%) จากการศึกษารุ่นนี้ไม่พบชนิด *P. argentipes* ซึ่งมีรายงานว่าสามารถเป็นพาหะนำโรคเลิชมาเนียได้ แต่มีรายงานพบในพื้นที่อื่นของไทย เช่น ในถ้ำภายในเขตเขาปฐวี ในถ้ำพระโพธิสัตว์และถ้ำนเรศวร (Polseela *et al.*, 2007;2011; 2015) อย่างไรก็ตามการศึกษารุ่นนี้พบ *S. gemmea* ซึ่งได้เคยมีรายงานถึงความน่าจะเป็นในการนำเชื้อเลิชมาเนียของ *S. gemmea* ในเขตภาคใต้ของไทย รายงานโดย Kanjanopas *et al.*, (2013) ซึ่งเป็นการตรวจพบเชื้อ *Leishmania siamensis* ในริ้นฝอยทรายที่อยู่ในพื้นที่ที่พบผู้ป่วยโรคเลิชมาเนียที่อาศัยอยู่ในจังหวัดตรัง เป็นต้น การศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทยมีรายงานชนิดของริ้นฝอยทรายทั้งหมดอย่างน้อย 27 ชนิด (Apiwathnasorn *et al.*,1989;2011) โดยเป็นการศึกษาและสำรวจริ้นฝอยทรายในหลายพื้นที่ภายในประเทศ และศึกษาจากแหล่งเพาะพันธุ์หรือแหล่งอาศัยที่ต่างกัน เช่น ป่า คอกสัตว์ โพรงไม้ โบราณสถาน รุที่สัตว์อาศัยอยู่ หรือในถ้ำ เป็นต้น การสำรวจที่ผ่านมา เช่น การศึกษาริ้นฝอยทรายในถ้ำพระโพธิสัตว์ จ.สระบุรี โดยใช้กับดักแสงไฟ ระยะเวลา 1 ปี โดย Polseela *et al.*, (2007) พบริ้นฝอยทราย 13 ชนิด ซึ่งพบชนิดเดียวกันกับการศึกษารุ่นนี้ถึง 8 ชนิด และการศึกษาในถ้ำนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก พบริ้นฝอยทรายทั้งหมด 13 ชนิด ซึ่งมีชนิดเดียวกันกับการศึกษารุ่นนี้ทั้ง 8 ชนิด (Polseela *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีผลการสำรวจริ้นฝอยทรายภายนอกถ้ำพระโพธิสัตว์ จังหวัดสระบุรี พบริ้นฝอยทรายจำนวน 16 ชนิด ซึ่งพบว่ามีชนิดของริ้นฝอยทรายมากกว่าภายในถ้ำพระโพธิสัตว์ และมีชนิดเดียวกันกับการศึกษารุ่นนี้ถึง 11 ชนิด อย่างไรก็ตามทุกชนิดที่จำแนกได้นั้นเป็นชนิดที่เคยมีการรายงานในประเทศไทยมาแล้วทั้งสิ้น (Polseela *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามใน

การศึกษาครั้งนี้มีอย่างน้อย 3 ชนิดที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ซึ่งอาจเป็นชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานในไทย หรือเป็นชนิดใหม่ก็อาจเป็นได้

การศึกษาความหนาแน่นเฉลี่ยของรังไรฝอยทรายที่ดักจับได้โดยการใช้กับดักแสงไฟ พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาและตำแหน่งที่ทำการศึกษา ในเดือนมิถุนายน 2558 พบว่ามีความหนาแน่นของรังไรฝอยทรายสูงสุดในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ 1,877 ตัวต่อกับดักต่อคืน และความหนาแน่นเฉลี่ยของรังไรฝอยทรายตลอดการศึกษาคือ 75.81 ตัวต่อกับดักต่อคืน Polseela *et al.*, (2007) ได้ทำการศึกษาภายในถ้ำพระโพธิสัตว์ จ.สระบุรี โดยใช้กับดักแสงไฟดัก พบรังไรฝอยทรายทั้งหมด 13 ชนิด โดยชนิดที่พบมากที่สุด คือ *S. silvatica* (43.5%) รองลงมา คือ *S. anodontis* (31.5%) และ Polseela *et al.*, (2011) รายงานชนิดของรังไรฝอยทรายภายนอกถ้ำพระโพธิสัตว์ จังหวัดสระบุรี 16 ชนิด โดยชนิดที่พบมากที่สุด *S. silvatica* (35.6%) รองลงมาคือ *S. barraudi* (18.1%) ซึ่งชนิดที่ค้นพบทั้งหมดนี้เป็นชนิดที่ได้มีรายงานมาก่อนแล้วในไทย ต่อมา Polseela *et al.*, (2011) ได้ทำการสำรวจการกระจายตัวของรังไรฝอยทราย ภายในถ้ำนเรศวร อ.เนินมะปราง จ.พิษณุโลก พบทั้งสิ้น 13 ชนิด ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *N. vietnamensis* (49.15%) รองลงมา คือ *P. argentipes* (20.15%) และมีรายงานชนิดของรังไรฝอยทรายที่เขापฐวิ จังหวัดอุทัยธานี จำนวน 8 ชนิด และมีความหนาแน่นเฉลี่ยของรังไรฝอยทรายในถ้ำราตรีสูงกว่าถ้ำอื่นคือ 35 ตัวต่อกับดักต่อคืน โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ *S. anodontis* (55.0%) (Polseela *et al.*, 2015) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาค้นคว้าที่พบ *S. anodontis* มากที่สุดเช่นกัน ส่วนความหนาแน่นของรังไรฝอยทรายในถ้ำพระโพธิสัตว์พบความหนาแน่นเฉลี่ยของรังไรฝอยทราย 38.29 ตัวต่อกับดักต่อคืน โดยความหนาแน่นสูงสุดที่พบคือ 436 ตัว/กับดัก/คืน ส่วนภายนอกถ้ำพระโพธิสัตว์นั้นพบความหนาแน่นเฉลี่ยของรังไรฝอยทราย 56.46 ตัวต่อกับดักต่อคืน และในถ้ำนเรศวร มีความหนาแน่นเฉลี่ยของรังไรฝอยทราย 42.14 ตัวต่อกับดักต่อคืน (Polseela *et al.*, 2007; 2011) ดังนั้นจากการศึกษาในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์พบว่าความหนาแน่นเฉลี่ยของรังไรฝอยทรายสูงกว่าการศึกษาในพื้นที่อื่นที่เคยได้รายงานมาก่อนในไทย โดยช่วงที่พบความหนาแน่นเฉลี่ยของรังไรฝอยทรายสูงสุดคือเดือนมิถุนายน 2558 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของรังไรฝอยทรายก็อาจเป็นไปได้ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับชนิดและการกระจายตัวของรังไรฝอยทรายในแต่ละพื้นที่นั้น จะมีผลการศึกษาแตกต่างกันตามฤดูกาลด้วยเช่นกัน เนื่องจากประเทศไทยได้มีการส่งเสริมการท่องเที่ยว โดยเฉพาะการท่องเที่ยวเชิงอนุรักษ์ ดังนั้นสถานที่ท่องเที่ยวจึงควรมีข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับแมลงพาหะที่จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการหาแนวทางในการป้องกันหรือควบคุมโรคพิษมาเนียบในแต่ละพื้นที่ ได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อไป

6. สรุปผลการศึกษา (Conclusion)

ผลจากการเก็บรวบรวมริ้นฝอยทรายเป็นระยะเวลา 13 เดือน (เดือนตุลาคม 2555 ถึงกันยายน 2556) มีผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1. ผลการศึกษาอัตราการกระจายตัว และจำนวนของริ้นฝอยทรายที่ดักจับได้โดยใช้กับดักแสงไฟ ภายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2557 ถึงเดือนสิงหาคม 2558 รวมเป็นระยะเวลา 13 เดือน พบริ้นฝอยทรายทั้งหมด จำนวน 34,113 ตัว (เพศผู้ 20,146 ตัว เพศเมีย 13,967 ตัว) สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย คือ 1.4 : 1

2. เดือนที่พบจำนวนการกระจายตัวของริ้นฝอยทรายสูงสุดคือเดือนมิถุนายน 2558 พบเพศผู้จำนวน 7,654 ตัว และเพศเมียจำนวน 3,719 ตัว รวมทั้งหมด 11,373 ตัว (ร้อยละ 33.34) รองลงมาคือเดือนกรกฎาคม ร้อยละ 20.82 และน้อยที่สุดในเดือนมกราคม ร้อยละ 2.48

3. ชนิดของริ้นฝอยทรายเพศเมียที่จำแนกได้ภายในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร มีจำนวน 11 ชนิด รายละเอียดมีดังนี้ *Phlebotomus stantoni*, *P. asperulus*, *P. philippinensis gouldi*, *Sergentomyia anodontis*, *S. gemmea*, *S. perturbans*, *S. quatei*, *S. indica*, *S. barraudi*, *S. silvatica*, *S. iyengari* และยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ แต่แบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะที่แตกต่างกันได้ 3 กลุ่ม คือ Unidentified Group B, C, และ H และชนิดที่พบมากที่สุดคือ *S. anodontis* (33.02%) รองลงมาคือ *S. silvatica* (17.24%)

4. การศึกษาความหนาแน่นเฉลี่ยของริ้นฝอยทรายที่ดักจับได้โดยใช้กับดักแสงไฟ ในเดือนมิถุนายน 2558 พบว่าความหนาแน่นสูงสุดคือ 1,877 ตัวต่อกับดักต่อคืน และความหนาแน่นเฉลี่ยของริ้นฝอยทรายตลอดการศึกษาคือ 75.81 ตัวต่อกับดักต่อคืน

ข้อเสนอแนะ (Recommendation)

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับอัตราการกระจายตัวและจำนวนของริ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่เป็นแหล่งท่องเที่ยวสำคัญและเป็นพื้นที่ที่ได้รับการอนุรักษ์ซึ่งยังคงสภาพของธรรมชาติที่มีความสมบูรณ์อย่างมาก และยังมีนักท่องเที่ยวเดินทางเข้าไปท่องเที่ยวตลอดปี ซึ่งมีทั้งชาวไทยและชาวต่างชาติ จึงอาจมีโอกาสนำเชื้อโรคจากแหล่งอื่นเข้ามาในพื้นที่ได้ การที่มีแมลงบางชนิดที่อาจเป็นพาหะนำโรคได้ในพื้นที่นั้นๆ จึงนับเป็นส่วนหนึ่งของวงจรการติดต่อของโรคที่มีแมลงพาหะที่สามารถกัดดูดเลือดและเป็นตัวนำเชื้อที่สามารถติดต่อมาสู่คนหรือสัตว์ต่างๆ ในเขตอุทยาน ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับริ้นฝอยทรายในแต่ละพื้นที่จึงมีความสำคัญอย่างมาก ในทางระบาดวิทยา อีกทั้งจะเป็นแนวทางเพื่อรายงานชนิดของริ้นฝอยทรายที่อาจนำเชื้อลิซมาเนียหรือเป็นชนิดใหม่ ซึ่งในประเทศไทยมีรายงานชนิดของริ้นฝอยทรายอย่างน้อยถึง 27 ชนิด ในพื้นที่นี้พบริ้นฝอยทรายอย่างน้อยถึง 11 ชนิด ข้อมูลจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์และจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาต่อเนื่องในพื้นที่อื่น หรือมีการวินิจฉัยเพื่อหาชนิดของเชื้อลิซมาเนียที่อาจพบในริ้นฝอยทรายในพื้นที่ที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการระบาดของโรคต่อไป

7. บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง

- ชูเกียรติ ศิริวิชัยกุล, ศรชัย หล่ออารีย์สุวรรณ, ประยงค์ ระดมยศ, บรรณาธิการ. ตำราปรสิตวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: เมติคัล มีเดีย; 2536.
- ธีรยุทธ สุขมี, สุชาดา จันทสิริยากร, กอบกาญจน์ กาญจนโณภต. สถานการณ์โรคไลชมาเนียในประเทศไทย (Situation of leishmaniasis in Thailand). รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 255442:260-64.
- ธีรยุทธ สุขมี. โรคไลชมาเนียซิส (Leishmaniasis). รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์. 2553;41:48-63.
- Adler S, Theodor O. Transmission of disease agents by phlebotominae sand flies. *Ann Rev Entomol* 1957;2:203-26.
- Apiwathnasorn C, Sucharit S, Rongriyam Y, *et al.* A brief survey of Phlebotominae sand flies in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1989;20:429-31.
- Apiwathnasorn C, Sucharit S, Surathi K, Deesin T. Anthropophilic and zoophilic phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae) from Thailand. *J Am Mosq Contro.*1993;9:135-7.
- Brown HW. *Phlebotomus* sand flies, *Basic Clinical Parasitology* 1969;59-68.
- Causey OR. *Phlebotomus* of Siam with a description of new variety. *Am J Hyg* 1938;28:487-9.
- Chandipura virus [online] 2011.[cited 2011 March 9] Available from URL: (<http://www.cueid.org/content/view /34 /40/>)
- Cortez AM, Silva VPM, Queiroz PVS. *et al.* Vertical stratification and development aspects of phlebotominae sand flies (Diptera:Psychodidae) in an area of Atlantic Forest tree species in a metropolitan region in Northeastern Brazil. *J Vector Ecol* 2007;32(2): 336-341.
- Depaquit J, Leger N, Beales P. *Chinius barbazani* n. sp. from Thailand (Diptera: Psychodidae). *Parasite.*2006;13(2):151-8.
- Depaquit J, Muller F, Léger N. *Phlebotomus (Euphlebotomus) barguesae* n. sp. from Thailand (Diptera –Psychodidae). *Parasites & Vectors.* 2009;2:5.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol Microbiol infect Dis* 1996;27:305-18.
- Emanuel R, John LF. *Pathology.* 2nd edition. J.B.Lippincott company Philadelphia1994:431-3.
- Galati E A B, Nunes V L B, Boggiani P C, *et al.* Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 2003.47(2), 283-296
- Garcia LS. *Diagnostic Medical Parasitology.*5th edition. the United States of America. American Society for Microbiology, Washington, DC; 2007.
- Herms WB. *Medical Entomology.* The Macmillan company. London 1969;156.
- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 1999;17:279-89.

- Killick-Kendrick R, Rioux JA, Bailly M, *et al.* Ecology of leishmaniasis in the south of France 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a vector in the spread of visceral leishmaniasis in the Cevennes. *Annales de Parasitologie humaine et compare* 1984;59:555-72.
- Kongkaew W, Siriarayaporn P, Leelayoova S, *et al.* Autochthonous visceral leishmaniasis; a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38:8-12.
- Lane RP, Crosskey RW. Medical insects and Arachnids. The natural History Museum 1993;6-102.
- Leishmaniasis [online] 2011.[cited 2011 March 12] Available from URL: www.Leishmaniosis.htm
- Lewis DJ. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. *Ann Rev Entomol* 1974;19: 363-84.
- Lewis DJ. The Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Oriental Region. *Bull Br Mus nat Hist (Ent.)*1978;37(6):217-343.
- Mellor HE, Hamilton JCG, Anderson M. Spectral sensitivity in the eyes of male and female *Lutzomyia longipalpis* sand flies. *Med Vet Entomol* 1996; 10:371- 4.
- Morton I, Ward RD. Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sand flies to a host and male pheromone source over distance. *Med Vet Entomol* 1989;3: 219-23.
- Muller F, Depaquit J, Leger N. *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* n. sp.(Diptera: Psychodidae). *Parasitol Res* 2007;101:1597-602.
- Polseela R, Apiwathanasorn C, Samung Y. Seasonal Variation of Cave-Dwelling Phlebotomine Sand Flies (Diptera:Psychodidae) in Phra Phothisat Cave, Saraburi Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007;38:1011-1015.
- Polseela R, Apiwathnasorn C, Samung, Y. Seasonal distribution of phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae) in Tham Phra Phothisat temple, Saraburi province, Thailand *Trop Biomed* 2011;28(2): 366–375.
- Polseela R, Vitta A, Nateeworanart S, *et al.* Distribution of cave-dwelling phlebotomine sand flies and their nocturnal and diurnal activity in Phitsanulok Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011; 42(6):1395-1405.
- Polseela R, Vitta A, Apiwathnasorn C . Distribution of Phlebotomine Sand Flies (Diptera:Psychodidae) in Limestone caves Khao Pathawi, Uthaithani Province. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 2015; 46(3): 425-433.
- Quate LW. A Review of the Indo-Chinese Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). *Pacific Insect* 1962;4:251-67.
- Raynal J, Gaschen H. Sur La presence de *Phlebotomus* dans lenord de l'Indochine, *Bulletin of Society of Medical. Chir Indochine* 1934;12:531.
- Roberts LS, Janovy J. *Foundations of Parasitology*. 8th edition. New York, the United States of America:McGraw-Hill companies; 2009.

- Shahar MK, Hassan AA, Lee HL, *et al.* Studies of Phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) Populations in Limestone Areas and Caves of Western Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011;42(1):83-93.
- Service MW. *A Guide to Medical Entomology*. Macmillan International college editions 1980;77.
- Service MW. *Medical Entomology for Student*. 2nd edition. Cambridge University press 2000; 91-100.
- Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, *et al.* A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *Int J Parasitol* 2008;38:617-22.
- Thisyakorn U, Jongwutiwes S, Vanichsetakul P, Lertsapcharoen P. Visceral leishmaniasis: the first indigenous case report in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:23-4.
- Theodor O. On sand flies *Phlebotomus* from Ceylon, Siam and Malay. *Indian J Med Res* 1938; 26-261.
- Ward RD, Phillips A, Burnet B, *et al.* The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. *Biosystematics of haematophagous insects*.xi. Clarendon Press, Oxford 1988; 57-69.
- World Health Organization. Control of leishmaniasis. Reports of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report 1990;739,793.
- World Health Organization. Manual on Entomology in Visceral Leishmaniasis by Kalra NL and Bang YH. SEA/VBC1988;1-85.

คณะนักวิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รักษิณา พลสีลา หัวหน้าโครงการ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวรักษิณา (พนิดา) พลสีลา
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Raxsina (Panida) Polseela
ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์)
หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055- 964618, 089-7174814 โทรสาร 055-964770
E-mail : polseela@hotmail.com , raxsinap@nu.ac.th
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ วิทย์ตะ ผู้ร่วมวิจัย
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายอภิชาติ วิทย์ตะ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Apichat Vitta
ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์)
หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055- 964653, 089-7031663 โทรสาร 055-964770
E-mail: apichatv@hotmail.com, apichatv@nu.ac.th
3. นางสาวนารีลักษณ์ นาแก้ว (Miss Nareeluk Nakaew)
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวนารีลักษณ์ นาแก้ว
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Nareeluk Nakaew
ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์)
หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055- 964622, 081-0308644 โทรสาร 055-964770
E-mail: nnakaew@hotmail.com



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพา
ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Biodiversity of entomopathogenic nematodes and their bacterial symbiosis in Mae
Wong National Park

ในแผน

ความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Biodiversity and Utilization of Biological Resources in Mae Wong National Park

โดย

ผศ.ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ดร.อัญชลี ฐานวิสัย	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ผศ.ดร.รักษิณา พลสีลา	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
นายสุธน เวียงดาว	หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2559

รายงานการวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพา
ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Biodiversity of entomopathogenic nematodes and their bacterial symbiosis in Mae
Wong National Park

ในแผน

ความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรชีวภาพในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Biodiversity and Utilization of Biological Resources in Mae Wong National Park

โดย

ผศ.ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ดร.อัญชลี ฐานวิสัย	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ผศ.ดร.รักษิณา พลสีลา	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
นายสุธน เวียงดาว	หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีจากความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ขอขอบคุณ นางสาวชไมพร พิภ
รักษา นางสาวทัชชา ยิ้มถิ่น นายมนวรรณ สุวรรณโรจน์ นางสาวปรมาภรณ์ ม่วงปัทม์ นางสาวเต็มศิริอยู่ยง
เกต นางสาวพรสุพรรณ อ้ายวงศ์ นางสาวชุตินา สาหรัย นางสาววิภาณี มีศิลป์ นายปณณวัฒน์ ทิมภู นางสาว
กมลพรรณ ศ.เรืองญาณ นางสาวพิชามณูช จันธู ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่างดิน และบุคลากรของภาควิชาจุล
ชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้ให้สนับสนุนเครื่องมือ
บางอย่างสำหรับการทำงานวิจัย

สุดท้ายต้องขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย ประจำปี
งบประมาณ 2556 ทำให้การดำเนินการวิจัยสำเร็จลงด้วยดี

อภิชาติ วิทย์ตะ
กุมภาพันธ์ 2559

ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพา ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีรายงานพบทั้ง 2 สกุลจากทั่วโลก และทั้ง 2 สกุล สามารถใช้ควบคุมแมลงชนิดอื่นๆ ได้หลายชนิด แต่ในประเทศไทยยังมีการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายชนิดค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะในเขตอุทยานแห่งชาติที่มีความหลากหลายทางระบบนิเวศ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อจำแนกชนิดและศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* เก็บตัวอย่างดินจำนวน 550 ตัวอย่างในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดิน โดยใช้ตัวอ่อนหนอนกิ้งมิ่ง (*Galleria mellonella*) เป็นเหยื่อล่อ แล้วจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 28S rDNA สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ Internal transcribed spacer (ITS) สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ด้วยการทำ BLASTN เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต แบ่งเป็น *H. indica* จำนวน 3 ไอโซเลต *H. baujardi* จำนวน 3 ไอโซเลต และ *H. amazonensis* จำนวน 1 ไอโซเลต สำหรับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาสสามารถแยกได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต จำนวน 2 สกุล คือ *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต แบ่งเป็น *X. stockiae* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *X. japonica* จำนวน 1 ไอโซเลต สำหรับสกุล *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต แบ่งเป็น *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 20 ไอโซเลต ส่วนอีก 1 ไอโซเลต เป็น *P. temperata* subsp. *temperate* จำนวน 1 ไอโซเลต

การศึกษาครั้งนี้นอกจากพบความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียอาศัยอยู่แบบพึ่งพา *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์แล้วยังพบชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย คือ *H. amazonensis* และแบคทีเรีย *X. japonica* และ *P. temperata* subsp. *temperate* การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพ หรืออาจจะนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงหรือแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หรือทางการเกษตรต่อไปได้

คำสำคัญ: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง/*Xenorhabdus*/*Photorhabdus*/ความหลากหลาย/อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Biodiversity of entomopathogenic nematodes and their bacterial symbiosis in Mae Wong National Park

Abstract

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of genus *Steinernema* and *Heterorhabditis* have been reported worldwide and were used for control of insect pest. Study of diversity of EPNs was limited in Thailand especially in National Park where ecological systems are diverse. The objectives of this study were to identify and study the phylogenetic tree of entomopathogenic nematodes and *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. Five hundred and ten soil samples were collected Mae Wong National Park. Entomopathogenic nematodes were isolated from soil samples using *Galleria mellonella* as bait. Molecular identification was performed by analysis of a partial nucleotide of 28S rDNA gene for *Steinernema* and Internal transcribed spacer (ITS) for *Heterorhabditis*. BLASTN search was performed to compare with known sequence in NCBI database. Seven isolates of genus *Heterorhabditis* were identified as *H. indica* (3 isolates), *H. baujardi* (3 isolates), and *H. amazonensis* (1 isolate). Twenty-four isolates of symbiotic bacteria of genus *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* were identified. It composed of 3 isolates of *Xenorhabdus* (*X. stockiae* = 2 isolates and *X. japonica* = 1 isolate). Genus *Photorhabdus* composed of 20 isolates of *P. luminescens* subsp. *akhurstii* and 1 isolate of *P. temperata* subsp. *temperate*.

This study provides the diversity of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, in Mae Wong National Park. In addition, *H. amazonensis*, *X. japonica* และ *P. temperata* subsp. *temperate* have never been reported in Thailand. This study provides basic knowledge on biodiversity. It might be advantage for medical and agricultural aspects in further.

Keywords: Entomopathogenic nematodes/*Xenorhabdus*/*Photorhabdus*/Diversity/Mae Wong National Park

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	3
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	4
สารบัญ	5
บทที่ 1 บทนำ	6
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	9
บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการวิจัย	39
บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	52
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก ก การติดต่อประสานงานกับหัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ การเก็บตัวอย่างดิน วัดและจุดบันทึกปัจจัยทางกายภาพของตัวอย่างดิน	78
ภาคผนวก ข ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	83
ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรีย <i>Xenorhabdus</i> และ <i>Photorhabdus</i> ที่แยกจากตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	121
คณะผู้วิจัย	130

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ไส้เดือนฝอยเป็นหนอนตัวกลมที่สามารถฆ่าตัวอ่อนของแมลงที่เป็นศัตรูพืช (Entomopathogenic nematode) ซึ่งได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency: EPA ถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลือดอุ่น และมนุษย์ รวมทั้งปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมด้วย (Kaya and Gaugler, 1990) ปัจจุบันมีรายงานไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 วงศ์ คือ Steinernematidae และ Heterorhabditidae (Kaya, 1985; Gaugler, 1988; Kaya and Gaugler, 1990) ซึ่งมีการดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยจะอยู่ร่วมกันในลักษณะพึ่งพาอาศัยหรือที่เรียกว่า symbiosis โดยที่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* อาศัยอยู่ในลำไส้กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ตามลำดับ โดยตัวอ่อนระยะที่ 3 ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะเข้าทำลายแมลง ผ่านทางปาก ช่องขับถ่าย และรูหายใจทางผิวหนัง จากนั้นเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวแมลง (haemocoel) ซึ่งมีน้ำเลือด (haemolymph) แล้วไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงปลดปล่อยแบคทีเรียสู่กระแสเลือดของแมลง รวมทั้งสร้างสารพิษ (toxin) ทำให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 48 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณได้ในน้ำเลือดของแมลงและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้โดยการกินแบคทีเรียและซากแมลงเป็นอาหาร จากนั้นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเคลื่อนตัวออกจากซากแมลงแล้วหาเหยื่อใหม่ต่อไป

ปัจจุบันมีรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* มีจำนวน 91 ชนิด (Thanwisai *et al.* 2012; Cimen *et al.* 2014; Nthenga *et al.* 2014; Phan *et al.* 2014; Shahina *et al.* 2014) และสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 26 ชนิด (Li *et al.* 2012; Thanwisai *et al.* 2012; Malan *et al.* 2014) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถพบได้ทั่วโลก ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา (Hominick *et al.* 1996) ส่วนใหญ่พบได้ในตัวอย่างดินร่วนที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง ที่อุณหภูมิระหว่าง 25 - 28 องศาเซลเซียส (Kaya and Stock, 1997; Molyneux, 1986) ในประเทศไทยมีรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทยครั้งแรกในปี พ.ศ. 2534 โดย วชิรี สมสุข ได้แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากอำเภอลำลูกเกด จังหวัดเพชรบูรณ์ และได้ระบุให้เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ใหม่ของโลก พร้อมทั้งตั้งชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Steinernema siamkayai* (วชิรี สมสุข 2534; Stock *et al.* 1998) และล่าสุดในปี ค.ศ. 2010 มีรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ของโลกเพิ่มเติม คือ *Steinernema minutum* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากจังหวัดชุมพร (Maneesakorn *et al.* 2010) และมีรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis indica* จากจังหวัดขอนแก่นและกระบี่ (Maneesakorn *et al.* 2011) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* sp. จากจังหวัดกาญจนบุรี

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย ได้มีการศึกษาแล้วในหลายจังหวัด เมื่อปี ค.ศ. 2012 Thanwisai และคณะ ได้ศึกษาความหลากหลายของทั้งแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจาก 13 จังหวัดของประเทศไทย พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* อาศัยอยู่กับแบคทีเรีย *X. stockiae* ส่วนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. khoisanae* อาศัยอยู่กับ *X. miraniensis* ในขณะที่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* อาศัยอยู่กับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *hainanensis* และ *P.*

luminescens subsp. *akhurstii* และ *P. luminescens* subsp. *laumondii* และ *P. asymbiotica* subsp. *australis* ล่าสุดเมื่อปี พ.ศ. 2558 ชไมพร พิทักษ์ ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจาก 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงส่วนใหญ่เป็น *S. websteri* และ *H. indica* และพบ *S. scarabaei* เพียง 1 ไอโซเลต ซึ่งเป็นรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทย ส่วนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงส่วนใหญ่เป็น *X. stockiae* และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii*

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ มีพื้นที่ครอบคลุม 2 จังหวัด คือ กำแพงเพชร และนครสวรรค์ เป็นพื้นที่ป่าที่มีสภาพธรรมชาติที่สวยงาม และอุดมสมบูรณ์และเป็นป่าต้นน้ำลำธาร ส่วนใหญ่เป็นเทือกเขาสูง มีเอกลักษณ์ทางธรรมชาติที่สวยงาม และสภาพป่าที่อุดมสมบูรณ์ด้วยพันธุ์ไม้และสัตว์ป่านานาชนิด จึงน่าจะมี ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ รวมถึงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และเหมาะสมที่จะเป็นพื้นที่อนุรักษ์ต่อไป

ในทางนิเวศวิทยาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญในแง่การเป็น predator คือ การเข้าทำลายตัวอ่อนของแมลงศัตรูพืช ซึ่งโดยปกติแล้วไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงพบได้ในดินที่ชื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินบริเวณที่อยู่ภายใต้ต้นไม้ใหญ่ที่สามารถพบได้ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศวิทยาที่อาจจะส่งผลกระทบต่อปริมาณต้นไม้ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ที่ทำให้จำนวนต้นไม้ลดลง ผลที่ตามมาคืออาจจะทำให้จำนวนและชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงลดลง ซึ่งอาจจะส่งผลให้เสียสมดุลทางธรรมชาติโดยจำนวนของแมลงศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้น แล้วอาจจะส่งผลกระทบต่อเนื้อไปยังพืชเศรษฐกิจที่อยู่โดยรอบได้

ดังนั้นการศึกษานี้จึงจะทำการสำรวจหาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ แล้วจึงแยกแบคทีเรียออกมาจากไส้เดือนฝอย เพื่อหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อจะได้ใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชหรือควบคุมแมลงที่เป็นพาหะนำโรค ตลอดจนอาจจะศึกษาแบคทีเรียในลำไส้ของไส้เดือนฝอยที่อาจจะผลิตสารบางอย่างที่ช่วยยับยั้งจุลชีพก่อโรคได้แล้วนำมาผลิตเป็นยาปฏิชีวนะต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย คือ จัดเก็บข้อมูลพื้นฐานในด้านความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพา

1. เพื่อสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบภาวะพึ่งพา จากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
2. เพื่อจำแนกจิ้นัส (Genus) และชนิด (Species) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบภาวะพึ่งพา ที่พบในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular techniques)
3. เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบภาวะพึ่งพา ที่เก็บในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบภาวะพึ่งพา
5. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาคของดินกับชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้จะเก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ทั้งในเขตจังหวัดกำแพงเพชรและนครสวรรค์ โดยเริ่มจากเก็บตัวอย่างดินแล้วแยกไส้เดือนฝอยออกจากดิน ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยใช้ตัวอ่อนหนอนผีเสื้อกลางคืน (*Galleria mellonella*) เป็นเหยื่อล่อไส้เดือนฝอยออกจากดิน จากนั้นทำการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากตัวอ่อนหนอนผีเสื้อกลางคืน (*G. mellonella*) โดยใช้วิธี White trap และตรวจดูภายใต้กล้อง Stereo microscope แล้วทำการเก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส และแยกแบคทีเรียออกจากหนอนกินหนอนกินรังผึ้ง โดยนำน้ำเลือด (Haemolymph) ของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลายด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพาะเลี้ยงบนอาหาร NBTA แล้วจึงทำการจำแนกตระกูล (Genus) และชนิด (Species) ของทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา พร้อมทั้งศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของไส้เดือนฝอยกับปัจจัยทางกายภาพของดิน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยเรื่องนี้มีประโยชน์ คือ ทำให้มีความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ทราบสายสัมพันธ์ของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย และอาจจะนำไปสู่การค้นพบสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยหรือแบคทีเรียที่เป็นชนิดใหม่ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางเกษตรกรรมและทางการแพทย์ของทั้งไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย และงานวิจัยนี้ จะได้รับการเผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

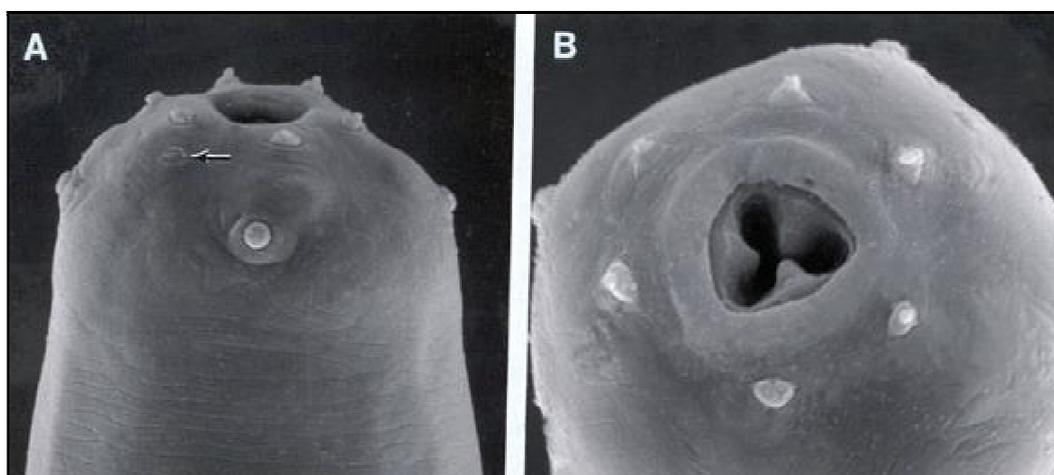
เป็นอุทยานแห่งชาติลำดับที่ 55 ของประเทศไทย เมื่อวันที่ 14 กันยายน 2530 โดยมีพื้นที่ครอบคลุมท้องที่อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร และอำเภอแม่วงก์ และกิ่งอำเภอแม่เปิน จังหวัดนครสวรรค์ พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นแหล่งกำเนิดต้นน้ำลำธาร ตามเทือกเขาสูงชันก่อกำเนิดเป็นน้ำตกที่สวยงาม 4-5 แห่ง ทั้งเป็นต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ที่สำคัญของจังหวัดนครสวรรค์ นอกจากนี้ยังมีแก่งหินทำให้เกิดน้ำตกเล็กๆ ตามแก่งหินนี้ ตลอดจนมีหน้าผาที่สวยงามตามธรรมชาติ มีเนื้อที่ประมาณ 558.750 ไร่ หรือ 894 ตารางกิโลเมตร มีสภาพป่าอุดมสมบูรณ์และเป็นป่าต้นน้ำลำธาร พื้นที่ดังกล่าว ส่วนใหญ่เป็นเทือกเขาสูงเป็นต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ มีเอกลักษณ์ทางธรรมชาติที่สวยงาม เช่น น้ำตกแม่กระสาหรือแม่กิ๊ ซึ่งสูงประมาณ 200 เมตร และหน้าผาต่างๆ สภาพป่าที่อุดมสมบูรณ์ด้วยพันธุ์ไม้และสัตว์ป่านานาชนิด

สภาพภูมิประเทศเป็นเทือกเขาสูงสลับซับซ้อนเรียงรายกันอยู่ตามเทือกเขาถนนธงชัยลดหลั่นลงมาจนถึงพื้นราบ ประมาณ 40-50 ลูก ยอดที่สูงที่สุดคือ “ยอดเขาโมโกจู” สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,964 เมตร เป็นแหล่งต้นน้ำลำธารต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ ส่วนพื้นที่ราบมีไม่มาก ส่วนใหญ่อยู่บริเวณริมแม่น้ำ และเป็นแหล่งแร่ธาตุสำคัญ เช่น แร่ไมก้า สภาพภูมิอากาศของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในช่วงฤดูหนาวเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน - เดือนกุมภาพันธ์ เป็นช่วงที่เหมาะสมแก่การไปท่องเที่ยวมากที่สุด เพราะอากาศค่อนข้างหนาวเย็น อันเนื่องมาจากลมความกดอากาศสูงมาจากประเทศจีนแผ่ลงมาทางตอนใต้เข้าสู่ประเทศไทย ตอนบนและปกคลุมทั่วประเทศ ลมที่พัดสู่ประเทศไทยในฤดูนี้คือ ลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนืออุณหภูมิต่ำสุดในเดือนมกราคม ประมาณ 8.9 องศาเซลเซียส ส่วนช่วงฤดูร้อนเริ่มต้นจากเดือนมีนาคม - เดือนพฤษภาคม อุณหภูมิสูงสุดในเดือนเมษายนประมาณ 38.1 องศาเซลเซียส อากาศค่อนข้างร้อนจัดและมีฝนตกน้อย ทำให้สังคมพืชป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณผลัดใบ สำหรับฤดูฝนเริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม มีปริมาณน้ำฝนโดยเฉลี่ย 1,100 มิลลิเมตรต่อปี ฤดูที่เหมาะสมสำหรับการท่องเที่ยวอุทยานอยู่ระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงกุมภาพันธ์

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ มีพื้นที่ 558,750 ไร่ หรือ (894 ตร.กม.) สามารถจำแนกลักษณะพืชพรรณและสัตว์ป่าดังนี้ ลักษณะพืชพรรณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ประกอบด้วย ป่าดิบเขา ประมาณ 0.88 % ป่าดิบแล้ง ประมาณ 21.85 % ป่าดิบแล้งผสมป่าเบญจพรรณชื้นประมาณ 9.24% ป่าเบญจพรรณ ประมาณ 59.05 % ป่าเต็งรัง ประมาณ 6.77 % และทุ่งหญ้าหรือไร่ร้าง ประมาณ 2.21 % ส่วนทรัพยากรสัตว์ป่า สามารถจำแนกได้ ได้แก่ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จำนวน 57 ชนิด 26 วงศ์ สัตว์จำพวกนก จำนวน 305 ชนิด 53 วงศ์ สัตว์เลื้อยคลาน จำนวน 22 ชนิด 11 วงศ์ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จำนวน 7 ชนิด 4 วงศ์ และปลา จำพวกปลาน้ำจืด จำนวน 68 ชนิด 14 วงศ์

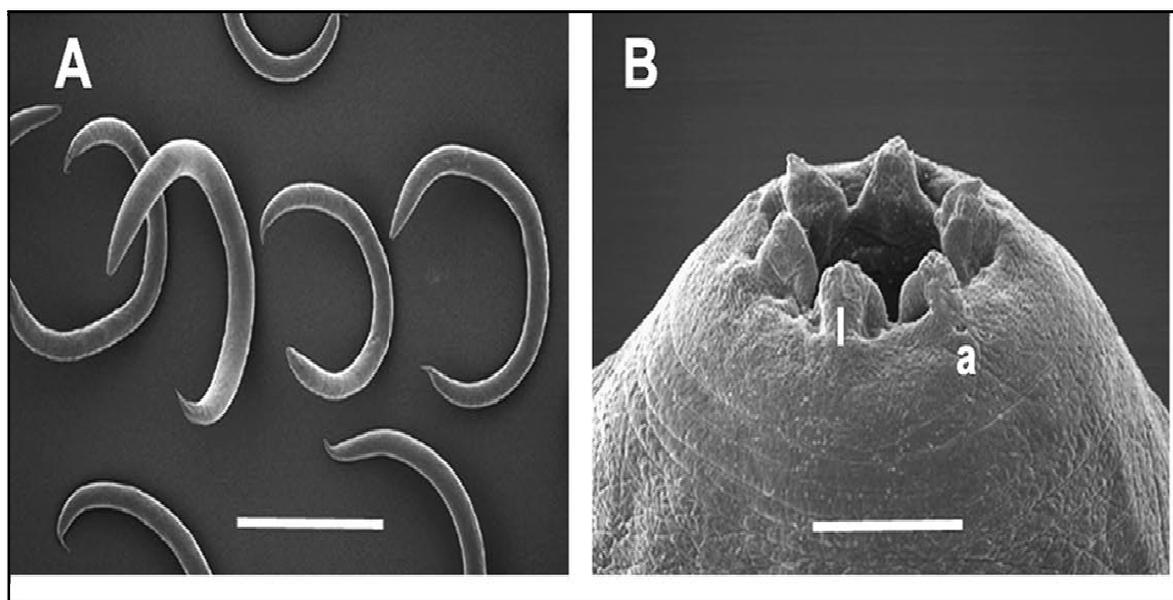
ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวงศ์ Steinernematidae และ Heterorhabditidae

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* สามารถทำให้แมลงตายภายใน 2 วัน โดยซากหนอนจะมีสีดำและไม่น่า วงจรชีวิตใช้เวลาประมาณ 12 วัน (มณฑลจันทร์ เมฆธน และคณะ, 2542) โดยเริ่มจากเมื่อตัวเมียวางไข่และออกมาจะเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 แล้วลอกคราบเป็นวัยที่ 2 ในช่วงท้ายวัยที่ 2 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะหยุดกินอาหาร และเก็บแบคทีเรียร่วมอาศัยไว้ในลำไส้ จากนั้นลอกคราบเป็นวัยที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อกันจากนั้นจะเข้าสู่ตัวแมลงเพื่อใช้เป็นอาหารและพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมีย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ไม่มี stylet ตัวผู้และตัวเมียแยกกัน (amphimictic) ปากมีริมฝีปาก 6 อัน เชื่อมติดกัน (ภาพ 1)



ภาพ 1 ลักษณะปากของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* (A), ลักษณะริมฝีปาก 6 ริมฝีปาก เชื่อมติดกัน (B) ที่มา: Nguyen and Smart, 1992

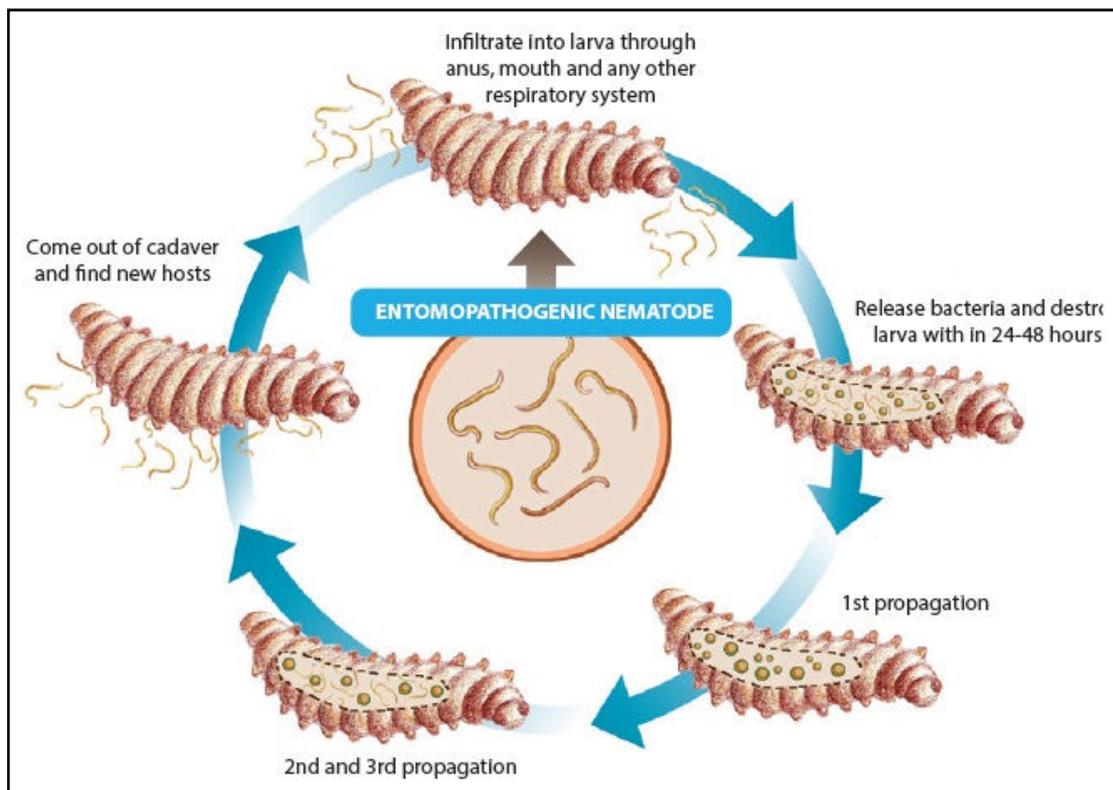
ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* มีการสืบพันธุ์ในรุ่นที่ 1 เป็นแบบ hermaphroditic และในรุ่นที่ 2 สืบพันธุ์แบบ amphimictic ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถทำให้แมลงอาศัยตายภายใน 2 วัน ซากหนอนเปลี่ยนเป็นสีแดงส้มและไม่น่า วงจรชีวิตใช้เวลาประมาณ 10 วัน (มณฑลจันทร์ เมฆธน และคณะ, 2542) ให้ลูกหลาน 2 ช่วงรุ่น ตัวอ่อนระยะติดต่อกันใช้เวลา 3 วัน โดยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศรวมในรุ่นที่ 1 (hermaphrodite) ส่วนรุ่นที่ 2 ตัวเต็มวัยมีทั้งเพศผู้และเพศเมีย (amphimictic) ฝึกเป็นตัวภายในตัวแม่ (endotokia matricida) จากนั้นประมาณ 10 วัน หลังจากตัวอ่อนระยะติดต่อกันเข้าสู่แมลงอาศัย ตัวอ่อนระยะติดต่อกันออกจากซากแมลงอาศัยเก่าเพื่อเข้าสู่แมลงอาศัยตัวใหม่ ตัวเต็มวัยไม่มี stylet ปากมีริมฝีปาก 6 อันที่แยกจากกันชัดเจน (ภาพ 2) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* มี labial tooth อยู่บริเวณส่วนหัวของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะที่ 3 มีลักษณะเป็นฟันที่แข็งแรง ช่วยในการเจาะทะลุผนังลำตัวของแมลง ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษที่พบในสกุลนี้เท่านั้น (Nguyen *et al.* 2004)



ภาพ 2 ลักษณะรูปร่างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะที่ 3 (infective juvenile) (A), ลักษณะริมฝีปาก 6 ริมฝีปากแยกออกจากกันและมี labial tooth (B) ที่มา: Nguyen et al. 2004

ชีววิทยาและวงจรชีวิต

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจัดอยู่ในอาณาจักร Nematoda กลุ่ม Chromadorea อันดับ Rhabditida วงศ์ Steinernematidae สำหรับไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และวงศ์ Heterorhabditidae สำหรับไส้เดือนฝอยสกุล *Heterorhabditis* เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่กินแบคทีเรียเป็นอาหาร มีหลายชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกับแมลงเพื่อเป็นพาหะนำไปแพร่กระจายในที่ต่างๆ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 วงศ์ มีลักษณะเฉพาะคือ โดยธรรมชาติดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ตามลำดับ โดยที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ในส่วนของลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระยะตัวอ่อนที่ 3 (infective stage) ซึ่งสามารถติดต่อเข้าสู่ตัวอ่อนแมลง โดยไซเข้าสู่ตัวอ่อนแมลงผ่านทางรูเปิดธรรมชาติ เช่น ทางปาก ทวาร และรูหายใจของแมลงศัตรูพืช จากนั้นเข้าสู่ระบบเลือด (hemolymph) แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเป็นสาเหตุทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง เนื่องจากภาวะเลือดเป็นพิษ (Bode, 2009) วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* จะคล้ายกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* (ภาพ 3) โดยวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ใช้ระยะเวลา 12 วัน ตั้งแต่ระยะเข้าทำลายจนกระทั่งออกจากซากตัวอ่อนแมลงเพื่อหาโฮสต์ตัวใหม่ ส่วนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ใช้เวลาประมาณ 10 วัน (มณจันท์ เมฆธน และคณะ, 2542)



ภาพ 3 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ที่มา: <http://vegalab.com/larva-bio-control/>

ประวัติการค้นพบครั้งแรกและในประเทศไทย

ในปี ค.ศ. 1923 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Gotthold Steiner ได้รายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เป็นครั้งแรกที่ประเทศเยอรมันและให้ชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Aplectana kraussei* (Steiner, 1923) ต่อมาในปี ค.ศ. 1927 Travassos ได้เปลี่ยนชื่อสกุลใหม่ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดนี้ชื่อว่า *Steinernema*

ในปี ค.ศ. 1975 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Poinar มีการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวงศ์ Heterorhabditidae เป็นครั้งแรกที่ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่จัดอยู่ในอันดับ Rhabditida เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวงศ์ Steinernematidae

สำหรับประเทศไทยมีการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง โดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา และกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์มีการสำรวจครั้งแรก เมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2539 โดยกองกัญและสัตววิทยา พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตระกูล Steinernematidae ที่บริเวณดินใต้ต้นมะขามหวาน อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ และได้มีการจัดจำแนกชนิดเป็นชนิดใหม่ ให้ชื่อเป็น *S. siamkayai* (Stock *et al.* 1998) ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Thanwisai และคณะ ได้รายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri*, *S. khoisanae* และ *H. indica*

ความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

ปัจจุบันไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีรายงานจากหลายประเทศทั่วโลก พบรายงานอย่างเป็นทางการแล้วจำนวน 91 และ 26 ชนิด ตามลำดับ (ตาราง 1 และ 2)

ตาราง 1 แสดงชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema*

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	แหล่งอ้างอิง
<i>S. abbasi</i>	Elawad, 1997
<i>S. aciar</i>	Qiu <i>et al.</i> 2005
<i>S. affine</i>	Wouts <i>et al.</i> 1982
<i>S. akhursti</i>	Qiu <i>et al.</i> 2005
<i>S. anatoliense</i>	Hazir <i>et al.</i> 2003
<i>S. apuliae</i>	Triggiani <i>et al.</i> 2004
<i>S. arasbaranense</i>	Nikdel <i>et al.</i> 2011
<i>S. arenarium</i>	Nguyen and Smart, 1993
<i>S. ashiuense</i>	Phan <i>et al.</i> 2006
<i>S. asiaticum</i>	Anis <i>et al.</i> 2002
<i>S. austral</i>	Edgington <i>et al.</i> 2009
<i>S. backanense</i>	Cutler and Stock, 2003
<i>S. bedding</i>	Qiu <i>et al.</i> 2005
<i>S. bicornutum</i>	Tallosi <i>et al.</i> 1995
<i>S. boemarei</i>	Lee <i>et al.</i> 2009
<i>S. brazilense</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2010
<i>S. cameroonense</i>	Kanga <i>et al.</i> 2012
<i>S. caudatum</i>	Xu <i>et al.</i> 1991
<i>S. carpocapsae</i>	Belair, 1995
<i>S. changbaiense</i>	Ma <i>et al.</i> 2012
<i>S. cholashanense</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2007
<i>S. citrae</i>	Knoetze <i>et al.</i> 2011
<i>S. colombiense</i>	Phan <i>et al.</i> 2006
<i>S. costaricense</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2005
<i>S. cubanum</i>	Mracek <i>et al.</i> 1994

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	แหล่งอ้างอิง
<i>S. cumgarensis</i>	Phan <i>et al.</i> 2006
<i>S. diaprepesi</i>	Nguyen and Duncan, 2002
<i>S. eapokense</i>	Phan <i>et al.</i> 2006
<i>S. ethiopiense</i>	Tamiru <i>et al.</i> 2012
<i>S. everestense</i>	Khatri <i>et al.</i> 2011
<i>S. feltiae</i>	Wouts <i>et al.</i> 1982
<i>S. glaseri</i>	Steiner, 1929
<i>S. guangdongense</i>	Qiu <i>et al.</i> 2004
<i>S. hebeiense</i>	Chen, 2006
<i>S. hermaphroditum</i>	Stock <i>et al.</i> 2004
<i>S. ichnusae</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2007
<i>S. intermedium</i>	Poinar, 1985
<i>S. jollieti</i>	Spiridonov <i>et al.</i> 2004
<i>S. kari</i>	Waturu <i>et al.</i> 1997
<i>S. khoisanai</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2006
<i>S. kraussei</i>	Travassos, 1927
<i>S. kushidai</i>	Mamiya, 1988
<i>S. lamjungense</i>	Khatri-Chhetri <i>et al.</i> 2011
<i>S. leizhouense</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2006
<i>S. litorale</i>	Yoshida, 2004
<i>S. loci</i>	Phan <i>et al.</i> 2001
<i>S. longicaudum</i>	Shen and Wang, 1991
<i>S. minutum</i>	Maneesakorn <i>et al.</i> 2010
<i>S. meghalayensis</i>	Ganguly <i>et al.</i> 2011
<i>S. monticolum</i>	Stock <i>et al.</i> 1927
<i>S. neocurtillae</i>	Nguyen and Smart, 1992
<i>S. nepalense</i>	Khatri-Chhetri <i>et al.</i> 2011
<i>S. nyetense</i>	Kanga <i>et al.</i> 20012

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	แหล่งอ้างอิง
<i>S. oregonense</i>	Liu and Berry, 1996
<i>S. pui</i>	Qiu <i>et al.</i> 2011
<i>S. pakistanense</i>	Shahina <i>et al.</i> 2001
<i>S. puertoricense</i>	Roman and Figueroa, 1994
<i>S. pauntauvense</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2007
<i>S. rarum</i>	Mamiya, 1988
<i>S. riobrave</i>	Cabanillas <i>et al.</i> 1994
<i>S. ritteri</i>	Doucet and Doucet, 1990
<i>S. robustispiculum</i>	Phan <i>et al.</i> 2005
<i>S. sangi</i>	Phan <i>et al.</i> 2001
<i>S. sasonense</i>	Phan <i>et al.</i> 2006
<i>S. scapterisci</i>	Nguyen and Smart, 1990
<i>S. scarabaei</i>	Koppenhofer and Fuzy, 2003
<i>S. schliemanni</i>	Spiridonov <i>et al.</i> 2010
<i>S. serratum</i>	Lengyel <i>et al.</i> 2005
<i>S. siamkayai</i>	Stock <i>et al.</i> 1998
<i>S. sichuanense</i>	Qiu <i>et al.</i> 2005
<i>S. silvaticum</i>	Sturhan <i>et al.</i> 2005
<i>S. surkhetense</i>	Khatri-Chhetri <i>et al.</i> 2011
<i>S. tami</i>	Pham <i>et al.</i> 2000
<i>S. texanum</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2007
<i>S. teilingense</i>	Ma <i>et al.</i> 2012
<i>S. thanhi</i>	Phan <i>et al.</i> 2003
<i>S. thermophilum</i>	Ganguly and Singh, 2000
<i>S. tophus</i>	Cimen <i>et al.</i> 2014
<i>S. unicornum</i>	Edgington <i>et al.</i> 2009
<i>S. vulcanicum</i>	Clausi <i>et al.</i> 2011
<i>S. websteri</i>	Cutler and stock, 2003

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	แหล่งอ้างอิง
<i>S. weiseri</i>	Mracek <i>et al.</i> 2003
<i>S. xinbinense</i>	Ma <i>et al.</i> 2012
<i>S. xueshanense</i>	Mráček <i>et al.</i> 2009
<i>S. yirgalomense</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2005
<i>S. innovationi</i>	Cimen <i>et al.</i> 2014
<i>S. phyllophage</i>	Nguyen and Buss, 2011
<i>S. huense</i>	Phan <i>et al.</i> 2014
<i>S. sacchari</i>	Nthenga <i>et al.</i> 2014
<i>S. bifurcatum</i>	Shahina <i>et al.</i> 2014

ตาราง 2 แสดงชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis*

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	แหล่งอ้างอิง
<i>H. bacteriophora</i>	Poinar, 1976
<i>H. hambletoni</i>	Poinar, 1976
<i>H. heliothidis</i>	Poinar <i>et al.</i> 1977
<i>H. hoptha</i>	Poinar, 1979
<i>H. zealandica</i>	Poinar, 1990
<i>H. indica</i>	Poinar <i>et al.</i> 1992
<i>H. argentinensis</i>	Stock, 1993
<i>H. hawaiiensis</i>	Gardner <i>et al.</i> 1994
<i>H. hepialius</i>	Stock and Gardner, 1996
<i>H. marelatus</i>	Liu and Berry, 1996
<i>H. taysearae</i>	Shamseldean <i>et al.</i> 1996
<i>H. downesi</i>	Stock <i>et al.</i> 2002
<i>H. baujardi</i>	Phan <i>et al.</i> 2003
<i>H. mexicana</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2004
<i>H. amazonensis</i>	Andalo <i>et al.</i> 2006
<i>H. floridensis</i>	Nguyen <i>et al.</i> 2006
<i>H. safricana</i>	Malan <i>et al.</i> 2008
<i>H. brevicaudis</i>	Plichta <i>et al.</i> 2009
<i>H. georgiana</i>	Plichta <i>et al.</i> 2009
<i>H. gerrardi</i>	Plichta <i>et al.</i> 2009
<i>H. megidis</i>	Stock <i>et al.</i> 2009
<i>H. poinarii</i>	Stock <i>et al.</i> 2009
<i>H. sonorensis</i>	Stock <i>et al.</i> 2009
<i>H. atacamensis</i>	Edgington <i>et al.</i> 2011
<i>H. beicherriana</i>	Li <i>et al.</i> 2012
<i>H. noenieputensis</i>	Malan <i>et al.</i> 2014

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถจำแนกได้ยากมาก เนื่องจากทั้งสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีรูปร่างลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถทำได้ แต่มีความยุ่งยากเช่นเดียวกัน ในปัจจุบันนี้เทคนิคทางอณูวิทยา (Molecular technique) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการศึกษาและพัฒนามาใช้เพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุล มีรายงานการใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism หรือ RFLP) ในลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณของ Internal transcribed spacer (ITS) rDNA ของไรโบโซม ซึ่งเป็น noncoding gene วิธีนี้สามารถแยกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ได้ แต่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะจำนวนมาก (Nasmith *et al.* 1996) รวมถึงการศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA (Stock and Gress, 2006) สามารถใช้จำแนกระดับสกุลของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* และ *Heterorhabditis* แต่ไม่สามารถแยกได้ในระดับชนิด (species) เนื่องจากเป็นยีนที่มีความแปรผันต่ำ (Blaxter *et al.* 1998) อย่างไรก็ตามยังมีอีกหลายยีนที่ถูกนำมาศึกษาเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผันสูงของ Internal transcribed spacer (ITS) rDNA ของไรโบโซมซึ่งเป็น noncoding gene สามารถแยกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* ได้ (Hominick *et al.* 1997; Thanwisai *et al.* 2012) และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA เป็นยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI มากกว่ายีนอื่นๆ รวมทั้งสามารถแยกชนิดของไส้เดือนฝอย *Steinernema* ได้ (Stock *et al.* 2001; Nguyen *et al.* 2010; Thanwisai *et al.* 2012)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถพบได้ทั่วโลก ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา (Hominick *et al.* 1996, 2002) ซึ่งการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัย เช่น พฤติกรรมการปรับตัว อุณหภูมิ ความชื้นของดิน ลักษณะดิน ความชื้นสัมพัทธ์ แสงอาทิตย์ และรังสี เป็นต้น (Kaya, 1990; Smits, 1996)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมักจะอยู่ระหว่าง 25 ถึง 28 องศาเซลเซียส (Kaya, 1997; Molyneux, 1986) จากการศึกษาของ Kaya (1977) พบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส มีผลไปยังยั้งการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตัวอ่อนแมลงอาศัย ดังนั้นอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ความชื้นของดินเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Molyneux and Bedding, 1984; Kung *et al.* 1991; Koppenhofer *et al.* 1995; Grant and Villani, 2003) เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต้องการน้ำรอบๆ ตัวเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ในช่วงที่อยู่ในดิน (Wallace, 1958; Norton, 1978)

แสงแดดและรังสีอัลตราไวโอเล็ตก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากการศึกษาของ Gaugler และ Boush (1979) พบว่าไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในระยะติดต่อกับจะไวต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งที่ความยาวคลื่นนี้สามารถยับยั้งการสืบพันธุ์และการพัฒนาไปเป็นระยะต่างๆของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ แต่ไม่มีผลต่ออัตราการตายของไส้เดือนฝอยศัตรู

แมลงในระยะติดต่อกัน นอกจากนี้ยังมีผลในการลดอัตราการก่อโรคในหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) อย่างรวดเร็ว เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 7 นาที

แบคทีเรีย *Xenorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ถูกค้นพบครั้งแรกในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (entomopathogenic nematode) ในวงศ์ Steinernematidae (Gorge and Thomas, 1965) ถูกจำแนกและจัดให้อยู่ในสกุล *Achromobacter* วงศ์ Enterobacteriaceae โดยให้ชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Achromobacter nematophilus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 Gorge และ Thomas ได้ตั้งชื่อให้ใหม่เป็น *Xenorhabdus* เนื่องจากมีลักษณะที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Escherichia*, *Salmonella* และ *Klebsiella* คือ มีขนาดเซลล์ที่ใหญ่กว่า ไม่สามารถ reduce ไนเตรทให้เป็นไนโตรที่ได (Thomas and Gorge, 1979; Farmer *et al.* 1989) มีความใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและยังสามารถก่อโรคในแมลงได้อีกด้วย จึงทำให้มีการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* อย่างละเอียดมากขึ้น ในปัจจุบันได้มีรายงานพบชนิดของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* แล้วอย่างน้อย 24 ชนิด

Xenorhabdus จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae อยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างท่อน (rod-shaped) เซลล์มีขนาด 0.3 x 2-10 ไมโครเมตร มีแฟกเจลลาร์รอบเซลล์ (peritrichous flagella) เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 25 องศาเซลเซียส ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase และ catalase ไม่สร้าง indole methyl red Voges-Proskauer และ simmon citrate ให้ผลลบ และไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ รวมทั้งไม่สามารถย่อยสลายยูเรียได้ (Thomas and Gorge, 1979) แบคทีเรีย *Xenorhabdus* มี 2 ระยะเวลา คือระยะปฐมภูมิ (primary form) และระยะทุติยภูมิ (secondary form) ซึ่งทั้งสองระยะนี้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ต่างกัน (Akhurst and Boemare, 1988) คือ แบคทีเรียระยะปฐมภูมิ สามารถสร้าง antibiotics เช่น hydroxystilbene polyketides ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถย่อยสลายซากตัวอ่อนแมลงได้ (Bormare *et al.* 1993) และมี intracellular inclusion ที่เป็น crystalline protein ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียระยะทุติยภูมิ (Forst *et al.* 1997) แบคทีเรียในระยะปฐมภูมิสร้างสารที่ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และพัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสมบูรณ์ (Forst *et al.* 1997) เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Xenorhabdus* บนอาหาร nutrient bromothymol blue agar (NBTA) ที่มี triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ที่อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียระยะปฐมภูมิ สามารถดูดซึมสีน้ำเงินของ bromthymol blue (Akhurst and Bormore, 1990) ทำให้มีลักษณะโคโลนีสีน้ำเงินหรือน้ำตาลขอบไม่เรียบ มีลักษณะนูนโค้ง (convex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย (umbonate) และแผ่กว้าง (swarming) (Thanwisai, 2012)

ความหลากหลายของแบคทีเรีย *Xenorhabdus*

ปัจจุบันแบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีรายงานจากทั่วโลก จากหลายภูมิภาค มีรายงานอย่างเป็นทางการแล้ว 24 ชนิด (ตาราง 3)

ตาราง 3 แสดงชนิดของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus*

สกุล	ชนิด	แหล่งอ้างอิง
<i>Xenorhabdus</i>	<i>nematophila</i>	Thomas and Poinar, 1979
	<i>bovienii</i>	Akhurst and Boemare, 1988
	<i>poinarii</i>	Akhurst and Boemare, 1988
	<i>beddingii</i>	Akhurst and Boemare, 1988
	<i>japonica</i>	Nishimura <i>et al.</i> 1994
	<i>budapestensis</i>	Lengyel <i>et al.</i> 2005
	<i>ehlersii</i>	Lengyel <i>et al.</i> 2005
	<i>innexi</i>	Lengyel <i>et al.</i> 2005
	<i>szentirmaii</i>	Lengyel <i>et al.</i> 2005
	<i>cabanillasii</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2006
	<i>doucetiae</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2006
	<i>griffiniae</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2006
	<i>hominickii</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2006
	<i>koppenhoeferi</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2006
	<i>mauleonii</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2006
	<i>miraniensis</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2006
	<i>romanii</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2006
	<i>stockiae</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2006
	<i>indica</i>	Somvanshi <i>et al.</i> 2006
	<i>vietnamensis</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2010
<i>magdalenensis</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2012	
<i>ishibashii</i>	Kuwata <i>et al.</i> 2013	
<i>khoisanae</i>	Ferreira <i>et al.</i> 2013	

แบคทีเรีย *Photorhabdus*

ในปี ค.ศ. 1976 Poinar สามารถแยกแบคทีเรียได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis bacteriophora* และได้ให้ชื่อแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Xenorhabdus luminescens* (Thomas and Poinar, 1979) ต่อมาพบว่าแบคทีเรีย *X. luminescens* นี้มีคุณสมบัติเป็น bioluminescence และมีผล catalase เป็นบวก ซึ่งแตกต่างไปจาก *Xenorhabdus* ชนิดอื่นๆ และยังพบว่า *X. luminescens* สามารถเกิดขึ้น lateral transfer ได้ จึงทำให้ *X. luminescens* ถูกแยกออกมาและจัดให้อยู่ในสกุลใหม่ที่ชื่อว่า *Photorhabdus* และตั้งชื่อให้เป็น *Photorhabdus luminescens* (Boemare et al. 1993) จากนั้นแบคทีเรีย *Photorhabdus* ได้ถูกค้นพบเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ (Fischer-Le Saux et al. 1999) โดยปัจจุบันมีรายงานอย่างเป็นทางการแล้วอย่างน้อย 5 ชนิด และอีกหลาย subspecies จากทั่วโลก โดยเฉพาะการค้นพบ *Photorhabdus asymbiotica* จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางผิวหนัง ซึ่ง *P. asymbiotica* เป็นเพียงชนิดเดียวที่สามารถก่อโรคในคนได้ (Wilkinson et al. 2009)

แบคทีเรีย *Photorhabdus* จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีความสัมพันธ์กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในวงศ์ Heterorhabditidae (Forst et al. 1997) มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีแฟกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ มีขนาด 0.5-2 x 2-10 ไมโครเมตร แบคทีเรีย *Photorhabdus* ทุกชนิดให้ผลบวกกับ catalase ไม่รีดิวซ์ nitrate ในขณะที่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase และ catalase แบคทีเรีย *Photorhabdus* มี 2 ระยะ คือ ระยะปฐมภูมิ (primary form) และระยะทุติยภูมิ (secondary form) แบคทีเรีย *P. luminescens* ต่างจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* คือ *P. luminescens* ในระยะปฐมภูมิสามารถสร้างสารเรืองแสง (luminescent) (Leisman et al. 1995) และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Photorhabdus* บนอาหาร Nutrient bromothymol blue agar (NBTA) ที่มี triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ที่อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Photorhabdus* มีสีเขียวขอบเรียบ โคโลนีโค้งนูน หรือนูนตรงกลางของโคโลนีเล็กน้อย (umbonate) (Thanwisai, 2012)

ความหลากหลายของแบคทีเรีย *Photorhabdus*

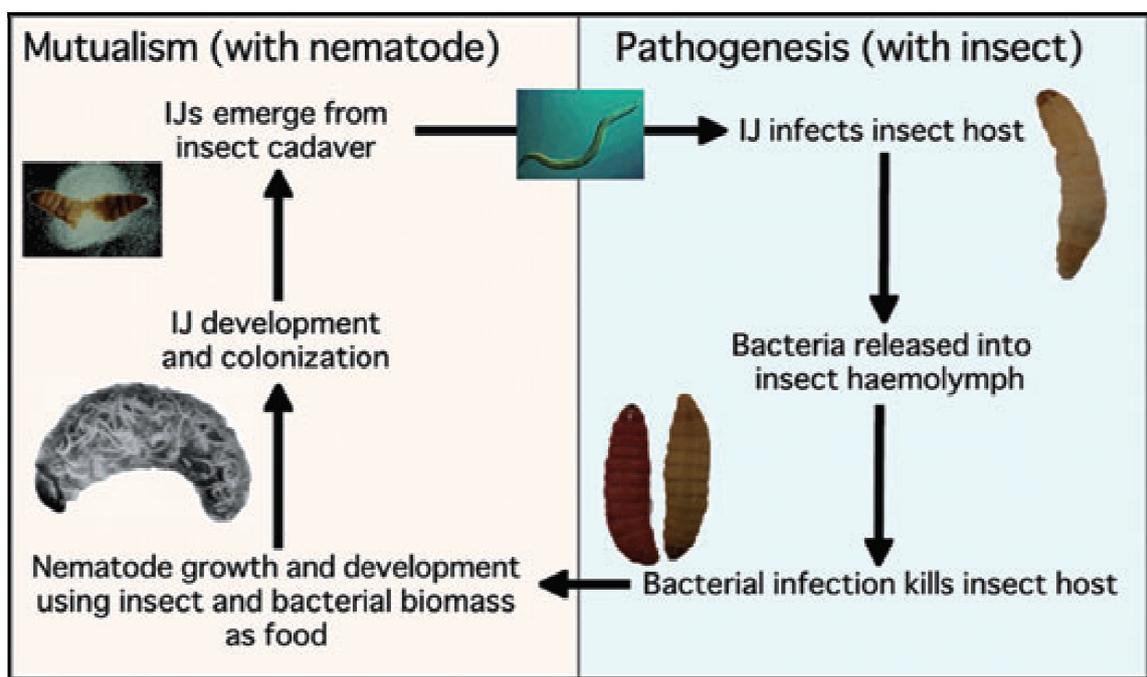
ปัจจุบันแบคทีเรีย *Photorhabdus* มีรายงานจากหลายประเทศทั่วโลก จากหลายภูมิภาคศาสตร์ พบรายงานอย่างเป็นทางการแล้ว 5 ชนิด นอกจากนี้ยังแบ่งออกเป็นอีกหลาย subspecies (ตาราง 4)

ตาราง 4 แสดงชนิดของแบคทีเรียสกุล *Photorhabdus*

สกุล	ชนิด	แหล่งอ้างอิง
<i>Photorhabdus</i>	<i>luminescens</i>	Thomas and Poinar, 1979
	<i>luminescens</i> subsp. <i>luminescens</i>	Thomas and Poinar, 1979
	<i>luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> 1999
	<i>luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> 1999
	<i>luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	Hazir <i>et al.</i> 2004
	<i>luminescens</i> subsp. <i>thracensis</i>	Hazir <i>et al.</i> 2004
	<i>luminescens</i> subsp. <i>caribbeanensis</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2010
	<i>luminescens</i> subsp. <i>hainanensis</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2010
	<i>luminescens</i> subsp. <i>kleinii</i>	An and Grewal, 2011
	<i>luminescens</i> subsp. <i>noenieputensis</i>	Ferreira <i>et al.</i> 2013
	<i>asymbiotica</i>	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> 1999
	<i>asymbiotica</i> subsp. <i>asymbiotica</i>	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> 1999
	<i>asymbiotica</i> subsp. <i>australis</i>	Akhurst <i>et al.</i> 2004
	<i>temperate</i>	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> 1999
	<i>temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	Fischer-Le Saux <i>et al.</i> 1999
	<i>temperata</i> subsp. <i>thracensis</i>	Hazir <i>et al.</i> 2004
	<i>temperata</i> subsp. <i>cinerea</i>	Tóth and Lakatos, 2008
	<i>temperata</i> subsp. <i>khanii</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2010
	<i>temperata</i> subsp. <i>tasmaniensis</i>	Tailliez <i>et al.</i> 2010
	<i>temperata</i> subsp. <i>stackebrandtii</i>	An and Grewal, 2011
	<i>heterorhabditis</i>	Ferreira <i>et al.</i> 2014a
	<i>zealandica</i>	Ferreira <i>et al.</i> 2014b

วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Photorhabdus* และ *Xenorhabdus*

วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Photorhabdus* และ *Xenorhabdus* คล้ายกันมาก (ภาพ 4) แบ่งเป็น 2 ระยะ คือระยะที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (mutualism stage) และระยะที่อาศัยอยู่ในซากหนอนที่ตายแล้ว (pathogenic stage) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลอาศัยอยู่ในลำไส้ (foregut) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) โดยที่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* อาศัยอยู่ในถุงเล็กๆ (vesicle) ของลำไส้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* (Adams *et al.* 2008) สำหรับแบคทีเรีย *Photorhabdus* อาศัยอยู่ทั่วทั้งลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* (Ciche and Ensign, 2003; Adams *et al.* 2008) แบคทีเรียเข้าสู่ระบบเลือด (hemolymph) ของแมลงโดยอาศัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะที่ 3 (infective stage) เป็นตัวพาเข้าไปในตัวหนอนแมลงอาศัย โดยการไชเข้าทางรูเปิดธรรมชาติต่างๆ ของตัวหนอนแมลง เช่น ปาก ทวารหนัก และรูหายใจ (spiracles) หรือบางครั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* สามารถเข้าสู่ระบบเลือดของแมลงโดยการไชผ่านผิวหนังของแมลง (Wang and Gaugler, 1998; Adams *et al.* 2008) เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าสู่ระบบเลือดของแมลง ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพิ่มจำนวนและปล่อยแบคทีเรียเข้าสู่ระบบเลือดของแมลง โดยที่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ถูกปล่อยออกมาจากการถ่ายอุจจาระ (defecation) จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Martens *et al.* 2003) ในขณะที่แบคทีเรีย *Photorhabdus* ถูกปล่อยออกมาทางปาก (Ciche and Ensign, 2003) แบคทีเรียแบ่งตัวเพิ่มจำนวน มีการผลิตและปล่อยสารพิษ (toxin) และเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกเซลล์ (exoenzyme) มีผลทำให้แมลงเกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ส่งผลให้แมลงตายได้ภายใน 48 ชั่วโมง และเกิดการเปลี่ยนแปลงสารทางกระบวนการชีวภาพ (bioconversion) ในซากแมลง (Forst and Clarke, 2002) เมื่อมีการติดเชื้อของแมลง แบคทีเรีย *Photorhabdus* เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในระบบเลือด ทำลายระบบภูมิคุ้มกันและลำไส้ปล่อยสารพิษ (toxin) และ metalloprotease เพื่อทำลายเนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ (midgut epithelium) และทำให้เกิด bioconversion ในเนื้อเยื่อได้ง่ายขึ้น (Silva *et al.* 2002) ส่วนแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ทำลายเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) โดยการปล่อยสารจำพวก endotoxin เช่น lipopolysaccharide (LPS) ที่อยู่ส่วน outer membrane (Brillard *et al.* 2001; Dunphy and Thurston, 1990) และเมื่อแมลงอาศัยตายมีลักษณะเฉพาะคือ ไม่น่าและผิวหนังของแมลงยังคงเหนียวไม่ฉีกขาด มีลักษณะแข็งมีสีดำน้ำหรือแดง (Emelianoff *et al.* 2008) เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล สร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราอื่นๆ (Akhurst, 1982) ในขณะเดียวกันไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้รับประโยชน์จากการอยู่ร่วมกันกับแบคทีเรียคือ การได้กินแบคทีเรีย และซากของแมลงเป็นอาหารทำให้ไส้เดือนฝอยมีการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนต่อไปได้



ภาพ 4 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Photorhabdus* และ *Xenorhabdus* ที่มา: Goodrich and Clarke, 2007

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่หลากหลายจึงไม่สามารถนำมาจำแนกแยกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองออกจากกันได้ โดยส่วนใหญ่ให้ผลลบกับการทดสอบทางชีวเคมีดังตาราง 3 (Thanwisai, 2012) แบคทีเรียทั้ง 2 สกกุลเป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถเคลื่อนที่โดยใช้แสร์รอบตัว (peritrichous flagella) ไม่ผลิต nitrate เพราะไม่มีการรีดิวซ์ nitrate และไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์เหมือนกัน แต่มีบางการทดสอบ เช่น การทดสอบ catalase ที่สามารถแยกได้ระหว่างแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยแบคทีเรีย *Photorhabdus* ให้ผลบวก ส่วนแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ให้ผลลบ รวมทั้งแบคทีเรีย *Photorhabdus* มีการสร้าง bioluminescence แต่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ไม่สร้าง (Boemare and Akhurst, 1988)

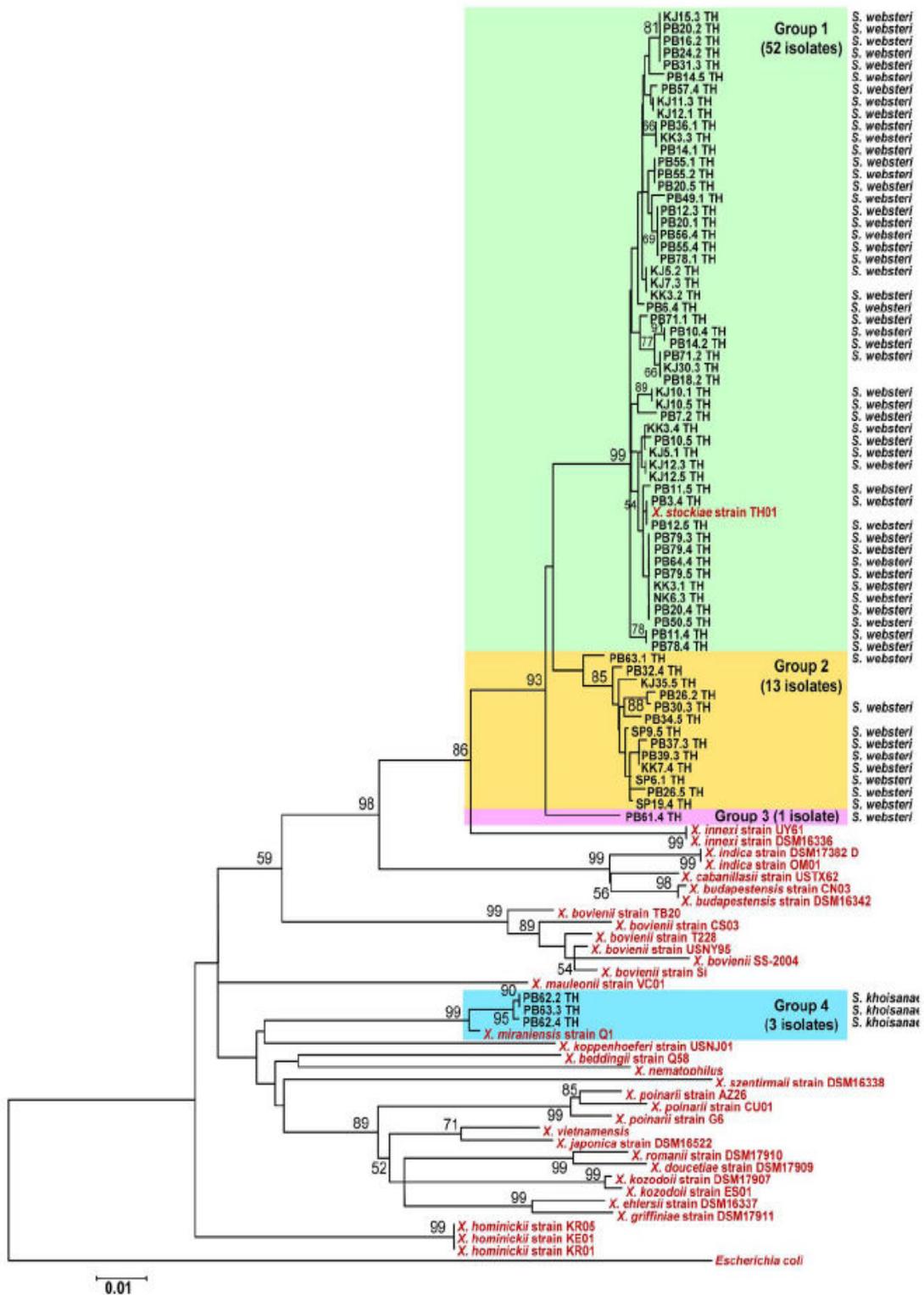
DNA-DNA hybridization เป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่มีเบสจับกันอย่างจำเพาะ (complementary) และตรวจสอบการเกิด hybridization ด้วยการติดตามจาก probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และชนิดของสิ่งมีชีวิต สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *X. nematophilus* กับ *X. luminescens* แล้วจำแนกแบคทีเรีย *X. luminescens* เป็น *P. luminescens* (Boemare et al. 1993) นอกจากนี้เมื่อใช้ nucleic acid probes โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA บริเวณตำแหน่งที่ 455-480 สามารถจำแนกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ *X. nematophila*, *X. bovienii*, *X. poinarii*, *X. beddingii* และ *X. luminescens* (Putz et al. 1990)

จากรายงานการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยใช้เทคนิค ribotyping ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (endonucleases) บริเวณ 16S rDNA ด้วยวิธีrestriction fragment length polymorphism (RFLP) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต้องใช้เอนไซม์มากถึง 4 ชนิด ได้แก่ *CfoI*, *Hinfi*, *MspI*, และ *AluI* หรือ *HaeIII* หรือ *DdeI* ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมากถึง 3 ชนิด ได้แก่ *CfoI*, *AluI* และ *HaeIII* และเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองสกุล (Brunel *et al.* 1997) ต้องใช้อีก 3 เอนไซม์ ได้แก่ *CfoI*, *AluI* และ *Hinfi* หรือ *DdeI* หรือ *HaeIII* หรือ *MspI* เนื่องจากการนำเทคนิค RFLP มาใช้ในการจำแนกชนิดต้องใช้เอนไซม์จำนวนมาก จึงไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังไม่สามารถจำแนกได้ทุกชนิด (Lengyel *et al.* 2005; Brunel *et al.* 1997; Fischer-Le Saux, *et al.* 1998)

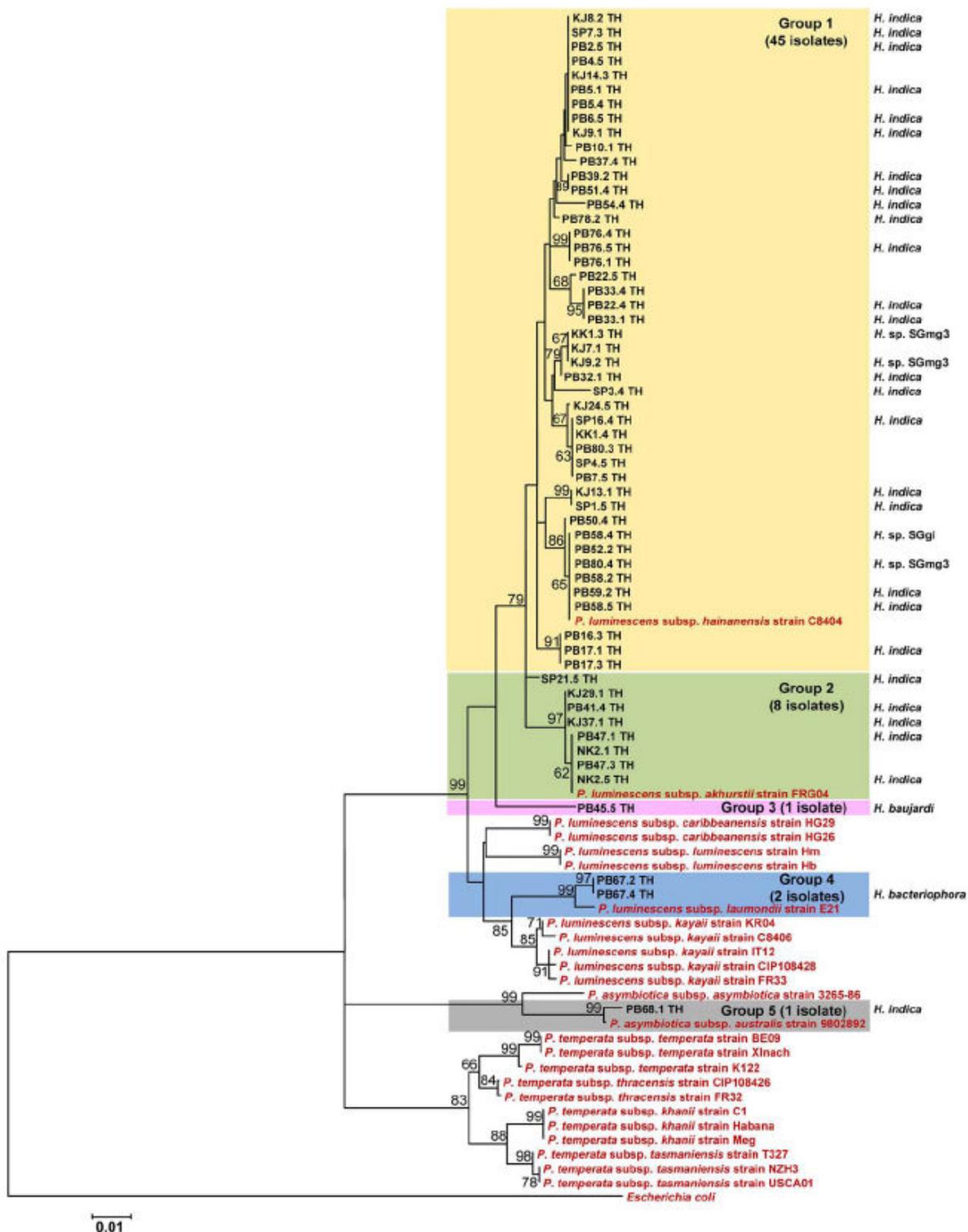
DNA sequencing เป็นวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ที่นิยมนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์คือยีนที่มีการแสดงออกในทุกเซลล์หรือทุกเนื้อเยื่อ และระดับการแสดงออกของยีนต้องคงที่หรือมีความผันแปรน้อย (housekeeping genes) ได้แก่ 16S rRNA, *asd*, *ompR*, *recA*, และ *sarC* (Sergeant *et al.* 2006) ในปี ค.ศ. 1999 Fischer-Le Saux และคณะ ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เพื่อแยกความแตกต่างของ *P. luminescens*, *P. temperata* และ *P. asymbiotica* พบว่าไม่สามารถแยก *P. luminescens* subsp. *luminescens* และกลุ่มของ *P. asymbiotica* แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับชนิด และระดับ subspecies ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ได้ (Akhurst *et al.* 2004) ต่อมาจากรายงานว่ายีน *recA* และ *dnaN* สามารถใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ได้ดีกว่าการใช้ยีน *gyrB*, *rplB* และ *gltX* และ concatenated ของทั้ง 4 ยีนคือ *recA*, *gyrB*, *dnaN* และ *gltX* อีกทั้งพบว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองสกุลได้ดีที่สุด เนื่องจาก 16S rRNA และ *rplB* ไม่เหมาะสมในการจำแนกถึงระดับชนิด เพราะเป็นยีนที่มีความแปรผันต่ำ (conserved gene) ส่วน *gyrB*, *rplB* และ *gltX* ไม่สามารถแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ได้ทุกชนิด ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Thanwisai และคณะ ได้ใช้ยีน *recA* ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่พบในประเทศไทยได้ทุกชนิด และได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลที่พบในประเทศไทยได้และจากประเทศอื่นทั่วโลก ดังภาพ 5-6 ดังนั้นการศึกษาคั้งนี้จึงเลือกยีน *recA* มาใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองสกุล

ความหลากหลายของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในประเทศไทย

ปัจจุบันมีรายงานการพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 24 ชนิดและแบคทีเรีย *Photorhabdus* 5 ชนิดจากหลายประเทศทั่วโลก (ตาราง 3 และ 4) สำหรับประเทศไทยยังมีการศึกษาอยู่น้อย มีรายงานพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* เพียง 2 ชนิด ได้แก่ *X. stockiae* และ *X. miraniensis* (Taillez *et al.* 2006; Thanwisai *et al.* 2012) และ *Photorhabdus* เพียง 2 ชนิด (4 subspecies) ได้แก่ *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, *P. luminescens* subsp. *hainanensis*, *P. luminescens* subsp. *laumondii* และ *P. asymbiotica* subsp. *australis* (Maneesakorn *et al.* 2011; Thanwisai *et al.* 2012)



ภาพ 5 แสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* ที่มา: Thanwisai et al.



ภาพ 6 แสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* ที่มา: Thanwisai *et al.*

บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*

เตรียมอาหารเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) เพื่อใช้ในการล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยนำกล่องพลาสติกที่มีรูระบายอากาศ ใส่แป้งข้าวเจ้า 200 กรัม น้ำผึ้ง 100 มิลลิลิตร กลีเซอรอล 100 มิลลิลิตร และผงยีสต์ 50 กรัม ผสมให้เข้ากัน นำไข่ของหนอนกินรังผึ้งประมาณ 200-300 ฟอง วางลงบนอาหารที่เตรียมไว้ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ จะได้ตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้งเพื่อใช้ในการทดลอง (ภาพ 7) ในขั้นตอนการล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินต่อไป

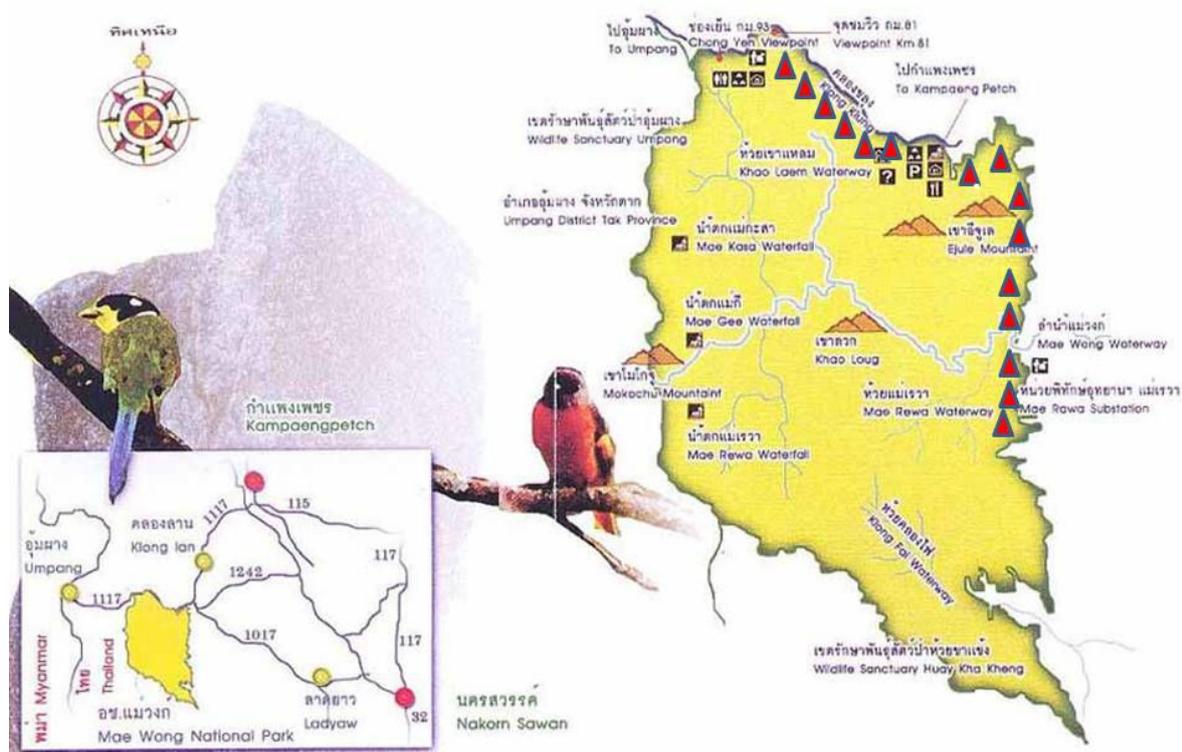


ภาพ 7 การเตรียมอาหารเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง

การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยเก็บอย่างน้อย 100 จุด แต่ละจุดเก็บดิน 5 จุดย่อย แต่ละจุดย่อยห่างกันประมาณ 10 ตารางเมตร ดังนั้นจะทำการเก็บดินรวมทั้งหมดอย่างน้อยเป็น 500 จุดย่อย จะเก็บโดยขุดดินลึกจากผิวดินประมาณ 10 เซนติเมตร แต่ละจุดจะเก็บดินประมาณ 500 กรัมแล้วเก็บในถุงพลาสติกเพื่อป้องกันไม่ให้ดินสูญเสียความชุ่มชื้น ทำการจดบันทึกตำแหน่งที่เก็บดิน เช่น Longitude, Latitude และ Altitude และบันทึกปัจจัยกายภาพของดิน เช่น อุณหภูมิ (Temperature) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความชื้น (Moisture) รวมทั้งถ่ายรูปบันทึกภาพแต่ละตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดิน ตำแหน่งที่เก็บ

ตัวอย่างดินโดยสังเขปดังภาพ 8 รวมทั้งบันทึกภาพแต่ละตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดิน แล้วนำตัวอย่างดินที่เก็บได้มาทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร



ภาพ 8 แสดงแผนที่ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์และตำแหน่งที่จะเก็บตัวอย่างดิน (▲)

แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินด้วยวิธี Baiting technique

แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินโดยใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นเหยื่อล่อ (Baiting) โดยเทดินใส่กล่อง จากนั้นวางหนอนกินรังผึ้ง 5 ตัวบนผิวดิน ปิดฝากล่อง แล้ววางกล่องแบบกลับหัว เพื่อให้หนอนกินรังผึ้งมุดเข้าไปในดิน เป็นการเพิ่มโอกาสให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ไชเข้าหนอนกินรังผึ้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน (ภาพ 9) หลังจากนั้นทำการเก็บซากหนอนกินรังผึ้ง (Beding and Akhurst, 1975)



ภาพ 9 การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินโดยใช้หนอนกิ้งกิ้งเป็นเหยื่อล่อ (Baiting technique)

แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากหนอนกิ้งกิ้งด้วยวิธี White trap

แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากหนอนกิ้งกิ้ง โดยใช้วิธี White trap (White, 1927) นำซากหนอนกิ้งกิ้งใส่ลงในกระดาษกรองเปียก จากการแช่น้ำกลั่นบน Petri dish บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 วัน ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระยะติดต่อ (Infective juvenile) จะออกมาจากซากหนอนกิ้งกิ้งและลงไปใต้น้ำกลั่น ทำการตรวจดูไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป จากนั้นทำการล้างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยน้ำกลั่น แล้วเก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะติดต่อในตู้เย็นอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดขั้นต่อไป



ภาพ 10 แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากหนอนกิ้งกิ้ง ด้วยวิธี White trap

การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

นำซากหนอนกินรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 100% รอให้แห้ง จากนั้นใช้ปากคีบปลายแหลมฉีกตัวหนอนบริเวณปล้องที่สามแล้วใช้ sterile loop ตัดบริเวณที่เป็นน้ำเลือด (Hemolymph) นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA) ปิดฝาอาหารด้วยการพันพาราฟิล์มแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา ประมาณ 3-4 วันสังเกตลักษณะโคโลนีที่มีสีเขียวหรือสีน้ำเงิน

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีอณูชีววิทยา

การสกัดดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

บดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วย pipette tip ขนาด 1000 ไมโครลิตรใน ATL buffer (Qiagen, Germany) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแตกด้วยการแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ Proteinase K ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์ทำลายโปรตีน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ Proteinase K นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลล์และโปรตีนทิ้งไป ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นปริมาตร 5 โมลาร์ ปริมาตร 6.5 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Aljanabi and Martinez, 1997) ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง รอให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile distilled water) ปริมาตร 12 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 28S ด้วยไพรเมอร์ 539_F และ 535_R ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาด 870 คู่เบส (Stock *et al.* 2001) (ตาราง 5 และภาพ 11) และจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยไพรเมอร์ TW81_F และ AB28_R ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาด 800-850 คู่เบส (Hominick *et al.* 1997) (ตาราง 5 และภาพ 12)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1.4 ไมโครลิตร dNTPs (ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร *Tag* DNA polymerase (Sigma, USA) (ความเข้มข้น 100 ยูนิต) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละเส้น (BioDesign Co., Ltd., Thailand) (ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 10 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems; Life Technologies,

Carlsbad, California) ปฏิบัติการสำหรับยีน 28S rDNA มีดังนี้ Initial denaturing ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และ Final Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และสำหรับยีน internal transcribed spacer (ITS) มีดังนี้ Initial denaturing ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ และ Final Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอากาโรสเจล (Agarose gel) 1.2% ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE buffer เป็นเวลา 37 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอซีดีเอ็มโบรไมด์ ตรวจสอบดูภายใต้เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, France) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan) เป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมบันทึกภาพ

539_F Primer

TAGGATTTCTTAGTAAC**TGCGAGTG**AAAAGGAAAAAGCTCAGCGTCGAAACCAAGTTGGCTAACGTTGA
 CTTGGTGTGTGACGTATAGAGGCGTTCATGTGCGGTTGTTGATAATGCGAATTTCCCTTGGACTAGGGA
 TCCAAAGAGGGTGC TAGACCCTTACGCATTGTTGACTTTTCGTACGCGTTCGTTCTTTGGAGTAGGGTTG
 TTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATACCTTCATCTAAAGCTAAATACGACTACGAAATCCGATAGCA
 AACAAAGTACCGTGAGGGAAAAGTTGCAAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGG
 GTGGAAGCAGATAAAGTTGACGAACGTGTGTGCTATT CAGAACTACAATTTGTGGTTTGT TTTTACGATC
 GATGTGGGCTGGCGTCTTTGGTTAACCTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCGCGGAGGGATACTCGGT
 TGTCGTGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTGCTGGTTTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTTTG
 AAACACGGACCAAGGAGTGTACCGCTTACGC GAGTCTTAGAGTGTGTCAAAACTTTGAGGCGTAACGAAA
 GTAAATGTGGATTTATTCAC T GACTTGGGATACGTTGCTTTTTTTGGATAGCGTTGGACCATGGTTTAT
 CGTAATCGCTTGGGATGCGGTGAAAA TAGAGCGTAAGCGGTGCGACCCGAAAGATGGTGAACCTATGCCTG
 AGCAGGATGAAGCCGGAGGAAACTCTGGTGAAGTCCGAAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGA
535_R Primer
 CTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCA

ภาพ 11 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ 539_F และ 535_R จับบริเวณยีน 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* (accession number AY841762.1)

```

GTACACACCGCCCGTCGCTGTCCGGGACTGAGCTGTTTCGAGAAGAGTGGAGACTGCTGTATCGGGGCTT
18S rRNA
TCGGGCTCTGGTATGATGGAAACCATTTTAATCGCAAATGGCTTGAACCGGGCAAAGTCGTAACAAGGTA
TW81_F Primer
TCTGTAGGTGAACCTGCAGATGGATCATCGCTGAAAACTTATGGTTATGCTTTGGTCACGAGAGATCGG
TGCTACCGGAATCAGGCTTGCTCCTCGATTTTGATCGGTATCTCACCCCATCTAAGCTCTCGGAGAGGT
GTCTAATCCCAATCGGAGTCGCTTTGAGTGA CGGCAA TGAGGATTGGGTGTGCCATACCCCATACGTGGG
Internal Transcribed Spacer I
GTAGAGCATAGACGTTAGGAACAGTACTCGGACTGTCGCCTACCAACCGTCGATAACTGGTGGCTATGA
GTGACTTCGGTCACTCGAGATCTGCTATGCAGAGAGTCTCAATGAGTTGTGTTCTGCCAACCGCCGGTGT
CGATAGAAATTTTTTCCTATTAACCTGTTTCCTGATTCTGTTAATACATTTTGGCACAA TGTATTAGCT
TCAGCGATGGATCGGTTGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCAAGCTGCGTTATTTAC CACGAA TTGC
5.8S rRNA
AGACGCTTAGAGTGGTGAAGTTTGAACGCACAGCGCCGTTGGGTTTTC CCTTCGGCACGTCTGGCTCAG
GGTTGTATATAGAGTACTGCGGTGTTGCTCCGAGAGTAGCAATGTCGAGTGTGGAACGGCGTTAGTGTTG
Internal Transcribed Spacer II
GTTACTGGCCCCGTCTAGTCCGAA TATTGGCAACATGTCATCACGTGTTCTGACGACGCCGTAGAGA
GTATAGGTCTGTACCTGTGGATGTGTAGCGTATGAAA TATGATGCTTCC CATA CATAGCGAGGAGGTGCC
AB28_R Primer
TCTTATACGTATCTTGCTTATGCAACCTGAGCTCAGTCTGAT TACCCGCCGAACTTAAGCATATCATTC
28S rRNA
AGCGGAGGAAAAGAACTA ACTAGG

```

ภาพ 12 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ TW81_F และ AB28_R จับบริเวณยีน ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. megidis* (accession number AY321408.1)

ตาราง 5 แสดงคู่ไพรเมอร์สำหรับยีน 28S rDNA ยีน ITS และยีน *recA*

ยีน เป้าหมาย	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ความยาว ผลผลิตพีซีอาร์	เอกสารอ้างอิง
28S rDNA	539_F	GGATTTCCCTTAGTAACTGCGAGTG	870 คู่เบส	Stock <i>et al.</i> 2001
	535_R	TAGTCTTTTCGCCCTATAC		
ITS	TW81_F	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC	1000-1100 คู่เบส	Hominick <i>et al.</i> 1997
	AB28_R	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT		
<i>recA</i>	recA_F	GCTATTGATGAAAATAAACA	890 คู่เบส	Taillez <i>et al.</i> 2009
	recA_R	RATTTTRTCWCCRTTRTAGCT		

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคอนุชีวิวิทยา

การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

นำโคลนเดี่ยวของแต่ละไอโซเลตที่ได้จากการแยกแบคทีเรียบนอาหาร NBTA มาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured cell) (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) โดยเติม GT buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วใช้ไปเปิด ดูดขึ้นและลงเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำ 10 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตรของ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมน้ำ 10 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตรของ RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมด้วยเครื่อง Vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นเติมน้ำแอลกอฮอล์ 100% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมด้วยเครื่อง Vortex ย้ายตัวอย่างใส่ใน GD column ที่อยู่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง จากนั้นเติมน้ำ W1 wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง จากนั้นเติมน้ำ Wash buffer (ที่เติม 75% ethanol แล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นย้าย GD column ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube อันใหม่ แล้วเติมน้ำ Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อชะดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอกาโรสเจล 0.8 % ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE buffer เป็นเวลา 37 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, France) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan) เป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมทำการบันทึกภาพและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *recA* โดยใช้ไพรเมอร์ *recA_F* และ *recA_R* (Tailliez *et al.* 2009) ผลผลิต PCR ที่ได้ของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลนี้จะมีขนาด 890 คู่เบส (ตาราง 5 ภาพ 13 และ ภาพ 14)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 1.4 ไมโครลิตร dNTPs (ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร *Tag* DNA polymerase (Sigma, USA) (ความเข้มข้น 100 ยูนิต) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละเส้น (BioDesign Co., Ltd., Thailand) (ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 10 ไมโครลิตร

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems; Life Technologies, Carlsbad, California)

ปฏิกิริยาสำหรับยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีดังนี้ Initial denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และปฏิกิริยาสำหรับยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* มีดังนี้ Initial denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอกาโรสเจล (Agarose gel) 1.2% ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE buffer เป็นเวลา 37 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, France) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan) เป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมบันทึกภาพ

การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

นำผลผลิตพีซีอาร์ทั้งของใส่เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) เติม Gel/PCR Buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใน PCR product ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นย้ายสารละลายใส่ใน DFH column ที่อยู่ใน collection tube ขนาด 2 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง แล้วเติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลานาน 3 นาที จากนั้นย้าย DFH column มาใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube อันใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอกาโรสเจล 1.2 % ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE buffer แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, France) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan) เป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมทำการบันทึกภาพ

recA1_F primer binding site
Position 18

ACGAGGGAGTAAAAATG**CTATTGATGAAAATAAACA**AAAAAGCACTAGCAGCGGCACTCGGCCAAATTGA

AAAACAGTTTGGTAAAGGTTCCATCATGCGTTTGGGCGAAGACCGTTCAATGGACGTTGAAACTATCTCC

ACGGGTTCAATTATCACITGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGTCTGCCGATGGGGCGTATTGTTGAAATCT

ATGGCCCGGAATCTTCGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATTGCTGCGGCACAACGTGAAGGTAA

AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCCATCTATGCTAAGAAGTTGGGTGTTGATATT

GATAACTGTGTGTTCTCAACCCGATACGGGGGAACAGGCTCTTGAGATCTGTGATGCGTTGACTCGCT

CCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGACTCCGTTGCCGCTTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGAGA

AATTGGTGATTCTCATATGGGGCTGGCCGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAAACTGGCCGGTAA

TTGAAAAGTTCTAATACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATTCGTATGAAAATTGGTGTGATGTTGGTA

ACCCTGAAACTACCACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTGCTCTGGATATTCGCCGCAT

TGGTCTGTGAAAAATGGTGAAGAGGTCGTTGGTAGCGAGACCCGTGTTAAGGTGGTAAAAACAAGTG

GCAGCGCCATTTAAGCAAGCAGAATTCCAGATTATGTATGGTGAAGGCATTAACACTTATGGTGAATTAA

recA2_R primer binding site
Position 891

TCGATTTAGGTGTGAAGCATAAACTGGTGGAAAAAGCAGGCGCATGGTAC**AGCTATAATGGCGATAAAAT**

TGGTCAAGGCAAAGCGAATGCTACCATCTATCTGAAAGAGCATCTGAAGTTGCTACTGAGCTGGATAAA

AAATTACGTGAAATGCTGTTGCACAATGCCGGCGAATTC AATAGTGCTGCTTCTGATTATGAAGACAATG

AAAATGAAGAGATGAATAACGAAGAATTCTAA

ภาพ 13 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *X. bovienii* SS-2004 (Accession number: NC_013892.1) สีเหลืองแสดงบริเวณยีน *recA* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส

recA1_F primer binding site
Position 4
 ATG **GCTAACGATGAAAACAAACA** AAAAGCACTAGCAGCGGGCGCTGGGTCAAATTGAAAACAATTGGTA

AAGTTTCTATCATGCGTCTGGGCGAAAACCGCTCAATGGATGTTGAAACTATCTCTACTGGCTCCCTCTC

ACTGGATATAGCTTTAGGTGCGGGTGGTTTGCCAAATGGGTCGTATTGTTGAAATATACGGGCCTGAACTC

TCCGGTAAAACAACATTGACACTGCAAGTTATTGCTTCTGCCAGCGTGAAGGC AAAACCTGTGCTTTTA

TTGATGCCGAACATGCCCTTGATCCGGTTTATGCCAAAAGTTGGGCGTAGATATTGATAATCTGCTGTG

CTCCCAGCCTGATACCGGTGAACAGGCACCTGGAAATCTGTGATGCCTTGTACGCTCTGGGGCAGTTGAC

GTCATCGTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTAACCCCGAAAGCGGAAATCGAAGGTGAGATCGGGCATTCCC

ATATGGGATTGGCTGCTCGTATGATGAGTCAGGCAATGCGTAAAGTTGGCAGGTAACTGAAAACTCGAA

TACTCTGCTAATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTGATGTTTGTAACCCAGAAACCACA

ACGGGTGGTAACGCACTGAAATTCTATGCATCTGTCCGTTTGGATATCCGCCGCACTGGTTCCGTAAAAA

ATGGCGATGAAGTTGTTGGCAGTGAGACTCGTGTGAAAGTAGTCAAGAACAAAATTGCGGCACCATTCAA

ACAAGCTGAATTCAGATTTTGTATGGTGAAGGCATTAACACCTTTGGCGAATTGGTCGACTTGGGCGTT

recA2_R primer binding site
Position 876
 AAACACAAAATGGTCGAAAAAGCAGGTGCATGGTAC **AGCTATAACGGGGATAAGATCG** GGCAGGGTAAAG

CTAATGCTACTATTTACCTGAAAAGAGCACCCAGAAATCTCTGCTGAGCTGGATAAAAACTGCGTGAATT

ACTGTTAAATAATGCAGGTGGATTCAATAGTGCAGTCTCTGATTATGAAGCTGATTATGAAGACAACGGT

GAAGAAGTGA AAAATGAAGAGTTTAA

ภาพ 14 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 (Accession number NC_005126.1) สีเหลืองแสดงตำแหน่งของยีน *recA* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี (<http://macrogen.com>) โดยใช้ไพรเมอร์เช่นเดียวกับการทำ PCR

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของ Chromatograms และลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม SeqManII (DNASTAR inc., Wisconsin, USA) จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

ศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ

ดาวนโหลดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* และ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* ดาวนโหลดลำดับเบสบริเวณยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในฐานข้อมูล NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม Clustal W (Thompson *et al.* 1994) และศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Maximum likelihood ด้วยวิธี Tamura-nei model กำหนดค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA version 6 (Tamura *et al.* 2013)

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม STATA version 11 (Stata Corp, College Station, Texas, USA)

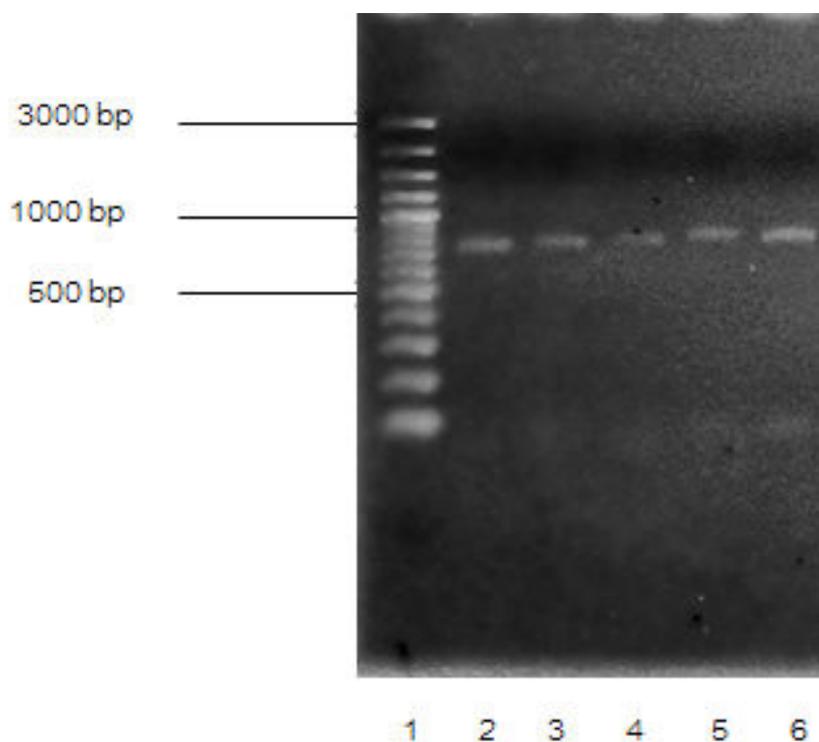
บทที่ 4 ผลการวิจัย

การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 110 บริเวณ จำนวนดิน 550 ตัวอย่าง จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธี Baiting technique ได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต (4.36%) แบ่งเป็น ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ในระดับชนิด ส่วนอีก 21 ไอโซเลต เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ที่จำแนกชนิดได้แล้วจำนวน 7 ไอโซเลต ส่วนอีก 14 ไอโซเลต ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อราระหว่างการเก็บตัวอย่างทำให้ไม่สามารถหรือสกัดได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งสองสกุลด้วยวิธี PCR โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน 28S rDNA ผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 870 คู่เบส และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน internal transcribed spacer (ITS) ผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 890 คู่เบส (ภาพ 15) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งสองสกุลมาทำ BLASTN โดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานแล้วในฐานข้อมูล NCBI สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต โดยจำนวน 3 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. indica* ซึ่งมีค่าความเหมือนอยู่ที่ 99% ส่วนอีก 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. baujardi* ซึ่งมีค่าความเหมือนอยู่ที่ 99% และอีก 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. amazonensis* หรือ *H. baujardi* ซึ่งมีค่าความเหมือนคล้ายอยู่ที่ 99% (ตาราง 6)



ภาพ 15 ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน ITS จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* ตามลำดับ บน 1.2% agarose gel (Lane1: Standard ladder, Lane2: eMW12.3 TH *Steinernema* spp., Lane3: eMW16.5 TH *Steinernema* spp., Lane4: eMW49.3TH *H. indica*, Lane5: eMW59.2 TH *indica*, Lane6: eMW59.5TH *H. indica*)

สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

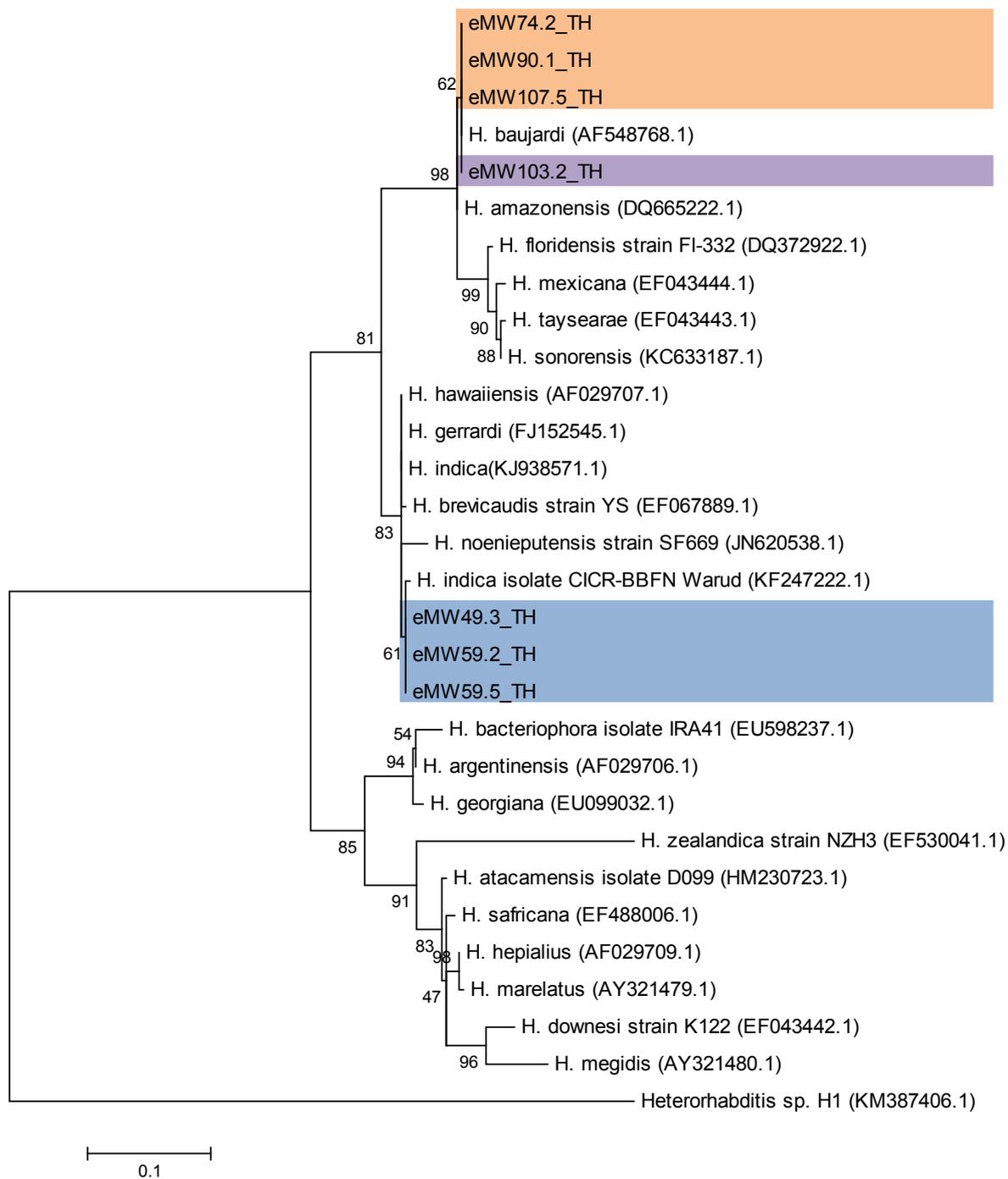
การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 3 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* ส่วนอีก 2 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* และอีก 2 ไอโซเลต คือ eMW_103.2_TH และ eMW_107.5_TH มีความใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* หรือ *H. amazonensis* (ภาพ 16) อย่างไรก็ตามเมื่อดูจากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแล้ว มีความเป็นไปได้ว่า eMW_103.2_TH น่าจะเป็น *H. amazonensis* เนื่องจากมีความใกล้ชิดกัน สำหรับ eMW_107.5_TH น่าจะเป็น *H. baujardi* เพราะมีความใกล้ชิดกัน

ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จำนวน 24 ตัวอย่าง พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากดินร่วนมากที่สุดจำนวน 19 ไอโซเลต (79.17%) รองลงมาเป็นดินร่วนปนทราย 4 ไอโซเลต (16.67%) และดินทราย 1 ไอโซเลต (4.17%) โดยไม่พบที่สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จากดินเหนียว ในส่วนของปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ พบว่าอุณหภูมิของดินที่พบอยู่ในช่วง 14 -31 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 6.8-7.0 และความชื้นของดินอยู่ในช่วง 1-2

ตาราง 6 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
eMW49.3_TH	<i>Heterorhabditis indica</i>	KJ938571.1	1165	100%	0	99%
eMW59.2_TH	<i>Heterorhabditis indica</i>	KJ938571.1	1163	100%	0	99%
eMW59.5_TH	<i>Heterorhabditis indica</i>	KF937813.1	1156	100%	0	99%
eMW74.2_TH	<i>Heterorhabditis baujardi</i>	AF548768.1	1181	98%	0	99%
eMW90.1_TH	<i>Heterorhabditis baujardi</i>	AF548768.1	1181	98%	0	99%
eMW103.2_TH	<i>Heterorhabditis baujardi</i>	AF548768.1	1181	98%	0	99%
eMW103.2_TH	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	DQ665222.1	1163	99%	0	99%
eMW107.5_TH	<i>Heterorhabditis baujardi</i>	AF548768.1	1181	98%	0	99%
eMW107.5_TH	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	DQ665222.1	1163	99%	0	99%



ภาพ 16 Maximum likelihood tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS จาก ไล์เดือนฝอย ศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* โดยใช้โปรแกรม Mega version 6.0 วิเคราะห์ ด้วย Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)

การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NBTA ทั้งหมด 24 ไอโซเลต พบโคโลนีสีน้ำเงิน ลักษณะโค้งนูน (convex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย (umbonated) จำนวน 3 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* และโคโลนีสีเขียว ลักษณะโค้งนูน (convex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย ขอบเรียบ จำนวน 21 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นแบคทีเรียในสกุล *Photorhabdus* (ภาพ 17)

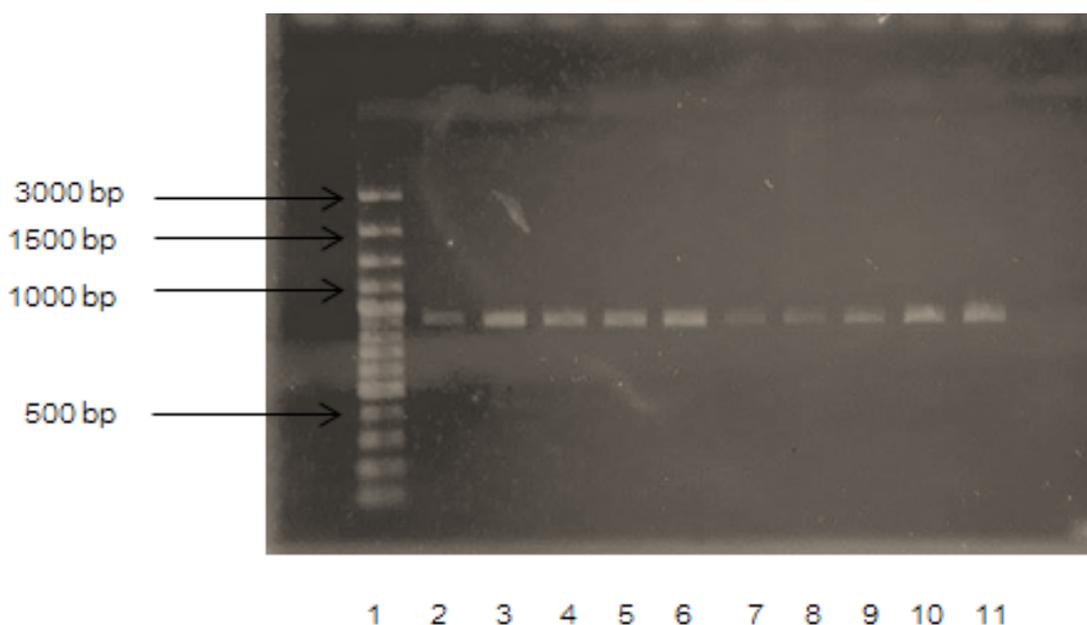


ภาพ 17 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NBTA (ซ้าย) แบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* และ (ขวา) แบคทีเรียสกุล *Photorhabdus*

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีจำนวนทั้งสิ้น 24 ไอโซเลต แยกเป็นแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต และเป็นแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต

ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองสกุลด้วยวิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *recA* โดยผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 900 คู่เบส (ภาพ 18) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้งสองสกุลมาทำ BLASTN โดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานแล้วในฐานข้อมูล NCBI สำหรับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต พบว่า 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *X. japonica* strain DSM16522 ซึ่งมีค่าความเหมือน 98% และ 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *X. stockiae* strain 858516 ซึ่งมีค่าความเหมือน 97% (ตาราง 7) สำหรับแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต พบว่า 20 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06 จำนวน 8 ไอโซเลต ซึ่งมีค่าความเหมือน 99% และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04 จำนวน 12 ไอโซเลต ซึ่งมีค่าความเหมือน 99% จำนวน 3 ไอโซเลต 98% จำนวน 1 ไอโซเลต และ 97% จำนวน 8 ไอโซเลต และมี 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. temperata* subsp. *temperata* strain K122 (ตาราง 8)



ภาพ 18 ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *recA* จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยใช้ primer *recA_R* และ *recA_F* บน 1.2% agarose gel (Lane1: Standard ladder, Lane2: bMW1.2 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane3: bMW4.4 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane4: bMW4.5 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane5: bMW8.1 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane6: bMW12.3 TH *X. japonica*, Lane7: eMW16.3 TH *X. stockiae*, Lane8: bMW16.5 TH *X. stockiae*, Lane9: bMW27.4 *P. temperata* subsp. *temperate*, Lane10: bMW29.2 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane11: bMW29.4 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*)

ตาราง 7 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bMW12.3 TH	<i>Xenorhabdus japonica</i>	FJ823400.1	1079	100%	0	98%
bMW16.3 TH	<i>Xenorhabdus stockiae</i>	JX485977.1	1038	100%	0	97%
bMW 16.5 TH	<i>Xenorhabdus stockiae</i>	JX485977.1	1038	100%	0	97%

ตาราง 8 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

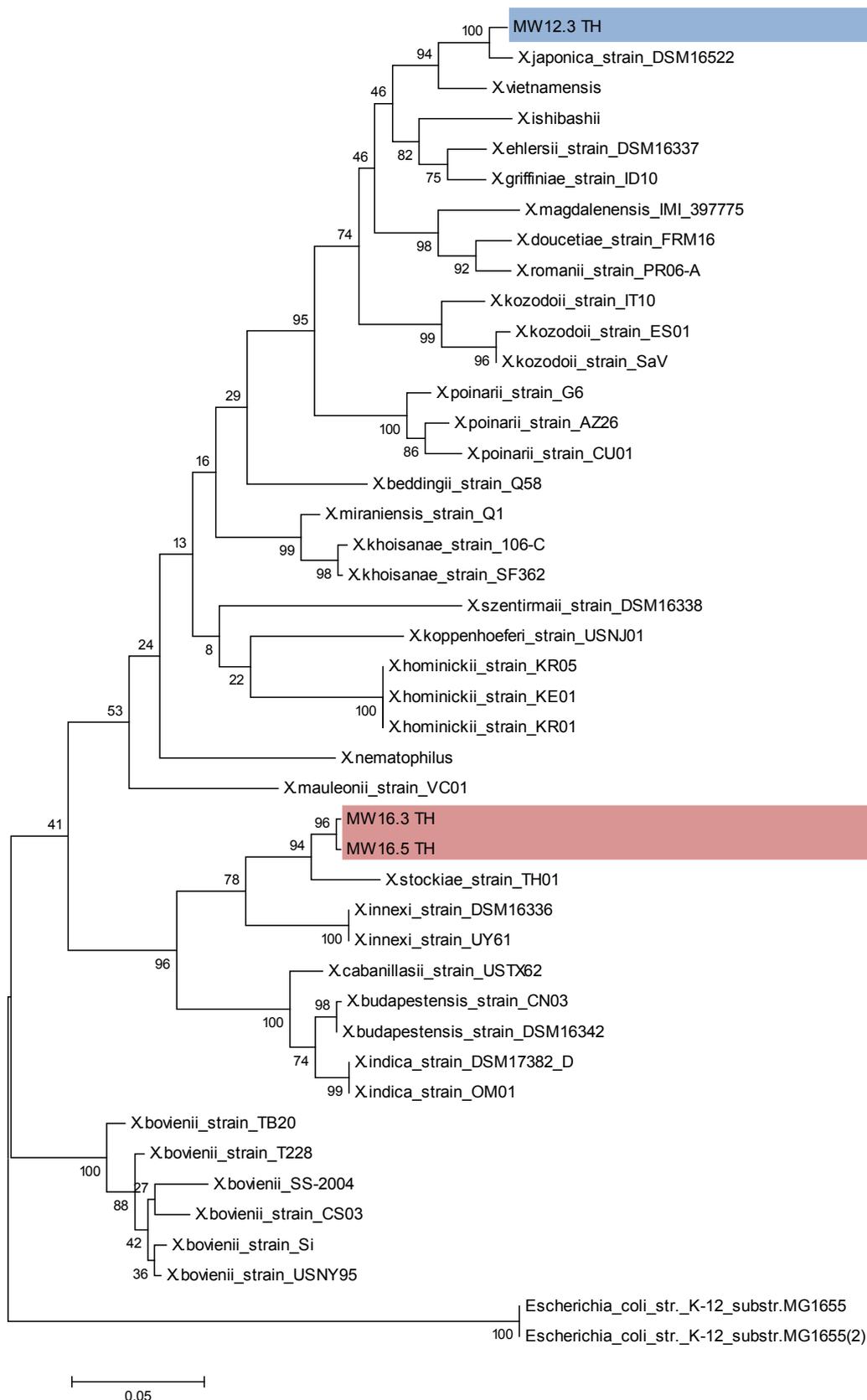
Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bMW1.2 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	LN835348.1	1110	99%	0	99%
bMW4.4 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	LN835348.1	1056	99%	0	99%
bMW4.5 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	LN835348.1	1110	99%	0	99%
bMW8.1 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	LN835348.1	1110	99%	0	99%
bMW27.4 TH	<i>Photorhabdus temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	FJ862014.1	1102	100%	0	99%
bMW29.2 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1033	100%	0	97%
bMW29.4 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1033	100%	0	97%
bMW38.3 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	LN835348.1	1100	99%	0	99%
bMW49.3 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	LN835348.1	1106	99%	0	99%
bMW49.4 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1127	100%	0	99%
bMW54.1 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	LN835348.1	1100	99%	0	99%
bMW56.5 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	LN835348.1	1112	99%	0	99%

ตาราง 8 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recA ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

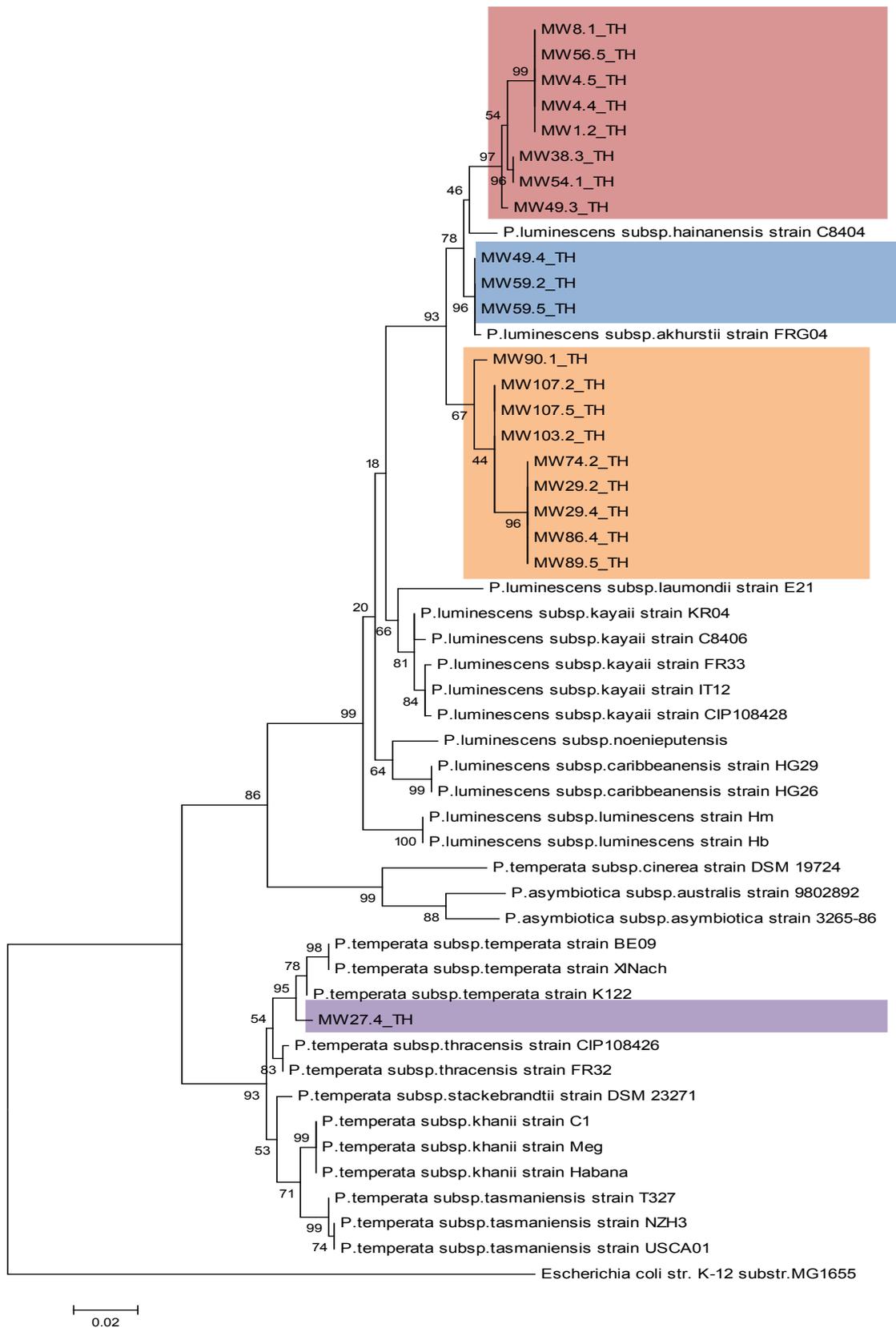
Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bMW59.2 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1127	100%	0	99%
bMW59.5 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1127	100%	0	99%
bMW74.2 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1035	100%	0	97%
bMW86.4 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1035	100%	0	97%
bMW89.5 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1035	100%	0	97%
bMW90.1 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1058	100%	0	98%
bMW103.2 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1046	100%	0	97%
bMW107.2 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1046	100%	0	97%
bMW107.5 TH	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FJ862005.1	1046	100%	0	97%

สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต และแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 1 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. japonica* strain DSM16522 และอีก 2 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. stockiae* strain TH01 (ภาพ 19) ในส่วนของแบคทีเรีย *Photorhabdus* พบว่า แบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 20 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04 จำนวน 12 ไอโซเลต และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06 จำนวน 8 ไอโซเลต และอีก 1 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* strain K122 (ภาพ 20)



ภาพ 19 Maximum likelihood tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* (588 คู่เบส) จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* วิเคราะห์ด้วย Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)



ภาพ 20 Maximum likelihood tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* (588 คู่เบส) จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* วิเคราะห์ด้วย Kimura-2- parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)

บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

อภิปรายผล

การเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง จาก 110 บริเวณในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2557 – เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2558 สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากการใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นเหยื่อล่อได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต โดยพบลักษณะการตายของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกไชโดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* sp. จะมีสีดำ ไม้เน่า และสีแดง ไม้เน่าจากการถูกไชโดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* sp. ซึ่งเป็นไปตามการศึกษาของมณจันท์ เมฆธน และคณะ (2544) โดยจะพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุลใดสกุลหนึ่งใน 2 สกุลนี้จากซากหนอนกินรังผึ้งทั้งหมด 5 ตัว (Thanwisai, et al., 2012)

การจำแนกสกุลและชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถทำได้โดยการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ เพศเมีย และระยะติดต่อกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Nguyen and Smart, 1996) แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความคล้ายคลึงกันมากจึงทำให้ยากต่อการจำแนกในระดับชนิด ดังนั้นจึงได้นำวิธีทางอนุชีววิทยาเข้ามาใช้ในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้ในการจำแนกในระดับชนิดได้ โดยยีนที่นิยมใช้คือ Internal transcribed spacer (ITS) rDNA ซึ่งเป็น non coding gene ใช้ในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* (Hominick et al. 1997; Maneesakorn et al. 2011; Thanwisai et al. 2012) และบริเวณ 28S rDNA ใช้ในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* (Stock et al. 2001; Nguyen et al. 2010; Thanwisai et al. 2012) เมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต มาทำการจำแนกสกุลพบว่า เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต และยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ส่วนอีก 21 ไอโซเลตเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้จำนวน 14 ไอโซเลต ส่วนอีก 7 ไอโซเลต จำแนกชนิดได้เป็น *H. indica* จำนวน 3 ไอโซเลต *H. baujardi* จำนวน 3 ไอโซเลต และอีก 1 ไอโซเลตเป็น *H. amazonensis* ซึ่งเป็นชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย การรายงานพบครั้งนี้ถือเป็นครั้งแรกที่พบ *H. amazonensis* ทั้งนี้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* เป็นชนิดที่พบได้บ่อยและพบได้ในหลายๆ จังหวัดของประเทศไทย (Thanwisai et al. 2012)

งานวิจัยครั้งนี้พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* เป็นจำนวนไอโซเลตที่มากกว่าสกุล *Steinernema* ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ได้มากกว่า อย่างไรก็ตามมีรายงานพบการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุล ได้เกือบทุกทวีป ยกเว้นแถบแอนตาร์กติก (Poinar, 1990) และรายงานการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* ในแถบอเมริกาเหนือและใต้, ออสเตรเลีย, ยุโรป, เอเชีย และ แอฟริกา (Tailliez, et al., 2006; Tailliez, et al., 2010) การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินได้จำนวน 24 ไอโซเลต (4.36%) พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุลเพียง 3 ไอโซเลต ซึ่งน้อยกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* ที่พบมากถึง 21 ไอโซเลต ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Hominick et al. (1995) ที่รายงานการพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* มากที่สุดในแถบทวีปยุโรป คิดเป็น 37-48% เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล

Steinernema มีความสามารถในการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* (Nyasani *et al.* 2008) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าทำไมถึงพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ได้มากกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema*

ในประเทศไทยเริ่มมีรายงานการสำรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในปี ค.ศ. 1998 โดย Nuchanart และ Sontirat ได้สำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย 8 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี พิจิตร พระนครศรีอยุธยา กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ขอนแก่น หนองคาย และสระแก้ว พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* จำนวน 8 ไอโซเลต และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต ต่อมา (ธาริณี นาแสง, ม.ป.ป., หน้า 661) ได้รายงานการสำรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ และหนองบัวลำภู พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis* รวมกันเป็นจำนวน 7 ไอโซเลต และล่าสุดในปี ค.ศ. 2012 Thanwisai และคณะ ได้มีการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงครั้งใหญ่จาก 13 จังหวัดทั่วประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิ ขอนแก่น นครราชสีมา นครนายก นนทบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา นครปฐม สุพรรณบุรี ลพบุรี เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี และเพชรบุรี พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *S. websteri* และ *S. khoisanae* โดยพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* มากที่สุดและพบในหลายๆ จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น เพชรบูรณ์ สุพรรณบุรี นครนายก และกาญจนบุรี และพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. khoisanae* จำนวนน้อยเพียง 3 ไอโซเลตและพบเพียงในจังหวัดเพชรบูรณ์เท่านั้น และมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *H. indica*, *H. bacteriophora*, *H. baujardi*, *H. sp. SGmg3* และ *H. sp. SGgi* โดยพบ *H. indica* มีการกระจายมากที่สุดในจังหวัด ได้แก่จังหวัด ขอนแก่น นครนายก สุพรรณบุรี เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี รองลงมาพบ *H. sp. SGmg3* ใน 3 จังหวัดได้แก่ ขอนแก่น เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี *H. bacteriophora*, *H. baujardi* และ *H. sp. SGgi* จากจังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบ *H. indica* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่า *H. indica* เป็นชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบว่า *H. amazonensis* ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พบว่าค่าอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความชื้นที่บันทึกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด ผลที่คาดว่าจะเป็นได้คือไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Thanwisai และคณะ (2012) จากการศึกษาไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในดินเหนียว อาจเป็นเพราะลักษณะของดินเหนียวทำให้การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต่ำลง เนื่องจากดินเหนียวมีช่องว่างระหว่างเม็ดดินและออกซิเจนภายในดินที่น้อย (Molyneux, 1984; Kung *et al.* 1990) ในทางตรงกันข้ามดินร่วนปนทราย ดินทราย และดินร่วน มีช่องว่างขนาดใหญ่ระหว่างเม็ดดิน ปริมาณสัดส่วนของอากาศจึงมีมากกว่าน้ำ ซึ่งสำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแล้วลักษณะดังกล่าวเหมาะสมต่อการนำอาหารสะสมไว้ภายในตัวมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ (Georgis and Poinar, 1993) ดังนั้นจึงพบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถมีชีวิตรอดได้เป็นระยะเวลาานาน จึงมีโอกาสที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในดินร่วนปนทราย ดินทราย และดินร่วน ได้บ่อยกว่าลักษณะดินชนิดอื่นๆ

ความชื้นในดินมีความสำคัญต่อการอยู่รอดและความสามารถในการเข้าทำลายแมลงอาศัย โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในสภาพความชื้นต่ำหรือสูงมากๆ (Grant and Villani, 2003;

Mauleon *et al.* 2006; Nielsen *et al.* 2008) ซึ่งส่งผลทำให้ความอยู่รอดต่ำเพราะไม่สามารถเคลื่อนที่หาแมลงอาศัยตัวใหม่ได้ ความชื้นในดินที่แตกต่างกันอาจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ต่างกัน โดยความชื้นในดินที่เหมาะสมของ *H. indica* อยู่ระหว่าง 8-18% ส่วน *S. themophilum* อยู่ระหว่าง 6-20% และ *S. glaseri* อยู่ระหว่าง 8-25% (Yadav, 2012)

อุณหภูมิของตัวอย่างดินเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของระยะตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยทั่วไปพบว่าอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 และสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตายได้ และอุณหภูมิระหว่าง 10-15 องศาเซลเซียส สามารถควบคุมหรือจำกัดการเคลื่อนที่ของไส้เดือนฝอยได้ในขณะที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส ทำให้ความสามารถในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยลดลงได้ (Rohde *et al.* 2010)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการอยู่รอดและความสามารถในการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยมีรายงานว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* สามารถอยู่รอดและเข้าทำลายแมลงอาศัยลดลงเพียงเล็กน้อยในดินที่มีการปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง pH 8-pH 4 และอัตราการอยู่รอดและเข้าทำลายลดลงต่ำมากที่สุดเมื่อ pH 10 (Kung *et al.* 1990) ทั้งนี้ในดินประกอบด้วยส่วนต่างๆ หลายชนิดได้แก่อากาศในดิน เช่น ก๊าซไนโตรเจน (N_2) ออกซิเจน (O_2) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำในดิน สารอินทรีย์ อนินทรีย์วัตถุหรือแร่ธาตุ ปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลต่อการอยู่รอดหรือการพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* และ *Steinernema* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Internal Transcribed Spacer (ITS) และ 28S rDNA ตามลำดับ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีนมีความเหมาะสมในการจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทยทั้ง 2 สกุล (Hominick *et al.* 1997; Stock *et al.* 2001; Nguyen *et al.* 2010; Thanwisai *et al.* 2012) จากการแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ตามลำดับ และจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน *recA* (Thanwisai *et al.* 2012) พบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ทั้งหมดจำนวน 3 ไอโซเลต โดยแยกเป็น แบคทีเรีย *X. stockiae* จำนวน 2 ไอโซเลต และแบคทีเรีย *X. japonica* จำนวน 1 ไอโซเลต ในขณะที่เดียวกันพบแบคทีเรีย *Photorhabdus* ทั้งหมด 21 ไอโซเลต โดยเป็น *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 20 ไอโซเลต โดยมี *H. indica* และ *H. baujardi* เป็นโฮสต์ ส่วนอีกหนึ่งไอโซเลตเป็นแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperate* การศึกษาครั้งนี้เป็นการสำรวจพบเป็นครั้งแรกในประเทศไทยที่มีการรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิด *H. amazonensis* และแบคทีเรีย *X. japonica* และ *P. temperata* subsp. *temperate* แสดงให้เห็นว่าในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ของประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของทั้งแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

จากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ของประเทศไทยให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Thanwisai *et al.* (2012) ที่มีการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย นั่นคือไส้เดือนฝอยแมลงศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* พบว่าส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *H. indica* และ *H. baujardi* อย่างไรก็ตามยังมีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต ที่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *H.*

amazonensis ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย แต่มีรายงานพบครั้งแรกที่ประเทศบราซิล (Andalo et al. 2006)

จากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และแบคทีเรีย *Photorhabdus* ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Thanwisai et al. (2012) ที่มีการแยกแบคทีเรียเหล่านี้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย นั่นคือพบว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 2 ไอโซเลต ที่มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. stockiae* และพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวนเพียง 1 ไอโซเลตที่มีความใกล้ชิดกับ *X. japonica* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย สำหรับสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Photorhabdus* พบว่าส่วนใหญ่แบคทีเรียมีความใกล้ชิดกับ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรีย *Photorhabdus* อีก 1 ไอโซเลตที่มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperate* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง ในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ แล้วทำการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินโดยใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นเหยื่อล่อ แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุล คือ *Heterorhabdus* และ *Steinernema* ส่วนใหญ่เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabdus* ซึ่งสามารถจำแนกชนิดได้เป็น *H. indica* *H. baujardi* และ *H. amazonensis* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย สำหรับแบคทีเรียแยกได้ 24 ไอโซเลต จำแนกชนิดได้เป็น 2 สกุล คือ *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต แบ่งเป็น *X. stockiae* และ *X. japonica* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย และ *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต จำแนกชนิดได้เป็น *P. luminescens* subsp. *akhurstii* 20 ไอโซเลต และอีก 1 ไอโซเลตเป็น *Photorhabdus temperata* subsp. *temperate* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความหลากหลายชนิดของทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ของประเทศไทย ซึ่งผลที่ได้เป็นแนวโน้มที่ดีในการพบชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่ยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณอื่นๆ ของเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ หรืออาจจะขยายพื้นที่การเก็บตัวอย่างดินไปในอุทยานแห่งชาติอื่นๆ ที่มีความอุดมสมบูรณ์ที่อาจจะพบความหลากหลายของทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* นอกจากนี้อาจจะศึกษาเพิ่มเติมถึงการนำแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์ในการเป็น biological control agent ต่อไป หรือควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการหาสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่พบได้ในแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีคุณสมบัติในการกำจัดแมลงศัตรูพืชและจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

บรรณานุกรม

- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. (2544). ชีววิทยาของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง *Heterorhabditis* sp. Thai isolate และการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียม. **วารสารข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา**, 11(3), 14-26.
- ปัญญา ชินศรี, นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, วัชรีย์ สมสุข และพิมพ์พร นันทะ. (3-5 กุมภาพันธ์ 2542). อิทธิพลของเนื้อดินและความชื้นต่อการอยู่รอดและการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (All Strain). ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37: สาขาพืช สาขาส่งเสริมนิเทศศาสตร์เกษตร**(หน้า 326-332). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มณีจันทร์ เมฆธน. (5-7 กุมภาพันธ์ 2544). ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathogenic Nematode) สายพันธุ์ใหม่ในประเทศไทย. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39: สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม** (หน้า 189-196). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Adams, B. J., Burnell, A. M. and Powers, T. O. (1998). A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. **Journal of Nematology**, 30, 22-39.
- Aljanabi, S. M. and Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques. **Nucleic Acids Research**. 25, 4692-4693.
- Akhurst, R. J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. **Journal of General Microbiology**, 121, 303-309.
- Akhurst, R. J. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. **Journal of General Microbiology**, 128, 3061-3065.
- Akhurst, R. J. (1983). Taxonomy study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 33(1), 38-45.
- Akhurst, R. J. and Boemare, N. E. (1988). A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. **Journal of General Microbiology**, 134, 1835-1845.
- Akhurst, R. J. and Boemare, N. E. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In R. Gaugler and H.K. Kaya (Eds.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control** (pp. 75-90). USA: CRC Press.

- Akhurst, R. J., Bedding, R. A., Bull, R. M. and Smith, D. R. J. (1992). An epizootic of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda) in sugar cane scarabaeids (Coleoptera). **Fundamental and Applied Nematology**, 15(1), 71-73.
- Akhurst, R. and Dunphy, G. B. (1993). Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts. In N. Beckage, S. Thompson, and B. Federici (Eds.), **Parasites and Pathogens of Insects** (pp. 1-23). New York: Academic Press.
- Akhurst, R. J., Boemare, N. E., Janssen, P. H., Peel, M. M., Alfredson, D. A. and Beard, C. E. (2004). Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* subsp. nov. and *P. asymbiotica* subsp. *australis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 54, 1301-1310.
- Amarasinghe, L. D., Hominick, W. M., Briscoe, B. R. and Reid, A. P. (1994). Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. **Journal of Helminthology**, 68, 277-286.
- An, R. and Grewal, P. S. (2010). *Photorhabdus temperata* subsp. *stackebrandtii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). **Current Microbiology**, 61(4), 291-297.
- An, R., and Grewal, P. S. (2011). *Photorhabdus luminescens* subsp. *kleinii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). **Current Microbiology**, 62, 539-543.
- Andaló, V., Nguyen, K. B. and Moino, A. (2006). *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas. **Brazil Nematology**, 8, 853-867.
- Anis, M., Shahina, F., Reid, A. P. and Rowe, J. (2002). *Steinernema asiaticum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan. **International Journal of Nematology**, 12, 220-231.
- Balcerzak, M. (1991). Comparative studies on parasitism caused by entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. The roles of the nematode-bacterial complex, and of the associated bacteria alone, in pathogenesis. **Acta Parasitologica Polonica**, 36, 175-181.
- Bedding, R. A. and Akhurst, R. J. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**, 21(1), 109-110.
- Bedding, R. A., Akhurst, R. J. and Kaya, H. K. (1993). Future prospects for entomogenous and entomopathogenic nematodes. In R. A. Bedding, R. J. Akhurst and H. K. Kaya (Eds.), **Nematodes and Biological Control of Insect Pests** (pp. 11-20). East Melbourne, Australia: CSIRO Publications.
- Bedding, R. A. and Molyneux, A. (1982). Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). **Nematologica**, 28, 354-359.

- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Lui, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, J. R., et al. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, 392, 71-75.
- Boemare, N. E. (2002). Biology, taxonomy and systematics. In R. Gaugler (Ed.), **Entomopathogenic Nematology** (pp. 35-56). New York: CABI Publishing.
- Boemare, N. and Akhurst, R. J. (1988). Biochemical and physiological characterization of colony from variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). **Journal of General Microbiology**, 134, 751-761.
- Boemare, N. E., Boyer-Giglio, M. H., Thaler, J. O., Akhurst, R. J. and Brehelin, M. (1992). Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, 58, 3032-3037.
- Boemare, N., Thaler, J. O. and Lanois, A. (1997). Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. **Symbiosis**, 22, 167-175.
- Brachmann, A. O. (2009). **Isolation and identification of natural products and biosynthetic pathways from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus***. Doctoral dissertation, Ph. D., Saarland University, Saarbrücken.
- Brachmann, A. O., Schwär, G. and Bode, H. B. (2008). *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*: Potent secondary metabolite producers. **International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants/West Palearctic Regional Section Bulletin**, 31, 151-156.
- Burman, M. (1982). *Neoaplectana carpocapsae*: Toxin production by axenic insect parasitic nematodes. **Nematologica**, 28, 62-70.
- Cabanillas, H. E., Poinar, G. O. Jr. and Raulston, J. R. (1994). *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. **Fundamental and Applied Nematology**, 17, 123-131.
- Capinera, J. L. and Epsky, N. D. (1992). Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. **Florida Entomologist**, 75, 525-532.
- Chen, S., Li, X., Yan, A., Spiridonov, S. E. and Moens, M. (2006). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema hebeiense* sp. n. Rhabditida Steinernematidae, from North China. **Nematology**, 8(4), 563-574.
- Ciche, T. A., Blackburn, M., Carney, J. R. and Ensign, J. C. (2003). Photobactin: A catechol siderophore produced by *Photorhabdus luminescens*, an entomopathogen mutually associated with *Heterorhabditis bacteriophora* NC1 nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, 69, 4706- 4713.

- Cimen, H., Lee, M. M., Hatting, J., Hazir, S. and Stock, S. P. (2014a). *Steinernema innovationi* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from South Africa. **Journal of Helminthology**, 3, 1-4.
- Cimen, H., Lee, M. M., Hatting, J., Hazir, S. and Stock, S. P. (2014b). *Steinernema tophus* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Zootaxa**, 3821(3), 337-353.
- Clausi, M., Longo, A., Rappazzo, G., Tarasco, E., and Vinciguerra, M. T. (2011). *Steinernema vulcanicum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from Sicily (Italy). **Nematology**, 13(4), 409-423.
- Constant, P., Marchay, L., Fischer-Le Saux, M., Briand-Panoma, S. and Mauleon, H. (1998). Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe Islands. **Fundamental and Applied Nematology**, 21, 667-672.
- Couche, G. A. and Gregson, R. P. (1987). Protein inclusions produced by the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus*. **Journal of Bacteriology**, 169, 5279-5288.
- Couche, G. A., Lehbach, P. R., Forage, R. G., Cooney, B. C., Smith, D. R. and Gregson, R. P. (1987). Occurrence of intracellular inclusions and plasmids in *Xenorhabdus* spp. **Journal of General Microbiology**, 133, 967-973.
- Cutler, C. G. and Stock, S. P. (2003). *Steinernema websteri* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from China. **Nematologia Mediterranea**, 31, 215-224.
- Dolinski, C., Kamitami, F., Machado, I. R. and Winter, C. E. (2008). Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 103, 150-159.
- Doucet, M. M. A., and Doucet, M. E. (1990). *Steinernema ritteri* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) with a key to the species of the genus. **Nematologica**, 36, 257-265.
- Doucet, M. M. A. and Gabarra, R. (1994). On the occurrence of *Steinernema glaseri* Steiner, 1929 (Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976. (Heterorhabditidae) in Cotalogue, Spain. **Fundamental and Applied Nematology**, 17, 441-443.

- Doucet, M. M. A., Bertolotti, M. A. and Doucet, M. E. (2003). Morphometric and molecular studies of isolates of *Steinernema rarum* (Doucet, 1986) Mamaya, 1988 (Nematoda: Steinernematidae) from the province of Córdoba, Argentina. **Journal of Nematode Morphology and Systematics**, 6, 27-36.
- Doucet, M. M. A. (1986). A new species of *Neoaplectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) from Cordoba, Argentina. **Revue de Nematologie**, 9, 317-323.
- Edgington, S., Buddie, A. G., Moore, D., France, A., Merino, L. and Hunt, D. J. (2011). *Heterorhabditis atacamensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from the Atacama Desert, Chile. **Journal of Helminthology**, 85(4), 381-394.
- Edgington, S., Buddie, A. G., Tymo, L. M.; France, A., Merino, L. and Hunt, D. J. (2009a). *Steinernema unicornum* sp. n. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Tierra del Fuego, Chile. **Journal of Nematode Morphology and Systematics**, 12(2), 113-131.
- Edgington, S., Buddie, A. G., Tymo, L., Hunt, D. J., Nguyen, K. B., France, A. I., et al. (2009b). *Steinernema australe* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Isla Magdalena, Chile. **Nematology**, 11(5), 699-717.
- Ehlers, R-U., Deseo, K. V. and Stackebrandt, E. (1991). Identification of *Steinernema* spp. (Nematoda) and their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. from Italian and German soils. **Nematologica**, 37, 360-366.
- Elawad, S., Ahmad, W. and Reid, A. P. (1997). *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. **Fundamental and Applied Nematology**, 20(5), 435-442.
- Emelianoff, V., Le Brun, N., Pages, S., Stock, P., Tailliez, P., Moulia, C., et al. (2008). Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). **Journal of Invertebrate Pathology**, 98, 211-217.
- Farmer, J. J. 3rd., Jorgensen, J. H., Grimont, P. A., Akhurst, R. J., Poinar, G. O. Jr., Ageron, E., et al. (1989). *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, 27, 1594-1600.
- Fayyaz, S., Khanum, T. A., Ali, S., Solangi, G. S., Gulsher, M. and Javed, S. (2015). *Steinernema balochiense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Pakistan. **Zootaxa**, 3904(3), 387-402.

- Ferreira, T., Van Reenen, C. A., Endo, A., Spröer, C., Malan, A. P. and Dicks, L. M. T. (2013a). Description of *Xenorhabdus khoisanae* sp. nov., the symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema khoisanae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 63, 3220-3224.
- Ferreira, T., Van Reenen, C., Pages, S., Tailliez, P., Malan, A. P. and Dicks, L. M. T. (2013b). *Photorhabdus luminescens* subsp. *noenieputensis* subsp. nov., a symbiotic bacterium associated with a novel *Heterorhabditis* species related to *Heterorhabditis indica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 63, 1853-1858.
- Ferreira, T., Van Reenen, C. A., Endo, A., Tailliez, P., Pagès, S., Spröer, C., et al. (2014). *Photorhabdus heterorhabditis* sp. nov., a symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis zealandica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64(5), 1540-1545.
- Fischer, P. and Führer, E. (1989). Effect of acidity on the entomophilic nematode *Steinernema kraussei* Steiner. **Biology and Fertility of Soils**, 9, 174-177.
- Fischer-Le Saux, M., Viallard, V., Brunel, B., Normand, P. and Boemare, N. E. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 49, 1645-1656.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. and Stackebrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. Bugsthat Kill Bugs. **Annual Review of Microbiology**, 51, 47-72.
- Gardner, S. L., Stock, S. P. and Kaya, H. K. (1994). A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian islands. **Journal of Parasitology**, 80, 100-106.
- Gaugler, R. (Ed.). (2002). **Entomopathogenic Nematology**. (p. 388), New York: CABI publishing.
- Gaugler, R. and Boush, G. M. (1978). Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the nematode *Neoaplectana carpocapsae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 32, 291-296.
- Ganguly, S. and Kumar, S. (Feb 13, 2009). **Description of a new species of *Heterorhabditis* (*Heterorhabditidae*: *Rhabditida*) from Meghalaya**. Retrieved December 20, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/224612058>.
- Ganguly, S. and Singh, L. K. (2000). *Steinernema thermophilum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from India. **International Journal of Nematology**, 10, 183-191.

- Gaugler, R., Lewis, E. and Stuart, R. J. (1997). Ecology in the service of biological control: The case of entomopathogenic nematodes. **Oecologia**, 109, 483 - 489.
- Ganguly, S., Rathour, K. S., Kumar, S. and Singh, M. (2011). *Steinernema meghalayensis* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Northeastern Hilly Region of India. **Indian Journal of Nematology**, 41(1), 83-97.
- Ganguly, S. and Singh, L. K. (2000). *Steinernema thermophilum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from India. **International Journal of Nematology**, 10(2), 183-191.
- Gerrard, J. G., Joyce, S. A., Clarke, D. J., Ffrench-Constant, R. H., Nimmo, G. R., Looke, D. F. M., et al. (2006). Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. **Emerging Infectious Diseases**, 12, 1562-1564.
- Gerrard, J. G., Waterfield, N. R., Vohra, R., and Ffrench-Constant, R. H. (2004). Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: An emerging bacterial pathogen. **Microbes and Infection**, 6, 229-237
- Gibson, T., Farrugia, D., Barrett, J., Chitwood, D. J., Rowe, J., Subbotin, S., et al. (2011). The mitochondrial genome of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Genome**, 54, 565-574.
- Gokce, C., Erbas, Z., Yilmaz, H., Demirbag, Z. and Demir, L. (2015). A new entomopathogenic nematode species from Turkey, *Steinernema websteri* (Rhabditida: Steinernematidae), and its virulence. **Turkish Journal of Biology**, 39, 167-174.
- Grant, J. A. and Villani, M. G. (2003). Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. **Environmental Entomology**, 32, 80-87.
- Grewal, P., Ehlers, R-U. and Shapiro-Ilan, D. I. (2005). **Nematodes as Biocontrol Agents**. UK: CABI Publishing.
- Grewal, P. S., Selvan, S. and Gaugler, R. (1994). Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. **Journal of Thermal Biology**, 19, 245-253.
- Griffin, C. T., Boemare, N. E. and Lewis, E. E. (2005). Biology and behaviour. In P. S. Grewal, R. U. Ehlers, D. Shapiro-Ilan (Eds.), **Nematodes as Biocontrol Agents** (pp. 47-59). Wallingford, UK: CABI.
- Griffin, C. T., Chaerani, R., Fallon, D., Reid, A. P. and Downes, M. J. (2000). Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. **Journal of Helminthology**, 74(2), 143-150.

- Grimont, P. A. D., Steigerwalt, A. G., Boemare, N., Hickman-Brenner, F. W., Deval, C., Grimont, F. and Brenner, D. J. (1984). Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic study of the genus *Xenorhabdus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 34, 378-388.
- Grundmann, F., Kaiser, M., Schiell, M., Batzer, A., Kurz, M., Thanwisai, A., et al. (2014). Antiparasitic Chaiyaphumines from entomopathogenic *Xenorhabdus* sp. PB61.4. **Journal of Natural Products**, 77(4), 779-783.
- Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P. and Keskin, S. (2003). Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. **Turkish Journal of Biology**, 27, 181-202.
- Hazir, S., Stackebrandt, E., Lang, E., Schumann, P., Ehlers, R.-U. and Keskin, N. (2004). Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thracensis* subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, 27, 36-42.
- Hazir, S., Stock, S. P. and Keskin, N. (2003). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema anatoliense* n. sp (Rhabditida: Steinernematidae), from Turkey. **Systematic Parasitology**, 55, 211-220.
- Hazir, S., Stock, S. P., Kaya, H. K., Koppenhöfer, A. M. and Keskin, N. (2001). Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 77, 243-250.
- Herbert, E. E. and Goodrich-Blair, H. (2007). Friend and foe: The two faces of *Xenorhabdus nematophila*. **Nature Reviews Microbiology**, 5, 634-646.
- Hominick, W. M. (2002). Biogeography. In R. Gaugler (Ed.), **Entomopathogenic Nematology** (pp. 115 -143). UK: CABI Publishing.
- Hominick, W. M., Briscoe, B. R., del Pino, F. G., Heng, J., Hunt, D. J., Kozodoy, E., et al. (1997). Biosystematics of entomopathogenic nematodes: Current status, protocols and definitions. **Journal of Helminthology**, 71, 271-298.
- Hominick, W. M., Reid, A. P., Bohan, D. A. and Briscoe, B. R. (1996). Entomopathogenic nematodes: Biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. **Biocontrol Science and Technology**, 6, 317- 331.
- Hu, K. J., Li, J. X., Li, B., Webster, J. M. and Chen, G. H. (2006). A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 14, 4677- 4681.

- Iraki, K., Salah, N., Sansour, M. A., Segal, D., Glazer, I., Johnigk, S. A., et al. (2000.) Isolation and characterization of two entomopathogenic nematode strains, *Heterorhabditis indica* (Nematoda, Rhabditida), from the West Bank, Palestinian Territories. **Journal of Applied Entomology**, 124(9-10), 375–380.
- Ji, D., Yi, Y., Kang, G. H., Choi, Y. H., Kim, P., Baek, N. I. and Kim, Y. (2004). Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, 239, 241-248.
- Jian, H., Reid, A. P. and Hunt, D. J. (1997). *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic from north east China. **Systematic Parasitology**, 37, 115-125.
- Kanga, F. N., Trinh, P. Q., Waeyenberge, L., Spiridonov, S. E., Hauser, S. and Moens, M. (2012). Two new species of *Steinernema* Travassos, 1927 from the humid forest of southern Cameroon. **Russian Journal of Nematology**, 20(1), 15-36.
- Karimi, J., Kharazi-Pakdel, A., Yoshiga, T., Koohi Habibi, M. and Hassani-Kakhki, M. (2011). Characterization of *Xenorhabdus* (γ -Proteobacteria) strains associated bacteria with the Steinernema (Nematoda: Steinernematidae) isolates from Iran. **Journal of Entomological Society of Iran**, 31(1), 57-69.
- Kary, N. E., Niknam, Gh., Griffin, C. T., Mohammadi, S. A. and Mohammadi, M. (2009). A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the North-West of Iran. **Nematology**, 11(1), 107-116.
- Kaya, H. K. (1990). Soil ecology. In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control** (pp. 93-115). Florida: CRC Press.
- Kaya, H. K. (1977). Development of the DD-136 strain of *Neoplectana carpocapsae* at constant temperatures. **Journal of nematology**, 9, 346-349.
- Kaya, H. K. and Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, 38, 181-206.
- Kaya, H. K. and Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. In L. Lacey (Ed.) (pp. 281-324). San Diego California: Academic Press.
- Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Spiridonov, S., Manandhar, H. K. and Moens, M. (2011a). Two new species of *Steinernema* Travassos, 1927 with short infective juveniles from Nepal. **Russian Journal of Nematology**, 19(1), 53-74.
- Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Spiridonov, S., Manandhar, H. K. and Moens, M. (2011b). *Steinernema everestense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from Pakhribas, Dhankuta, Nepal. **Nematology**, 13(4), 443-462.

- Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Spiridonov, S., Manandhar, H. K. and Moens, M. (2011c). *Steinernema lamjungense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from Lamjung district, Nepal. **Nematology**, 13(5), 589-605.
- Koppenhofer, A. M., Kaya, H. K. and Taormino, S. (1995). Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. **Journal of Invertebrate Pathology**, 65, 193-199.
- Kumar, K. S. V., Vendan, K. T. and Nagaraj, S. B. (2014). Isolation and Characterization of Entomopathogenic Symbiotic Bacterium, *Photorhabdus luminescens* of *Heterorhabditis indica* from Soils of Five Agro Climatic Zones of Karnataka. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, 11(1), 129-139.
- Kung, S. P., Gaugler, R. and Kaya, H. K. (1990). Influence of Soil pH and Oxygen on Persistence of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology**, 22(4), 440-445.
- Kung, S. P., Gaugler, R. and Kaya, H. K. (1991). Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, 57, 242-249.
- Kuwata, R., Qiu, L. H., Wang, W., Harada, Y., Yoshida, M., Kondo, E., et al. (2013). *Xenorhabdus ishibashii* sp. nov., isolated from the entomopathogenic nematode *Steinernema aciari*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 63(5), 1690-1695.
- Kuwata, R., Shigematsu, M., Yoshiga, T., Yoshida, M. and Kondo, E. (2006). Phylogenetic analyses of Japanese Steinernematid nematodes and their associating *Xenorhabdus* bacteria. **Japanese Journal of Nematology**, 36(2), 75-85.
- Kwon, B. and Kim, Y. (2008). Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**. 101(1), 36-41.
- Lang, G., Kalvelage, T., Peters, A., Wiese, J. and Imhoff, J. F. (2008). Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. **Journal of Natural Products**, 71, 1074-1077.
- Lee, M. M., Sicard, M., Skeie, M. and Stock, S. P. (2009). *Steinernema boemarei* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern France. **Systematic Parasitology**, 72(2), 127-141.
- Lee, M. M. and Stock, S. P. (2010a). A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (γ -Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, 77, 1-12.

- Lee, M. M. and Stock, S. P. (2010b). A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (Gamma-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, 104, 67-74.
- Lengyel, K., Lang, E., Fodor, A., Szallas, E., Schumann, P. and Stackebrandt, E. (2005). Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov. *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, 28, 115-122.
- Liu, J. and Berry, R. E. (1996a). *Steinernema oregonensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Oregon, USA. **Fundamental and Applied Nematology**, 19, 375-380.
- Liu, J. and Berry, R. E. (1996b). *Heterorhabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Oregon. **Journal of Invertebrate Pathology**, 67, 48-54.
- Liu, J., Berry, R., Poinar, G. and Moldenke, A. (1997). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Species and Strains as Determined by Comparison of Partial 16s rRNA Gene Sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 47(4), 948-951.
- Li, J., Chen, G. and Webster, J. M. (1996). N-(Indol-3-ylethyl)-2'-hydroxy-3'-methylpentanamide, a Novel Indole Derivative from *Xenorhabdus nematophilus*. **Journal of Natural Products**, 59, 1157-1158.
- Li, J. X., Chen, G. H., Wu, H. M. and Webster, J. M. (1995). Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. **Journal of Natural Products**, 58, 1081-1086.
- López-Núñez, J. C., Cano, L., Gongora-B, C. E. and Stock, S. P. (2007). Diversity and evolutionary relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. **Nematology**, 9(3), 333-341.
- López-Núñez, J. C., Plichta, K., Gongora Botero, C. E. and Stock, P. S. (2008). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. Nematoda: Steinernematidae, from Colombia. **Nematology**, 10(4), 561-574.
- Lloyd, A. T. and Sharp, P. M. (1993). Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, 37, 399-407.
- Luc, P. V., Nguyen, K. B., Reid, A. P. and Spiridonov, S. E. (2000). *Steinernema tami* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Cat Tien Forest, Vietnam. **Russian Journal of Nematology**, 8, 33-43.

- Ma, J., Chen, S., Clercq, P. D., Han, R. and Moens, M. (2012a). *Steinernema changbaiense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematodes from Northeast China. **Russian Journal of Nematology**, 20(2), 97-112.
- Ma, J., Chen, S., Clercq, P. D., Waeyenberge, L., Han, R. and Moens, M. (2012b). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema xinbinense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), from north China, **Nematology**, 14(6), 723-736.
- Ma, J., Chen, S., Li, X., Han, R., Khatri-Chhetri, H. B., Clercq, P. D. and Moens, M. (2012c). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema tielingense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), from north China **Nematology**, 14(3), 321-338.
- Malan, A. P., Knoetze, R. and Tiedt, L. (2014). *Heterorhabditis noenieputensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Journal of Helminthology**, 88(2), 139-151.
- Malan, A. P., Knoetze, R. and Tiedt, L. (2015). *Steinernema jeffreyense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Journal of Helminthology**, 11, 1-17.
- Malan, A. P., Nguyen, K. B., Waal, J. Y. de. and Tiedt, L. (2008). *Heterorhabditis safricana* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**, 10, 381-396.
- Mamiya, Y. (1988). *Steinernema kushidai* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoka, Japan. **Applied Entomology and Zoology**, 23, 313-320.
- Maneesakorn, P., An, R., Daneshvar, H., Taylor, K., Bai, X., Adam, B. J., et al. (2011). Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis*: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (*Photorhabdus*: Enterobacteriaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 59, 271-280.
- Maneesakorn, P., Grewal, P. S. and Chandrapatya, A. (2010). *Steinernema minutum* sp. nov. (Rhabditida: Steinernematidae): A new entomopathogenic nematode from Thailand. **International Journal of Nematology**, 20, 27-42.
- Mason, J. M. and Hominick, W. M. (1995). The effect of temperature on infection, development and reproduction of *Heterorhabditids*. **Journal of Helminthology**, 69, 337-345.
- McInerney, B. V., Taylor, W. C., Lacey, M. J., Akhurst, R. J. and Gregson, R. P. (1991). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. **Journal of Natural Products**, 54, 785-795.

- Molyneux, A. S. (1986). *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. temperature and aspects of behaviour and infectivity. **Experimental Parasitology**, 62, 169-180.
- Molyneux, A. S. and Bedding, R. A. (1984). Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blow fly *Lucilia cuprina*. **Nematologica**, 3, 358-356.
- Mráček, Z., Hernandez, E. A. and Boemare, N. E. (1994). *Steinernema cubana* sp. (Nematoda Rhabditida: Steinernematidae) and the preliminary characterization of its associated bacterium. **Journal of Invertebrate Pathology**, 64, 123-129.
- Mráček, Z., Nguyen, K. B., Tailliez, P., Boemare, N. and Chen, Sh. (2006). *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, East Tibetan Mts., China. **Journal of Invertebrate Pathology**, 93, 157-169.
- Mráček, Z., Qi-Zhi, L. and Nguyen, K. B. (2009). *Steinernema xueshanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Yunnan, southeast Tibetan Mts., China. **Journal of Invertebrate Pathology**, 102(1), 69-78.
- Mráček, Z., Sturhan, D. and Reid, A. (2003). *Steinernema weiseri* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. **Systematic Parasitology**, 56, 37-47.
- Nasmith, C. G., Speranzini, D., Jeng, R. and Hubbes, M. (1996). RFLP analysis of PCR-amplified ITS and 26S ribosomal RNA genes of selected entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Journal of Nematology**, 28, 15-25.
- Nguyen, K. B. (Jan 29, 2010). **Morphology and Taxonomy of Entomopathogenic nematodes: Species of *Steinernema***. Retrieved December 18, 2014, from <http://entnemdept.ufl.edu/nguyen/morph/steinsp1.htm>.
- Nguyen, K. B. and Buss, E. A. (2011). *Steinernema phyllophagae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Florida, USA. **Nematology**, 13(4), 425-442.
- Nguyen, K. B. and Duncan, L. W. (2002). *Steinernema diaprepese* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a parasite of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L.). **Journal of Nematology**, 34, 159-170.
- Nguyen, K. B. and Smart, G. C. Jr. (1990). *Steinernema scapterisci* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda). **Journal of Nematology**, 22, 187-199.
- Nguyen, K. B. and Smart, G. C. Jr. (1992). *Steinernema neocurtillis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) and a key to species of the genus *Steinernema*. **Journal of nematology**, 24, 463-477.

- Nguyen, K. B. and Smart, G. C. Jr. (1996). Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). **Journal of Nematology**, 28, 286-300.
- Nguyen, K. B., Ginarte, C. M., Leite, L. G., Santos, J. M. and Harakava, R. (2010). *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 103, 8-20.
- Nguyen, K. B., Gozel, U., Koppenhöfer, H. S., and Adams, B. J. (2006). *Heterorhabditis floridensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Florida. **Zootaxa**, 1177, 1-19.
- Nguyen, K. B., Malan, A. P. and Gozel, U. (2006a). *Steinernema khoisanae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**, 8, 157-175.
- Nguyen, K. B., Maruniak, J. and Adams, B. J. (2001). Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. **Journal of Nematology**, 33, 73-82.
- Nguyen, K. B., Puza, V. and Mráček, Z. (2008). *Steinernema cholashanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, Chola Shan Mts., China. **Journal of Invertebrate Pathology**, 97(3), 251-264.
- Nguyen, K. B., Qiu, L., Zhou, Y. and Pang, Y. (2006b). *Steinernema leizhouense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China. **Russian Journal of Nematology**, 14, 101-118.
- Nguyen, K. B., Shapiro-Ilan, D. I., Stuart, R.J., McCoy, C. W., James, R. R. and Adams, B. J. (2004). *Heterorhabditis mexicana* sp. (Heterorhabditidae: Rhabditida) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. **Nematology**, 6, 231-244.
- Nguyen, K. B., Stuart, R., Andallo, V., Gozel, U. and Roger, M. E. (2007). *Steinernema texanum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Texas, USA. **Nematology**, 9, 379-396.
- Nguyen, K. B., Tesfamariam, M., Gozel, U., Gaugler, R. and Adams, B. J. (2005). *Steinernema yirgalemense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Ethiopia. **Nematology**, 6, 839-856.
- Nikdel, M., Niknam, G. and Ye, W. (2011). *Steinernema arasbaranense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from arasbaran forests, Iran. **Nematologia Mediterranea**, 39, 17-28.

- Nishimura, Y., Hagiwara, A., Suzuki, T. and Yamanaka, S. (1994). *Xenorhabdus japonicus* sp. nov. associated with the nematode *Steinernema kushidai*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 10, 207-210.
- Nthenga, I., Knoetze, R., Berry, S., Tiedt, L. R. and Malan, A. P. (2014). *Steinernema sacchari* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**, 16(4), 475-494.
- Orozco, R. A., Hill, T. and Stock, S. P. (2013). Characterization and Phylogenetic Relationships of *Photorhabdus* subsp. *sonorensis* (γ -Proteobacteria: Enterobacteriaceae), the Bacterial symbiont of Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematode: Heterorhabditidae). **Current Microbiology**, 61, 291-297.
- Phan, K. L., Mráček, Z., Puza, V., Nermut, J. and Jarosova, A. (2014). *Steinernema huense* sp. n., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from Vietnam. **Nematology**, 16, 761-775.
- Phan, K.L., Nguyen, N.C. and Moens, M. (2001a). *Steinernema loci* sp. n. and *Steinernema thanhi* sp n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. **Nematology**, 3, 503-514.
- Phan, K.L., Nguyen, N.C. and Moens, M. (2001b). *Steinernema sangi* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. **Russian Journal of Nematology**, 9, 1-7.
- Phan, K. L., Spiridonov, S. E., Subbotin, S. A. and Moens, M. (2006a). Four new species of *Steinernema* Travassos, 1928 with short infective juveniles from Vietnam. **Russian Journal of Nematology**, 14, 11-29.
- Phan K. L., Subbotin S. A., Nguyen N. C. and Moens, M. (2003). *Heterorhabditis baujardi* n. sp. (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. **Nematology**, 5, 367-382.
- Phan, L. K., Subbotin, S. A., Waeyenberge, L. and Moens, M. (2005). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema robustispiculum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), from Chumomray National Park in Vietnam. **Systematic Parasitology**, 60, 23-32.
- Phan, L. K., Takemoto, S. and Futai, K. (2006b). *Steinernema ashiuense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan. **Nematology**, 8, 681-690.
- Pizano, G. A., Agullera, M. M., Monterio, A. R. and Ferroy, L. C. C. B. (1985). Incidente de *Neoaplectana glaeri* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) Parasitan ob ovo de *Migdolus frynus* (West wood, 1963) (Coleoptera: Cerambycidae). **Society of Brazilian Nematology**, 1, 13-15.

- Plichta, K. L., Joyce, S. A., Clarke, D., Waterfield, N. and Stock, S. P. (2009). *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): The hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: Gamma-Proteobacteria). **Journal of Helminthology**, 83, 309-320.
- Poinar, G. O. Jr. (Ed.). (1979). **Nematodes for biological control of insects**. (unpaged), Boca Raton, Florida, U.S.A: CRC Press.
- Poinar, G. O. Jr. (1985). *Neoaplectana intermedia* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda) from South Carolina. **Revue de Nematology**, 8, 321-327.
- Poinar, G.O. Jr. (1990). Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, USA: FL CRC Press.
- Poinar, G. O. Jr. (1990). Biology and Taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae, In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control** (pp. 23-61), Boca Raton, Florida, U.S.A: CRC Press.
- Poinar, G. O. Jr. (1986). *Neoaplectanana intermedia* n.sp. (Steinernematidae: Nematoda) from South Carolina. **Revue de Nematologie**, 8, 321-327.
- Poinar, G. O. Jr., Karunakar, G. K. and David, H. (1992). *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida: Nematoda) from India: Separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. **Fundamental and Applied Nematology**, 15(5), 467-472.
- Poinar, G. O. Jr. and Himswok, H. P. T. (1967). Neoaplectazza parasitism of larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). **Journal of Invertebrate Pathology**, 9, 241-246.
- Poinar, G.O. Jr. and Thomas, G. M. (1966). Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136. **Parasitology**, 56, 385-390.
- Poinar, G.O. Jr. and Thomas, G.M. (1990). Taxonomy and biology of steinernematidae and Heterorhabditidae. In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control** (pp. 23-61). Boston: CRC Press.
- Poinar, G. O. Jr., Thomas, G. M. and Hess, R. (1976). Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. Fam.). **Nematologica**, 21, 463-470.
- Putz, J., Meinert, F., Wyss, U., Ehlers, R. U. and Stackebrandt, E. (1990). Development and application of oligonucleotide probes for molecular identification of *Xenorhabdus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(1), 181-186.

- Qiu, L., Fang, Y., Zhou, Y., Pang, Y. and Nguyen, K. B. (2004). *Steinernema guangdongense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China with a note on *S. serratum* (nomen nudum). **Zootaxa**, 704, 1-20.
- Qiu, L., Hu, X., Zhou, Y., Mei, S., Nguyen, K.B. and Pang, Y. (2005). *Steinernema akhursti* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from Yunnan, China. **Journal of Invertebrate Pathology**, 90, 151-160.
- Qiu L., Hu, X., Zhou, Y., Pang, Y. and Nguyen, K. B. (2005a). *Steinernema beddingi* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunan, China. **Nematology**, 7, 737-749.
- Qiu, L., Yan, X., Zhou, Y., Nguyen, K.B. and Pang, Y. (2005b). *Steinernema aciari* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Guangdong, China. **Journal of Invertebrate Pathology**, 88, 58-69.
- Qiu, L., Zhao, J., Wu, Z., LV, Z. and Pang, Y. (2011). *Steinernema pui* sp. n. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunnan, China. **Zootaxa**, 2767, 1-13.
- Rainey, F. A., Ehlers, R. U. and Stackebrandt, E. (1995). Inability of the polyphasic approach to systematics to determine the relatedness of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 45, 379-381.
- Reid, A. P. and Hominick, W. M. (1992). Restriction fragment length polymorphisms within the ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **Parasitology**, 105(2), 317-323.
- Román, J. and Figueroa, W. (1994). *Steinernema puertoricensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, 78, 167-175.
- Shahina, F., Anis, M., Reid, A. P., Rowe, J. and Maqbool, M. A. (2001). *Steinernema pakistanense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan. **International Journal of Nematology**, 11, 124-133.
- Shahina, F., Anis, M., Zainab, S. and Maqbool, M. A. (1998). Entomopathogenic nematodes in soil samples collected from Sindh, Pakistan. **Pakistan Journal of Nematology**, 16(1), 41-50.
- Shamseldean, M. M., Abou El-Sooud, A. B., Abd-Elgawad, M. M., and Saleh, M. M. (1996). Identification of a new heterorhabditid species from Egypt, *Heterorhabditis taysearae*, n. sp. (Rhabditroa: Heterorhabditidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, 6, 129-138.

- Shen, C.P. and Wang, G.H. (1991). Description and study of an entomopathogenic nematode: *Steinernema longicaudum* sp. nov. In **Proceedings of the First National Academy Symposium. Young and Middle Aged Science and Technology Works, Plant Protection** (pp. 220-231). Beijing: Chinese Science and Technology Press.
- Smits, P. H. (1996). Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, 6, 379-387.
- Somvanshi, V. S., Lang, E., Ganguly, S., Swiderski, J., Saxena, A. K. and Stackebrandt, E. (2006). A novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus indica* sp. nov., symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum* Ganguly and Singh, 2000. **Systematic and Applied Microbiology**, 29, 519-525.
- Spiridonov, S. E., Krasomil-Osterfeld, K. and Moens, M. (2004). *Steinernema jolietii* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from the American Midwest. **Russian Journal of Nematology**, 12, 85-95.
- Spiridonov, S. E., Moens, M. (1999). Two previously unreported species of steinernematids from woodlands in Belgium. **Russian Journal of Nematology**, 7, 39-42.
- Spiridonov, S. E., Waeyenberge, L. and Moens, M. (2010). *Steinernema schliemanni* sp. n. (Steinernematidae; Rhabditida), a new species of Steinernematids of the 'monticulum' group from Europe. **Russian Journal of Nematology**, 18(2), 175-190.
- Stock, S. P. (1993). A new species of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Nematoda: Heterorhabditidae) parasitizing *Graphognathus* sp. larvae (Coleoptera: Curculionidae) from Argentina. **Research and Reviews in Parasitology**, 53(3-4), 103-107.
- Stock, S. P. and Koppenhofer, A. M. (2003). *Steinernema scarabaei* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) from New Jersey, USA. **Nematology**, 5, 191-204.
- Stock, S. P., Strong, D. R. and Gardner, S. L. (1996). Identification of *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from California with a new species isolated from the larvae of the ghost moth *Hepialis californicus* (Lepidoptera: Hepialidae) from the Bodega Bay Natural Reserve. **Fundamental and Applied Nematology**, 19, 585-592.
- Stock, S. P., Campbell, J. F. and Nadler, S. A. (2001). Phylogeny of *Steinernema* Travassos 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**, 87, 877-889.
- Stock, S. P., Choo, H. Y. and Kaya, H. K. (1997). An entomopathogenic nematode *Steinernema monticulum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. **Nematologica**, 43, 15-29.

- Stock, S. P., Griffin, C.T, and Burnell, A. M. (2002). Morphological characterisation of three isolates of *Heterorhabditis* Poinar, 1976 from the Irish group (Nematoda: Rhabditida: Heterorhabditidae) and additional evidence supporting their recognition as a distinct species, *H. downesi* n. sp. **Systematic Parasitology**, 51, 95-106.
- Stock, S. P., Griffin, C. T. and Chaerani, R. (2004). Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. **Nematology**, 6, 401 - 412.
- Stock, P. S., Pryor, B. M. and Kaya, H. K. (1999). Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA). **Biodiversity and Conservation**, 8, 535-549.
- Stock, S. P., Rivera-Orduno, B. and Flores-Lara, Y. (2009). *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae) in natural habitats in California. **Journal of Invertebrate Pathology**, 100, 175-184.
- Stock, S. P., Somsook, V. and Reid, A. P. (1998). *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. **Systematic Parasitology**, 41, 105-113.
- Stokwe, N. F., Malan, A. P., Nguyen, K. B., Knoetze, R. and Tiedt, L. (2011). *Steinernema citrae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**, 13(5), 569-587.
- Stuart, R. J. and Gaugler, R. (1994). Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, 64, 39-45.
- Sturhan, D., Spiridonov, S. E. and Mráček Z. (2005). *Steinernema silvaticum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. **Nematology**, 7, 227-241.
- Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S. and Boemare, N. (2010). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khani* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 60, 1921-1937.

- Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S. and Boemare, N. (2010). Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 60, 1921-1937.
- Tailliez, P., Pages, S., Edgington, S., Tymo, L. M. and Buddie, A. G. (2012). Description of *Xenorhabdus magdalenensis* sp. nov., the symbiotic bacterium associated with *Steinernema austral*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 62, 1761-1765.
- Tailliez, P., Pages, S., Ginibre, N. and Boemare, N. (2006). New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56, 2805-2818.
- Tallosi, B. and Ehlers, R. (1995). *Steinernema bicornutum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vojvodina, Yugoslavia. **Russian Journal of Nematology**, 3, 71-80.
- Tamiru, T., Waeyenberge, L., Hailu, T., Ehlers, R. U., Puza, V. and Mráček, Z. (2012). *Steinernema ethiopiense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Ethiopia. **Nematology**, 14(6), 741-757.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30, 2725-2729.
- Tangchitsomkid, N. and Sontirat, S. (1998). Occurrence of Entomopathogenic Nematodes in Thailand. **Kasetsart Journal, Natural Sciences**, 32(3), 347-354.
- Tarasco, E., Mráček, Z., Nguyen, K. B., Triggiani, O. (2008). *Steinernema ichnusae* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Sardinia Island (Italy). **Journal of Invertebrate Pathology**, 99, 173-185.
- Thanwisai, A. (2012). **Isolation of entomopathogenic nematodes and associated *Xenorhabdus/Photorhabdus* spp. In Thailand.** Doctoral dissertation, Ph. D., Mahidol University, Bangkok.
- Thanwisai, A., Tandhavanant, S., Saiprom, N., Waterfield, N. R., Ke Long, P., Bode, H. B., et al. (2012). Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and their symbiotic entomopathogenic nematodes from Thailand. **Plos One**, 7(9), e43835.
- Thomas, G. M. and Poinar, G. O. Jr. (1979). *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 29, 352-360.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22(22), 4673-4680.
- Tóth, T. and Lakatos, T. (2008). *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis* nematodes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58, 2579-2581.
- Travassos, L. (1927). Sobre ogenera Oxysomatium. **Boletim. Biologico**, 5, 20-21.
- Triggiani, O., Mráček, Z., Reid, A., (2004). *Steinernema apuliae* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae): a new entomopathogenic nematode from southern Italy. **Zootaxa**, 460, 1-12.
- Uribe-Lorío, L., Mora, M. and Stock, S. P. (2007). *Steinernema costaricense* n. sp. and *Steinernema puntauvense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), two new entomopathogenic nematodes from Costa Rica. **Systematic Parasitology**, 68, 167-172.
- Wallace, H. R. (1958). Movement of eelworms. **Annals of Applied Biology**, 46, 74-85.
- Waturu, C. N., Hunt, D.J. and Reid, A. P. (1997). *Steinernema kariii* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Kenya. **International Journal of Nematology**, 7, 68-75.
- Webster, J. M., Chen, G., Hu, K. and Li, J. (2002). Bacterial metabolites. In R. Gaugler (Ed), **Entomopathogenic Nematology**. (pp. 99-114). UK: CAB International.
- Weiser, J. (1955). *Neoplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillulata: Steinernematidae) Novycizopasnik housenik Oválese jableeneho, *Carpapsa pomonella* L. Vest. Ceskoslov. **Spolecnosti Zoology**, 19, 44-52.
- Weissfeld, A. S., Halliday, R. J., Simmons, D. E., Trevino, E. A., Vance, P. H., Caroline, M., et al. (2005). *Photorhabdus asymbiotica*, a pathogen emerging on two continents that proves that there is no substitute for a well-trained clinical microbiologist. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 4152-4155.
- White, G.F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, 66, 302-303.
- Wouts, W. M., Mráček, Z., Gerdin, S. and Bedding, R. A. (1982). *Neoplectana* Steiner, 1929, a junior synonym of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Rhabditida). **Systematic Parasitology**, 4, 147-154.
- Xu, Z., Wang, G. and Li, X. (1991). A new species of the genus *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). **Zoological Research**, 12, 17-20.

ภาคผนวก ก

การติดต่อประสานงานกับหัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
การเก็บตัวอย่างดิน วัดและจุดบันทึกปัจจัยทางกายภาพของตัวอย่างดิน



ภาพ 1 ติดต่อประสานงานกับหัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



ภาพ 2 พื้นที่ช่องเย็น ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



ภาพ 3 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



ภาพ 4 เก็บตัวอย่างดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติบริเวณช่องเย็นในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



ภาพ 5 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



ภาพ 6 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



ภาพ 7 การวัดปัจจัยทางกายของตัวอย่างดิน



ภาพ 8 จัดบันทึกปัจจัยทางกายของตัวอย่างดิน

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
ตั้งแต่วันที่ 2 สิงหาคม 2557 ถึงวันที่ 24 กรกฎาคม 2558

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
2/8/2557	13.35	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW1	1	N 15° 10' 40.1"	7.0	30	1.0	ร่วน
				2	E 101° 44' 42.1"	7.0	30	1.0	ร่วน
				3		7.0	31	1.0	ร่วน
				4	Elev= 244 m	6.8	30	1.0	ร่วน
				5		6.8	29	1.0	ร่วน
2/8/2557	13.42	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW2	1	N 16° 62' 27.0"	7.0	29	1.0	ร่วน
				2	E 099° 13' 59.2"	6.8	29	1.0	ร่วน
				3		6.8	29	1.0	ร่วน
				4	Elev= 270 m	6.8	28	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน
2/8/2557	13.52	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW3	1	N 16° 02' 27.7"	6.8	29	2.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 01.5"	6.8	28	2.0	ร่วน
				3		6.8	28	1.0	ร่วน
				4	Elev= 316 m	6.8	28	1.5	ร่วน
				5		6.8	28	2.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
2/8/2557	14.00	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW4	1	N 16° 02' 27.0"	7.0	29	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 07.0"	6.8	29	1.5	ร่วน
				3		7.0	28	1.0	ร่วน
				4	Elev= 304 m	6.8	28	1.5	ร่วน
				5		6.8	28	2.0	ร่วน
2/8/2557	14.11	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW5	1	N 16° 02' 31.7"	7.0	29	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 11.5"	6.8	29	1.0	ร่วน
				3		6.8	28	1.5	ร่วน
				4	Elev= 293 m	6.8	28	2.0	ร่วน
				5		6.8	28	2.0	ร่วน
2/8/2557	14.19	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW6	1	N 16° 02' 36.2"	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 11.0"	7.0	27	1.5	ร่วน
				3		6.8	27	1.5	ร่วน
				4	Elev= 318 m	6.8	28	1.5	ร่วน
				5		6.8	28	1.5	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
2/8/2557	14.29	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW7	1	N 16° 02' 41.5"	6.8	28	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 11.8"	6.8	28	2.5	ร่วน
				3		6.4	27	1.0	ร่วน
				4		7.0	29	1.0	ร่วน
				5		6.8	29	1.5	ร่วน
2/8/2557	14.47	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW8	1	N 16° 02' 46.8"	6.8	31	1.0	ร่วน
				2	E 16° 14' 06.0"	7.0	29	1.0	ร่วน
				3		6.8	28	1.0	ร่วน
				4	Elev= 309 m	6.8	28	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน
17/1/2558	9.39	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW9	1	-	7.0	20	1.0	ร่วน
				2		7.0	20	1.0	ร่วน
				3		7.0	20	1.0	ร่วน
				4		7.0	19	1.0	ร่วน
				5		7.0	19	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
17/1/2558	9.45	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW10	1	-	7.0	20	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	20	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	24	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	21	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	23	1.0	ร่วน
17/1/2558	10.00	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW11	1	-	7.0	23	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	19	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	21	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	20	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	20	1.0	ร่วน
17/1/2558	10.05	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW12	1	-	6.8	18	1.5	ร่วน
				2	-	6.8	18	1.5	ร่วน
				3	-	7.0	21	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	19	1.0	ร่วน
				5	-	6.8	18	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
17/1/2558	10.10	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW13	1	-	7.0	17	1.0	ร่วน
				2	-	6.9	18	1.0	ร่วน
				3	-	6.8	20	1.5	ร่วน
				4	-	7.0	18	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	20	1.0	ร่วน
17/1/2558	10.16	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW14	1	-	6.6	21	2.0	ร่วน
				2	-	6.8	21	2.0	ร่วน
				3	-	7.0	22	1.0	ร่วน
				4	-	6.8	21	1.5	ร่วน
				5	-	6.9	21	1.5	ร่วน
17/1/2558	10.30	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW15	1	-	6.9	20	1.5	ร่วน
				2	-	7.0	20	1.0	ร่วน
				3	-	6.8	21	1.5	ร่วน
				4	-	7.0	20	1.0	ร่วน
				5	-	6.9	21	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
17/1/2558	10.35	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW16	1	-	6.8	20	1.0	ร่วน
				2	-	6.8	20	1.5	ร่วน
				3	-	6.9	21	1.0	ร่วน
				4	-	6.8	19	1.5	ร่วน
				5	-	6.8	21	1.5	ร่วน
17/1/2558	10.43	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW17	1	-	6.5	17	2.5	ร่วน
				2	-	6.8	17	2.0	ร่วน
				3	-	6.8	20	1.5	ร่วน
				4	-	6.6	17	2.0	ร่วน
				5	-	6.7	18	2.0	ร่วน
17/1/2558	10.50	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW18	1	-	7.0	19	1.0	ร่วน
				2	-	6.8	18	1.5	ร่วน
				3	-	6.8	22	1.5	ร่วน
				4	-	7.0	18	1.0	ร่วน
				5	-	6.8	18	1.5	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
17/1/2558	11.05	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW19	1	-	6.9	20	1.5	ร่วน
				2		7.0	20	1.0	ร่วน
				3		6.8	22	1.5	ร่วน
				4		6.9	21	1.0	ร่วน
				5		6.9	21	1.0	ร่วน
17/1/2558	11.20	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW20	1	-	6.9	20	1.5	ร่วน
				2		6.8	20	1.5	ร่วน
				3		6.9	22	1.5	ร่วน
				4		6.8	23	2.0	ร่วน
				5		6.8	23	1.5	ร่วน
17/1/2558	11.25	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW21	1	-	6.9	19	1.5	ร่วน
				2		6.8	18	2	ร่วน
				3		6.9	22	1.5	ร่วน
				4		6.8	17	1.5	ร่วน
				5		6.9	19	1.5	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
17/1/2558	11.35	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW22	1	-	7.0	18	1.0	ร่วน
				2		7.0	18	1.5	ร่วน
				3		7.0	22	1.5	ร่วน
				4		6.9	16	1.5	ร่วน
				5		7.0	21	1.0	ร่วน
17/1/2558	11.55	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW23	1	-	6.8	18	1.5	ร่วน
				2		6.8	18	1.5	ร่วน
				3		6.9	22	1.5	ร่วน
				4		6.8	20	2.0	ร่วน
				5		6.8	17	2.0	ร่วน
17/1/2558	12.55	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW24	1	-	7.0	17	1.0	ร่วนปนทราย
				2		6.8	17	1.5	ร่วน
				3		6.8	17	2.5	ร่วน
				4		6.8	17	1.5	ร่วน
				5		7.0	18	1.5	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
17/1/2558	12.15	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW25	1	-	6.8	18	1.5	ร่วน
				2		6.9	14	1.5	ร่วน
				3		7.0	20	1.0	ร่วน
				4		6.8	14	1.0	ร่วน
				5		6.9	14	1.5	ร่วน
17/1/2558	12.20	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW26	1	-	6.8	15	1.5	ร่วน
				2		6.9	15	1.5	ร่วน
				3		6.9	15	1.0	ร่วน
				4		6.8	15	1.5	ร่วน
				5		6.8	15	2.0	ร่วน
17/1/2558	13.10	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW27	1	-	6.8	17	2.0	ร่วน
				2		6.8	17	1.5	ร่วน
				3		6.8	18	2.0	ร่วน
				4		6.8	17	1.5	ทราย
				5		6.9	17	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
17/1/2558	12.30	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW28	1	-	7.0	15	1.0	ร่วนปนทราย
				2		6.9	14	1.5	ร่วน
				3		6.8	16	1.5	ร่วนปนทราย
				4		6.6	15	2.0	ร่วนปนทราย
				5		6.8	15	1.5	ร่วน
17/1/2558	12.35	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW29	1	-	6.9	14	1.5	ร่วนปนทราย
				2		6.8	15	1.5	ร่วนปนทราย
				3		6.8	15	1.5	ร่วนปนทราย
				4		6.8	14	1.5	ร่วนปนทราย
				5		7.0	15	1.5	ร่วนปนทราย
17/1/2558	12.40	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW30	1	-	6.8	14	2.0	ร่วนปนทราย
				2		6.9	14	1.5	ร่วนปนทราย
				3		7.0	15	1.0	ร่วนปนทราย
				4		6.6	14	3.0	ร่วน
				5		7.0	16	1.0	ทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	9.45	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW31	1	N 16° 02' 15.1"	7.0	26	1.0	ร่วน
				2	E 099° 16' 46.3"	7.0	27	1.0	ร่วน
				3		7.0	26	1.0	ร่วน
				4	Elev= 218 m	7.0	27	1.0	ร่วน
				5		7.0	26	1.0	ร่วน
8/7/2558	9.46	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW32	1	N 16° 02' 15.9"	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	E 099° 16' 46.3"	7.0	27	1.0	ร่วน
				3		7.0	28	1.0	ร่วน
				4	Elev= 218 m	7.0	27	1.0	ร่วน
				5		7.0	26	1.0	ร่วน
8/7/2558	9.55	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW33	1	N 16° 02' 32.5"	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 12.0"	7.0	27	1.0	ร่วน
				3		7.0	27	1.0	ร่วน
				4	Elev= 216 m	7.0	27	1.0	ร่วน
				5		7.0	27	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	9.57	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW34	1	N 16° 02' 32.6"	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 12.1"	7.0	27	1.0	ร่วน
				3		7.0	27	1.0	ร่วน
				4	Elev= 216 m	7.0	28	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	10.05	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW35	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2		7.0	27	1.0	ร่วน
				3		7.0	27	1.0	ร่วน
				4		7.0	27	1.0	ร่วน
				5		7.0	27	1.0	ร่วน
8/7/2558	10.07	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW36	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2		7.0	28	1.0	ร่วน
				3		7.0	27	1.0	ร่วน
				4		7.0	27	1.0	ร่วน
				5		7.0	27	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	10.16	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW37	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	27	1.0	ร่วน
8/7/2558	10.20	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW38	1	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				2	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	27	1.0	ร่วน
8/7/2558	10.25	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW39	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	27	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	10.27	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW40	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2		7.0	28	1.0	ร่วน
				3		7.0	27	1.0	ร่วน
				4		7.0	27	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	10.35	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW41	1	-	7.0	27	1.5	ร่วน
				2		6.8	27	1.5	ร่วน
				3		6.9	27	1.0	ร่วน
				4		6.9	27	1.5	ร่วน
				5		6.8	27	1.5	ร่วน
8/7/2558	10.35	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW42	1	-	7.1	27	1.5	ร่วน
				2		7.1	28	1.0	ร่วน
				3		7.0	28	1.0	ร่วน
				4		7.0	28	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	10.46	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW43	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	10.48	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW44	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	27	1.0	ร่วน
8/7/2558	10.59	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW45	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	28	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	10.59	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW46	1	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				2		7.0	28	1.0	ร่วน
				3		7.0	28	1.0	ร่วน
				4		7.0	28	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	11.05	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW47	1	-	7.0	29	1.0	ร่วน
				2		7.0	29	1.0	ร่วน
				3		7.0	29	1.0	ร่วน
				4		7.0	28	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	11.08	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW48	1	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				2		7.0	28	1.0	ร่วน
				3		7.0	28	1.0	ร่วน
				4		7.0	28	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	11.12	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW49	1	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				3	-	6.8	28	1.5	ร่วน
				4	-	6.8	28	1.5	ร่วน
				5	-	7.0	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	11.14	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW50	1	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	29	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				4	-	6.9	28	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	28	1.5	ร่วน
8/7/2558	13.15	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW51	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	28	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	13.15	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW52	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	-	7.1	27	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	13.45	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW53	1	-	7.0	27	1.5	ร่วนปนหิน
				2	-	7.0	27	1.5	ร่วนปนหิน
				3	-	7.0	26	1.0	ร่วนปนทราย
				4	-	6.8	27	1.5	ร่วน
				5	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
8/7/2558	13.45	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW54	1	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				3	-	7.0	27	1.5	ร่วนปนทราย
				4	-	6.9	27	1.5	ร่วน
				5	-	6.8	27	1.5	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	13.55	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW55	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2		7.0	27	1.0	ร่วน
				3		7.0	27	1.0	ร่วน
				4		7.0	27	1.0	ร่วน
				5		7.0	27	1.0	ร่วน
8/7/2558	13.55	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW56	1	-	6.9	27	1.0	ร่วน
				2		7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				3		7.0	28	1.0	ร่วน
				4		7.0	28	1.0	ร่วน
				5		6.8	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	14.07	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW57	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2		7.0	27	1.0	ร่วน
				3		7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				4		7.0	27	1.5	ร่วน
				5		7.0	27	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	14.07	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW58	1	-	7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				2	-	7.0	28	1.5	ร่วนปนทราย
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				4	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				5	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
8/7/2558	14.15	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW59	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				4	-	7.0	26	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	27	1.0	ร่วน
8/7/2558	14.15	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW60	1	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				4	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				5	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	14.33	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW61	1	-	7.0	29	1.0	ร่วนปนทราย
				2	-	7.0	29	1.0	ร่วนปนทราย
				3	-	7.0	29	1.0	ร่วนปนทราย
				4	-	7.0	29	1.5	ร่วนปนทราย
				5	-	7.0	29	1.0	ร่วนปนทราย
8/7/2558	14.33	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW62	1	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	29	1.0	ร่วนปนทราย
				3	-	7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				4	-	7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				5	-	7.0	29	1.5	ร่วนปนทราย
8/7/2558	14.40	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW63	1	-	7.0	29	1.5	ร่วน
				2	-	7.0	29	1.0	ร่วน
				3	-	6.8	28	1.5	ร่วนปนทราย
				4	-	7.0	29	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	29	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	14.40	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW64	1	-	7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				2		7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				3		7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				4		7.0	30	1.0	ร่วนปนทราย
				5		6.8	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	14.47	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW65	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2		7.0	27	1.0	ร่วน
				3		7.0	29	1.0	ร่วนปนทราย
				4		7.0	28	1.5	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน
8/7/2558	14.47	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW66	1	-	7.0	28	1.5	ร่วน
				2		7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				3		7.0	28	2.0	ร่วน
				4		7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				5		7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	15.02	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW67	1	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				2	-	6.8	27	1.5	ร่วน
				3	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	27	1.0	ร่วน
8/7/2558	15.02	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW68	1	-	7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				3	-	7.0	29	1.0	ร่วนปนทราย
				4	-	7.0	29	1.0	ร่วนปนทราย
				5	-	7.0	29	1.0	ร่วนปนทราย
8/7/2558	15.23	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW69	1	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				3	-	7.0	28	1.0	ร่วน
				4	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				5	-	7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	15.23	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW70	1	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	-	7.0	27	1.0	ร่วนปนทราย
				3	-	7.0	28	1.5	ร่วนปนทราย
				4	-	7.0	27	1.0	ร่วน
				5	-	7.0	28	1.0	ร่วนปนทราย
8/7/2558	16.10	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW71	1	-	6.2	21	2.0	ร่วนปนทราย
				2	-	6.6	21	2.0	ร่วนปนทราย
				3	-	6.5	20	2.5	ร่วนปนทราย
				4	-	6.4	20	2.5	ร่วนปนทราย
				5	-	6.6	21	2.0	ร่วนปนทราย
8/7/2558	16.10	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW72	1	-	6.6	21	1.0	ร่วนปนทราย
				2	-	6.0	22	4.0	ร่วนปนทราย
				3	-	6.2	20	2.0	ร่วนปนทราย
				4	-	6.8	20	1.0	ร่วนปนทราย
				5	-	6.2	20	3.5	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
8/7/2558	16.20	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW73	1	-	6.2	20	4.5	ร่วนปนทราย
				2		6.8	20	2.0	ร่วนปนทราย
				3		6.8	20	2.5	ร่วนปนทราย
				4		6.2	20	7.0	ร่วนปนทราย
				5		6.6	20	3.0	ร่วนปนทราย
8/7/2558	16.20	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW74	1	-	6.7	20	1.5	ร่วนปนทราย
				2		6.6	21	2.0	ร่วนปนทราย
				3		6.8	20	1.5	ร่วนปนทราย
				4		6.8	21	1.5	ร่วนปนทราย
				5		6.7	20	1.5	ร่วนปนทราย
24/7/2558	10.00	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW75	1	-	6.2	18	5.0	ร่วน
				2		6.0	18	6.0	ร่วน
				3		6.4	18	5.0	ร่วน
				4		6.0	17	6.0	ร่วนปนทราย
				5		6.4	18	4.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	10.00	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW76	1	-	6.2	17	4.0	ร่วน
				2		6.2	18	5.0	ร่วน
				3		6.6	18	3.5	ร่วน
				4		6.0	20	4.0	ร่วน
				5		6.2	18	5.0	ร่วน
24/7/2558	10.07	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW77	1	N 16° 05' 55.8"	6.2	17	5.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 26.5"	6.2	17	5.0	ร่วน
				3		6.4	18	3.0	ร่วน
				4	Elev= 1294 m	6.2	17	6.0	ร่วน
				5		6.8	18	2.0	ร่วน
24/7/2558	10.07	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW78	1	N 16° 05' 55.5"	6.2	17	2.5	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 26.5"	6.2	18	2.5	ร่วน
				3		6.4	18	4.5	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1294 m	6.2	18	2.0	ร่วนปนทราย
				5		6.2	18	6.0	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	10.16	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW79	1	N 16° 05' 55.0"	6.8	17	5.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 26.2"	6.2	17	5.0	ร่วน
				3		6.4	18	3.5	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1379 m	6.2	17	7.0	ร่วนปนทราย
				5		6.2	17	3.0	ร่วน
24/7/2558	10.16	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW80	1	N 16° 05' 54.9"	6.2	18	2.5	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 25.9"	6.2	17	3.0	ร่วนปนทราย
				3		6.2	18	4.0	ร่วน
				4	Elev= 1366 m	6.6	17	2.0	ร่วนปนทราย
				5		5.6	18	6.5	ร่วนปนทราย
24/7/2558	10.23	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW81	1	N 16° 05' 54.1"	6.4	19	5.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 25.5"	6.8	19	5.0	ร่วน
				3		6.6	19	3.5	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1385 m	6.2	17	7.0	ร่วนปนทราย
				5		6.6	17	3.0	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	10.23	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW82	1	N 16° 05' 54.5"	6.4	18	3.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 25.1"	6.6	19	2.5	ร่วน
				3		6.2	18	6.0	ร่วน
				4	Elev= 1345 m	6.2	18	3.5	ร่วน
				5		6.4	18	3.0	ร่วน
24/7/2558	10.30	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW83	1	N 16° 05' 54.2"	6.0	18	7.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 24.7"	6.6	18	5.0	ร่วน
				3		6.6	18	3.5	ร่วน
				4	Elev= 1301 m	5.0	18	8.0	ร่วนปนทราย
				5		5.8	17	5.0	ร่วนปนทราย
24/7/2558	10.30	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW84	1	N 16° 05' 54.2"	6.4	18	3.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 24.1"	6.2	18	3.0	ร่วน
				3		6.0	18	7.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1301 m	6.6	18	4.0	ร่วนปนทราย
				5		6.4	18	5.0	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	10.40	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW85	1	N 16° 05' 53.9"	6.0	18	8.0	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 23.5"	6.4	18	7.0	ร่วนปนทราย
				3		5.4	17	8.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1273 m	5.4	18	8.0	ร่วนปนทราย
				5		6.4	18	1.5	ร่วน
24/7/2558	10.40	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW86	1	N 16° 05' 54.0"	6.0	18	5.5	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 22.9"	6.2	18	5.0	ร่วนปนทราย
				3		6.0	18	6.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1275 m	6.2	18	3.0	ร่วนปนทราย
				5		6.4	18	6.0	ร่วนปนทราย
24/7/2558	10.48	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW87	1	N 16° 05' 52.9"	6.2	18	7.0	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 22.5"	6.2	18	7.0	ร่วนปนทราย
				3		5.8	18	8.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1275 m	5.6	18	8.0	ร่วนปนทราย
				5		5.8	18	5.5	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	10.48	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW88	1	N 16° 05' 52.3"	6.4	19	2.5	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 22.2"	5.8	19	7.0	ร่วนปนทราย
				3		5.6	18	8.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1246 m	6.8	18	3.0	ร่วนปนทราย
				5		6.2	18	5.5	ร่วนปนทราย
24/7/2558	11.00	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW89	1	N 16° 05' 52.3"	5.8	18	5.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 21.7"	5.8	18	5.0	ร่วน
				3		6.4	20	3.5	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1271 m	6.0	19	8.0	ร่วน
				5		6.0	19	7.5	ร่วน
24/7/2558	11.00	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW90	1	N 16° 05' 52.2"	6.2	18	2.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 21.7"	5.6	19	7.5	ร่วน
				3		5.4	18	8.0	ร่วน
				4	Elev= 1270 m	6.2	19	4.0	ร่วน
				5		5.6	19	8.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	11.08	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW91	1	N 16° 05' 52.5"	6.4	19	5.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 20.4"	6.2	19	5.0	ร่วน
				3		6.4	19	4.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1261 m	6.6	19	4.0	ร่วนปนทราย
				5		6.6	18	3.0	ร่วน
24/7/2558	11.08	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW92	1	N 16° 05' 52.6"	6.6	18	2.0	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 20.4"	6.0	19	5.0	ร่วนปนทราย
				3		6.0	20	7.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1250 m	6.8	19	2.5	ร่วนปนทราย
				5		6.4	20	6.5	ร่วนปนทราย
24/7/2558	11.19	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW93	1	N 16° 05' 52.9"	7.0	18	2.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 20.2"	6.4	18	5.0	ร่วนปนทราย
				3		6.6	18	3.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1275 m	6.4	18	5.0	ร่วนปนทราย
				5		6.8	18	3.0	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	11.19	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW94	1	N 16° 05' 53.4"	6.6	18	3.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 20.3"	6.6	18	3.0	ร่วนปนทราย
				3		6.2	18	5.0	ร่วน
				4	Elev= 1269 m	6.8	19	2.5	ร่วน
				5		6.4	19	3.5	ร่วนปนทราย
24/7/2558	11.25	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW95	1	N 16° 05' 52.9"	6.4	18	7.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 20.2"	6.4	18	5.0	ร่วน
				3		6.4	19	7.0	ร่วน
				4	Elev= 1275 m	6.8	18	5.0	ร่วนปนทราย
				5		6.6	18	4.0	ร่วนปนทราย
24/7/2558	11.25	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW96	1	N 16° 05' 53.0"	6.8	18	2.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 20.4"	6.6	18	2.0	ร่วน
				3		6.8	18	3.0	ร่วน
				4	Elev= 1263 m	6.8	18	3.0	ร่วน
				5		6.6	18	3.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	11.41	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW97	1	N 16° 05' 52.3"	6.6	19	3.5	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 20.6"	6.8	19	2.0	ร่วนปนทราย
				3		6.4	19	5.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1297 m	6.0	19	6.0	ร่วนปนทราย
				5		4.8	19	8.0	ร่วน
24/7/2558	11.30	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW98	1	N 16° 05' 53.5"	6.2	19	7.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 20.3"	6.4	18	4.0	ร่วน
				3		5.6	19	8.0	ร่วน
				4	Elev= 1212 m	6.8	18	2.5	ร่วน
				5		5.6	19	8.0	ร่วน
24/7/2558	11.42	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW99	1	N 16° 05' 52.0"	5.8	20	5.0	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 20.3"	6.2	20	4.0	ร่วนปนทราย
				3		6.2	20	5.5	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1287 m	5.6	20	7.0	ร่วนปนทราย
				5		5.2	19	8.0	ร่วนปนทราย

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	11.38	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW100	1	N 16° 05' 53.4"	6.4	18	4.5	ร่วน
				2	E 099° 06' 20.0"	6.2	18	6.0	ร่วน
				3		5.6	18	7.0	ร่วน
				4	Elev= 1236 m	6.8	18	3.0	ร่วนปนทราย
				5		6.6	18	4.0	ร่วน
24/7/2558	12.25	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW101	1	N 16° 06' 02.5"	6.2	19	3.0	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 47.0"	6.6.	19	4.0	ร่วนปนทราย
				3		6.2	20	2.5	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1219 m	6.6	20	3.0	ร่วนปนทราย
				5		6.6	19	1.5	ร่วนปนทราย
24/7/2558	12.25	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW102	1	N 16° 06' 02.4"	6.6	20	2.0	ร่วนปนทราย
				2	E 099° 06' 47.0"	6.6	20	2.5	ร่วนปนทราย
				3		6.4	20	4.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1218 m	6.8	20	2.0	ร่วนปนหิน
				5		6.8	20	2.5	ร่วนปนทรายปนหิน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	12.31	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW103	1	N 16° 05' 43.2"	6.2	19	5.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 46.9"	6.4	19	5.0	ร่วน
				3		6.0	19	7.5	ร่วน
				4	Elev= 1268 m	6.4	19	4.0	ร่วน
				5		6.4	19	1.5	ร่วน
24/7/2558	12.31	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW104	1	N 16° 05' 43.2"	6.2	20	8.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 46.7"	5.8	19	7.5	ร่วน
				3		6.4	19	4.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1248 m	6.2	20	2.0	ร่วนปนทราย
				5		6.0	20	8.0	ร่วนปนทราย
24/7/2558	12.40	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW105	1	N 16° 05' 35.8"	6.6	20	2.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 52.8"	6.6	20	4.5	ร่วนปนทราย
				3		6.2	20	6.5	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1219 m	6.4	20	3.5	ร่วน
				5		6.4	20	4.5	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	12.40	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW106	1	N 16° 05' 36.3"	6.2	20	4.0	ร่วน
				2	E 099° 06' 52.8"	6.4	20	3.0	ร่วน
				3		6.2	20	5.0	ร่วน
				4	Elev= 1226 m	6.6	20	4.5	ร่วน
				5		6.6	20	5.5	ร่วน
24/7/2558	12.52	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW107	1	N 16° 05' 22.2"	6.4	21	5.0	ร่วน
				2	E 099° 07' 48.4"	6.4	21	4.0	ร่วน
				3		6.6	20	2.5	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1194 m	6.2	21	5.0	ร่วนปนทราย
				5		6.2	20	2.5	ร่วน
24/7/2558	12.52	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW108	1	N 16° 05' 23.2"	6.6	20	3.0	ร่วน
				2	E 099° 07' 47.4"	6.6	20	2.0	ร่วน
				3		6.4	20	5.0	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1199 m	6.4	20	3.5	ร่วน
				5		6.4	20	5.5	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ	ความชื้น	ประเภทดิน
24/7/2558	12.58	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW109	1	N 16° 05' 24.8"	6.8	21	3.0	ร่วน
				2	E 099° 08' 02.3"	6.4	21	3.0	ร่วน
				3		6.8	20	1.5	ร่วนปนทราย
				4	Elev= 1178 m	6.8	20	3.0	ร่วน
				5		6.8	21	2.0	ร่วน
24/7/2558	12.58	อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จ.กำแพงเพชร	MW110	1	N 16° 05' 23.4"	6.6	21	2.0	ร่วน
				2	E 099° 08' 02.1"	6.6	20	2.0	ร่วน
				3		6.6	20	5.0	ร่วน
				4	Elev= 1177 m	6.8	20	1.5	ร่วนปนเหนียว
				5		6.8	20	1.5	ร่วน

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกจากตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

ตาราง ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis*
ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

ลำดับที่	รหัสไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน ITS
1	eMW49.3_TH	AACCTGCAGATGGATCATCGTCGATACCTTATAGGTACATGCTGATCACGAGATGCCGATAATCAT GGAATCAGGCTTGTCTTGGTTCCAGTCGGTGTCTCACCCCATCTAAGCTCTCGGTGAGGTGTCTA TTCTTGATTGGAGCCGCTTTGAGTGACGGCAATGATAGTTGGGTATGTTCCCCGTGAGGGTAGAGC ATAGACTTTATGAACAGAGCTGGGCTGTGCGCTCACAAAAACCATCGATAACTGGTGGCTGAGTG AGAAATCACTGGATCTGCTATGCAGGGAGCCTTAATGAGTTGGTCTTCACCGACACAACCGCCACT ATCGGTAATCTATTCCCAATTAACCTGTTTCTAGTAAAAGGCTAAATTAGTCAGTGAGAAATAGCCT TAGCGATGGATCGGTTGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCTAGCTGCGTTATTTACCACGAAT TGCAGACGCTTAGAGTGGTGAAGTTTTGAACGCACAGCGCCGTTGGGTTTTCCCTTCGGCACGTCT GGCTCAGGGTTGTTAATAGACTTCGATATTGCTAGGAAGGCAGCAATATCGTGCACCGAACGGTG ATAGTGTCTATAAA
2	eMW59.2_TH	ACCTGCAGATGGATCATCGTCGATACCTTATAGGTACATGCTGATCACGAGATGCCGATAATCATG GAATCAGGCTTGTCTTGGTTCCAGTCGGTGTCTCACCCCATCTAAGCTCTCGGTGAGGTGTCTATT CTTGATTGGAGCCGCTTTGAGTGACGGCAATGATAGTTGGGTATGTTCCCCGTGAGGGTAGAGCAT AGACTTTATGAACAGAGCTGGGCTGTGCGCTCACAAAAACCATCGATAACTGGTGGCTGAGTGAG AAATCACTGGATCTGCTATGCAGGGAGCCTTAATGAGTTGGTCTTCACCGACACAACCGCCACTAT CGGTAATCTATTCCCAATTAACCTGTTTCTAGTAAAAGGCTAAATTAGTCAGTGAGAAATAGCCTTA GCGATGGATCGGTTGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCTAGCTGCGTTATTTACCACGAATTG CAGACGCTTAGAGTGGTGAAGTTTTGAACGCACAGCGCCGTTGGGTTTTCCCTTCGGCACGTCTGG CTCAGGGTTGTTAATAGACTTCGATATTGCTAGGAAGGCAGCAATATCGTGCACCGAACGGTGAT AGTGTCTATAAA
3	eMW59.5_TH	GCAGATGGATCATCGTCGATACCTTATAGGTACATGCTGATCACGAGATGCCGATAATCATGGAAAT CAGGCTTGTCTTGGTTCCAGTCGGTGTCTCACCCCATCTAAGCTCTCGGTGAGGTGTCTATTCTTG ATTGGAGCCGCTTTGAGTGACGGCAATGATAGTTGGGTATGTTCCCCGTGAGGGTAGAGCATAGAC TTTATGAACAGAGCTGGGCTGTGCGCTCACAAAAACCATCGATAACTGGTGGCTGAGTGAGAAAT CACTGGATCTGCTATGCAGGGAGCCTTAATGAGTTGGTCTTCACCGACACAACCGCCACTATCGGT AATCTATTCCCAATTAACCTGTTTCTAGTAAAAGGCTAAATTAGTCAGTGAGAAATAGCCTTAGCGA TGGATCGGTTGATTCGCGTATCGATGAAAAACGCAGCTAGCTGCGTTATTTACCACGAATTGCAGA CGCTTAGAGTGGTGAAGTTTTGAACGCACAGCGCCGTTGGGTTTTCCCTTCGGCACGTCTGGCTCA GGGTTGTTAATAGACTTCGATATTGCTAGGAAGGCAGCAATATCGTGCACCGAACGGTGATAGTG TCTATAAA

4	eMW74.2_TH	ACCTGCAGATGGATCATCGTCGATACCTTATAGGTATATGCTTTGGTCACGAGATGCTGATAATCAT GGAATCAAGCTTGTCTTGATTTTCAGTCGGTGTCTCACCCCATCTAAGCTCTCGGAGAGGTGTCTAT TCTTGATTGGAGCCGATTTGAGTGACGGCAATGATAATTGGGTATGCTCCCCGTAAGGGTAGAGCAT AAGACTTAATGAGCTGATCTAGGTCTGTGCGCTCACAAAAACCCATCGATAGTTGGTGGCTAAGTG ATGAGACTTTGTCAAAATCACTAATCTGCTATGCGGGGAGCCTTAATGAGTTGTCGTGTACCTGA CCGAGACAACCGCCAGTATCGGTAATCTCTTCCCAATTAACCTGTTTCTAGTGAAGGCTATTGAGT GTTAGTGGAAACATTAGCCTTAGCGATGGATCGGTTGATTTCGCGTATCGATGAAAAACGAGCAAGCT GCGTTATTTGCCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTAAAATTTGAACGCACAGCGCCGTTGGGTT TTCCCTTCGGCACGTCTGGCTCAGGGTTGTTAATAGACTTCGGTATTGCTAGGAAGGCGGCAATAC CGTGAACCAACGGTGATAGTGCCTAAAAT
5	eMW90.1_TH	AACTTGCAGATGGATCATCGTCGATACCTTATAGGTATATGCTTTGGTCACGAGATGCTGATAATCA TGGAATCAAGCTTGTCTTGATTTTCAGTCGGTGTCTCACCCCATCTAAGCTCTCGGAGAGGTGTCTA TTCTTGATTGGAGCCGATTTGAGTGACGGCAATGATAATTGGGTATGCTCCCCGTAAGGGTAGAGCA TAAGACTTAATGAGCTGATCTAGGTCTGTGCGCTCACAAAA-ACCCAT CGATAGTTGGTGGCTAAGTATGAGACTTTGTCAAAATCACTAATCTGCTATGCGGGGAGCCTTAAT GAGTTGTCGTGTACCTGACCGAGACAACCGCCAGTATCGGTAATCTCTTCCCAATTAACCTGTT TCTAGTGAAGGCTATTGAGTGTAGTGGAAACATTAGCCTTAGCGATGGATCGGTTGATTTCGCGTATC GATGAAAAACGAGCAAGCTGCGTTATTTGCCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTAAAATTTGA ACGCACAGCGCCGTTGGGTTTTCCCTTCGGCACGTCTGGCTCAGGGTTGTTAATAGACTTCGGTAT TGCTAGGAAGGCGGCAATACCGTGAACCAACGGTGATAGTGCCTAAAAT
6	eMW103.2_TH	AACCTGCAGATGGATCATCGTCGATACCTTATAGGTATATGCTTTGGTCACGAGATGCTGATAATCA TGGAATCAAGCTTGTCTTGATTTTCAGTCGGTGTCTCACCCCATCTAAGCTCTCGGAGAGGTGTCTA TTCTTGATTGGAGCCGATTTGAGTGACGGCAATGATAATTGGGTATGCTCCCCGTAAGGGTAGAGCA TAAGACTTAATGAGCTGATCTAGGTCTGTGCGCTCACAAAAACCCATCGATAGTTGGTGGCTAAGT GATGAGACTTTGTCAAAATCACTAATCTGCTATGCGGGGAGCCTTAATGAGTTGTCGTGTACCTG ACCGAGACAACCGCCAGTATCGGTAATCTCTTCCCAATTAACCTGTTTCTAGTGAAGGCTATTGAG TGTTAGTGGAAACATTAGCCTTAGCGATGGATCGGTTGATTTCGCGTATCGATGAAAAACGAGCAAGC TGCGTTATTTGCCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTAAAATTTGAACGCACAGCGCCGTTGGGT TTCCCTTCGGCACGTCTGGCTCAGGGTTGTTAATAGACTTCGGTATTGCTAGGAAGGCGGCAATA CCGTGAACCAACGGTGATAGTGCCTAAAAT
7	eMW107.5_TH	AACCTGCAGATGGATCATCGTCGATACCTTATAGGTATATGCTTTGGTCACGAGATGCTGATAATCA TGGAATCAAGCTTGTCTTGATTTTCAGTCGGTGTCTCACCCCATCTAAGCTCTCGGAGAGGTGTCTA TTCTTGATTGGAGCCGATTTGAGTGACGGCAATGATAATTGGGTATGCTCCCCGTAAGGGTAGAGCA TAAGACTTAATGAGCTGATCTAGGTCTGTGCGCTCACAAAAACCCATCGATAGTTGGTGGCTAAGT GATGAGACTTTGTCAAAATCACTAATCTGCTATGCGGGGAGCCTTAATGAGTTGTCGTGTACCTG ACCGAGACAACCGCCAGTATCGGTAATCTCTTCCCAATTAACCTGTTTCTAGTGAAGGCTATTGAG TGTTAGTGGAAACATTAGCCTTAGCGATGGATCGGTTGATTTCGCGTATCGATGAAAAACGAGCAAGC TGCGTTATTTGCCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGTAAAATTTGAACGCACAGCGCCGTTGGGT TTCCCTTCGGCACGTCTGGCTCAGGGTTGTTAATAGACTTCGGTATTGCTAGGAAGGCGGCAATA CCGTGAACCAACGGTGATAGTGCCTAAAAT

ตาราง ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

ลำดับที่	รหัสแบคทีเรีย	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน <i>recA</i>
1	bMW1.2 TH	CTATCTCCACGGGGTCATTGTCACCTGGATATTGCATTAGGCGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAGTCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTA AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCTAT CTATGCTAAGAAATGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACTGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTTGCTGCCTAACGCCAAAAGCTGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCTAAT ACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAATCCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCCCGGATTGG TTCTGTGAAAAATGGCG
2	bMW4.4 TH	CTATCTCCACGGGGTCATTGTCACCTGGATATTGCATTAGGCGCTGGTGGCCTGCCGATGGGG CGTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAGTCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCG CCGCGGCACAACGTGAAGGTA AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCTA TCTATGCTAAGAAATGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACTGGAGA ACAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGA CTCCGTTGCTGCCTAACGCCAAAAGCTGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGG GCTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCTAA TACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAATCCTGAA ACCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCCCGGAT TGGTTCTTGTA AAAATGGCG
3	bMW4.5 TH	CTATCTCCACGGGGTCATTGTCACCTGGATATTGCATTAGGCGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAGTCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTA AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCTAT CTATGCTAAGAAATGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACTGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTTGCTGCCTAACGCCAAAAGCTGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCTAAT ACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAATCCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCCCGGATTGG TTCTGTGAAAAATGGCG
4	bMW8.1TH	CTATCTCCACGGGGTCATTGTCACCTGGATATTGCATTAGGCGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAGTCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTA AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCTAT CTATGCTAAGAAATGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACTGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTTGCTGCCTAACGCCAAAAGCTGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCTAAT ACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAATCCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCCCGGATTGG TTCT-GTGAAAAATGGCG
5	bMW27.4 TH	CTATCTCCACTGGCTCACTGTCACCTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCTTGCCGATGGGAC GCATTGTGAAATCTATGGCCCGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATTG CTTCCGCACAACGTGAAGGTA AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCCCTTGATCCTGT TTATGCGAAGAACTGGGTGGTGGTATTGATAACCTGTTGTGTTCTCAGCCAGACACCGGAGA

		ACAAGCTCTTGAGATTTGTGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCGGTTGATGTCATTATTGTGCGA CTCCGTTGCGGCTTTAACACCAAAAGCTGAAATCGAAGGCGAAATTGGTGATTCTCATATGGG GTTAGCTGCTCGTATGATGAGTCAGGCAATGCGCAAACCTGGCAGGTAACCTGAAAAGTTCCAA TACTCTTCTGATCTTTATCAACCAGATCCGGATGAAAATTGGTGTTATGTTCCGTAACCCCGAA ACCACAACCGGTGTAATGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTACGCTGGATATTCGCCGCATTG GTTCTGTGAAAAATGGCG
6	BMW 29.2 TH	CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACCTGGATATTGCATTAGGTGCTGGCGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATCTATGGTCCGGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCGCAACGTGAAGGTAACCTGCGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGTGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACGGGGGAA CAGGCTCTTGAGATCTGTGACGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTTGCCGCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATTTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGCATTG GTTCTGTGAAAAATGGCG
7	BMW29.4 TH	CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACCTGGATATTGCATTAGGTGCTGGCGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATCTATGGTCCGGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCGCAACGTGAAGGTAACCTGCGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGTGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACGGGGGAA CAGGCTCTTGAGATCTGTGACGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTTGCCGCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATTTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGCATTG GTTCT-GTGAAAAATGGCG
8	BMW38.3 TH	CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACCTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAGTCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCTAT CTATGCTAAGAAATTTGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACGGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCTGTAGCTGCCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGGTAACCTGAAAAGCTCTAAT ACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGCATTGG TTCTGTGAAAAATGGCG
9	BMW49.3 TH	CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACCTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAGTCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCT ATCTATGCTAAGAAATTTGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACGGAG AACAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAG ACTCTGTAGCTGCCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATAT GGGGCTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCTGGTAATTTGAAAAGCTC TAATACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCT GAAACCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCC GTATTGTTCTGTGAAAAATGGCG

10	bMW49.4 TH	<p>CTATCTCCACGGGTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCCCTTGATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGCTCTCAACCCGATACCGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTAGCTGCCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCACTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGATTGG TTCTGTGAAAAATGGCG</p>
11	bMW54.1 TH	<p>CTATCTCCACGGGTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAGTCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCT ATCTATGCTAAGAAATTGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACCGGAG AACAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAG ACTCTGTAGCTGCCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATAT GGGGCTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGTAACCTGAAAAGCTC TAATACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCT GAAACCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCC GTATTGGTTCTGTGAAAAATGGCG</p>
12	bMW56.5 TH	<p>CTATCTCCACGGGTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGCGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAGTCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTCTTGATCCTAT CTATGCTAAGAATTTGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACTGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTTGCTGCCTTAACGCCAAAAGCTGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCTAAT ACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGATTGG TTCTGTGAAAAATGGCG</p>
13	bMW59.2 TH	<p>CTATCTCCACGGGTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCCCTTGATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGCTCTCAACCCGATACCGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTAGCTGCCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCACTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGATTGG TTCTGTGAAAAATGGCG</p>

14	bMW59.5 TH	<p>CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGTGGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATTTATGGCCCGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTTATTGATGCTGAACACGCTTGTATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGCTCTCAACCCGATACCGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGCGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTAGCTGCCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGCATTGG TTCTGTGAAAAATGGCGT</p>
15	bMW74.2 TH	<p>CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGCGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATCTATGGTCCCGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTTATTGATGCTGAACACGCTTGTATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACGGGGGAA CAGGCTCTTGAGATCTGTGACGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTTGCCGCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATTTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGCATTG GTTCTGTGAAAAATGGCG</p>
16	bMW86.4 TH	<p>CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGCGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATCTATGGTCCCGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTTATTGATGCTGAACACGCTTGTATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACGGGGGAA CAGGCTCTTGAGATCTGTGACGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTTGCCGCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATTTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGCATTG GTTCTGTGAAAAATGGCG</p>
17	bMW89.5 TH	<p>CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGCGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATCTATGGTCCCGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCACAACGTGAAGGTAAAACCTGTGCGTTTTATTGATGCTGAACACGCTTGTATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACGGGGGAA CAGGCTCTTGAGATCTGTGACGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTTGCCGCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATTTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCTATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGCATTG GTTCTGTGAAAAATGGCG</p>

ลำดับที่	รหัสแบคทีเรีย	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน <i>recA</i>
18	bMW90.1 TH	CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGCGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATCTATGGTCCGGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCGCAACGTGAAGGTA AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTTGTATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACCGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGTGATGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTAGCCGCTTAACGCCGAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATTTTTATCAACCAAATTCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGCATTG GTTCTGTGAAAAATGGCG
19	bMW103.2 TH	CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGCGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATCTATGGTCCGGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCGCAACGTGAAGGTA AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTTGTATCCTAT CTATGCTAAGAAGTTGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACCGGAGAA CAGGCTCTTGAGATCTGTGACGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAGAC TCCGTAGCTGCCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATATGGGG CTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGGTAATTTGAAAAGCTCCAAT ACGTTGTTGATTTTTATCAACCAAATTCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCTGAAA CCACAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCCGCATTG GTTCTGTGAAAAATGGCG
20	bMW107.2 TH	CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGCG GCCTGCCGATGGGGCGTATTGTTGAAATCTATGGTCCGGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGA CATTACAGGTTATCGCCGCGGCGCAACGTGAAGGTA AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAAC ACGCTCTTGATCCTATCTATGCTAAGAAGTTGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCA ACCCGATACCGGAGAACAGGCTCTTGAGATCTGTGACGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGA TGTCATTATCGTAGACTCCGTAGCTGCCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGG TGATTCTCATATGGGGCTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGGTAA TTTAAAAGCTCCAATACGTTGTTGATTTTTATCAACCAAATTCGTATGAAAATTGGCGTCATG TTCGGTAACCTGAAACCAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCATGCTTCTGTTCTGCTGCTG GATATTCGCCGCATTGGTTCTGTGAAAAATGGCG
21	bMW107.5 TH	CTATCTCCACGGGTTTCATTGTCACTGGATATTGCATTAGGTGCTGGCGCCTGCCGATGGGGC GTATTGTTGAAATCTATGGTCCGGAATCTTCTGGTAAGACAACGCTGACATTACAGGTTATCGC CGCGGCGCAACGTGAAGGTA AACCTGTGCGTTTATTGATGCTGAACACGCTTGTATCCT ATCTATGCTAAGAAGTTGGGCGTTGATATTGATAATCTGTTGTGTTCTCAACCCGATACCGGAG AACAGGCTCTTGAGATCTGTGACGCGTTGACACGTTCCGGCGCTGTTGATGTCATTATCGTAG ACTCCGTAGCTGCCTTAACGCCAAAAGCCGAAATAGAAGGGGAAATTGGTGATTCTCATAT GGGGCTGGCAGCTCGAATGATGAGTCAGGCAATGCGTAACTGGCCGGTAATTTGAAAAGCTC CAATACGTTGTTGATTTTTATCAACCAAATTCGTATGAAAATTGGCGTCATGTTCCGGTAACCT GAAACCAACCGGTGGTAACGCGCTGAAATTCATGCTTCTGTTCTGCTGGATATTCGCC GCATTGGTTCTGTGAAAAATGGCG

ตาราง ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ที่แยกได้
จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

ลำดับที่	รหัสแบคทีเรีย	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน <i>recA</i>
1	bMW12.3 TH	CGATCTCTACCGGTTCCCTGTCACTGGATATTGCATTGGGTGCAGGTGGTTTGCCAATGGGCC GTATTGTTGAAATATATGGGCCAGAATCTCCGGTAAGACAACACTGACATTGCAAGTCATTG CTGCTGCCAGCGCAAGGCAGAACTTGTGCTTTTATTGATGCCGAACATGCCCTTGATCCGG TTTATGCGAAAAAATTGGGTGTAGATATTGATAATTTGTTGTGTTCTCAGCCTGATACTGGTGA ACAGGCACTGGAAATCTGTGATGCTTTATCACGCTCTGGTGTGTTGATGTCATTATTGTTGAC TCTGTTGCAGCATTAAACACAAAAGCAGAAATTGAAGGCGAAATCGGCGACTCTCACATGGGT CTGGCTGCACGTATGATGAGTCAAGCTATGCGTAAGCTGGCGGGGAATTTGAAAACTCGAAC ACCCTGCTGATCTTCATCAACCAGATTCGCATGAAAAATTGGCGTGATGTTTGGTAACCCCTGA AACGACCACTGGTGGTAATGCGTTGAAGTCTACGCATCTGTCCGTTTGGATATTCGTGTACTG GCTCGGTGAAAAATGGTG
2	bMW16.3 TH	CCATTTCCACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGCAGGTGGTTTGCCAATGGGGC GTATTGTTGAGATATACGGACCTGAGTCTCCGGTAAGACAACGCTGACTCTCAGGTTATTGCG TGCTGCTCAGCGCAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACATGCCCTCGATCCTGT TTATGCTAAAAAATGGGTGTAGATATTGATAACTTACTGTGTTCTCAGCCTGATACCGGTGAA CAGGCACTGGAAATCTGTGATGCCTTGTACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATTGTTGTTGACT CCGTTGCTGCATTGACACAAAAGCAGAAATCGAAGGTGAAATCGGTGATTACATATGGGGC TGGCGGCTCGTATGATGAGTCAGGCAATGCGTAAACTGGCAGGAAACCTGAAAAACTCGAATA CTCTGCTTATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAAATTGGGGTTATGTTTGGTAACCCAGAAAC GACGACTG
3	bMW16.5 TH	GTGGTAATGCACTGAAATCTATGCATCTGTTTCGTTTGGATATCCGCCGTACCGGTTTCAGTGAA AAACAGTGCCATTTCCACTGGCTCACTGTCTCTCGATATTGCTTTGGGGCAGGTGGTTTGCC AATGGGGCGTATTGTTGAGATATACGGACCTGAGTCTCCGGTAAGACAACGCTGACTCTTCA GGTTATTGCTGCTGCTCAGCGCAAGGCAGAACATGTGCTTTTATCGATGCTGAACACGCCCT CGATCCGGTTTATGCTAAAAAATGGGTGTAGATATTGATAACTTACTGTGTTCTCAGCCTGAT ACCGGTGAACAGGCACTGGAAATCTGTGATGCCTTGTACGCTCTGGTGCAGTTGATGTTATT GTTGTTGACTCCGTTGCTGCATTGACACAAAAGCAGAAATCGAAGGTGAAATCGGTGATTCA CATATGGGGCTGGCGGCTCGTATGATGAGTCAGGCAATGCGTAAACTGGCAGGAAACCTGAAA AACTCGAATACTCTGCTTATCTTTATCAACCAGATCCGTATGAAAAATTGGGGTTATGTTTGGTA ACCCAGAAACGACGACTGGTGGTAATGCACTGAAATCTATGCATCTGTTTCGTTTGGATATCC GCCGTACCGGTTTCAGTGAAAAACAGTG

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

นายอภิชาติ วิทย์ตะ

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 089-7031663 หรือ E-mail: apichatv@nu.ac.th Fax 055-964770

ผู้ร่วมงานวิจัย

1. นางสาวอัญชลี ฐานวิสัย

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 0891756803 หรือ E-mail: aunchaleet@nu.ac.th /

gene_aun@yahoo.com

2. นางสาวรักษิณา พลสีลา

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-964618, 089-7174814 Fax. 055-964770

Email: polseela@hotmail.com, raxsinap@nu.ac.th

3. นางสาวนารีลักษณ์ นาแก้ว

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-964622 โทรสาร 055-964770

E-mail address nnakaew@hotmail.com, n_nakaew@yahoo.com

4. นายสุธน เวียงดาว

ตำแหน่งหัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ กม.65 ถนนคลองลาน-อุ้มผาง อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร
62180

โทรศัพท์ 089-8958533 E-mail: Asoon-33@hotmail.com

รายงานการวิจัย

โครงการย่อย

การสำรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ต่อโรคที่เกิดจากการเสื่อม.

Screening for activities against degenerative diseases from medicinal plants
around Mae Wong National Park

โดย

รศ.ดร. กรกนก อิงคนินันท์¹

ดร. ประภาพรรณ เต็มกิจถาวร¹

ดร.ปราณี นางงาม²

ดร. หนึ่งฤทัย สุพรม³

นายสุรณ เวียงดาว⁴

¹ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

³ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

⁴อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ พ.ศ. 2558

รายงานการวิจัย

โครงการย่อย

การสำรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ต่อโรคที่เกิดจากการเสื่อม.

Screening for activities against degenerative diseases from medicinal plants
around Mae Wong National Park

โดย

รศ.ดร. กรกนก อิงคนินันท์¹

ดร. ประภาพรรณ เต็มกิจถาวร¹

ดร.ปราณี นางงาม²

ดร. หนึ่งฤทัย สุพรม³

นายสุรณ เวียงดาว⁴

¹ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

³ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

⁴อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ อ.คลองลาน จ.กำแพงเพชร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

ความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทยเป็นแหล่งที่น่าสนใจของการค้นหายาใหม่ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ในสารสกัดเอทานอลจากสมุนไพรที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งอาจนำไปสู่การได้แหล่งของสารที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในโรคที่เกิดขึ้นจากความเสื่อมของร่างกาย เช่น โรคอัลไซเมอร์ และ การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ

คณะผู้วิจัยได้สำรวจพืชสมุนไพรที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ในเดือนกันยายน 2557 และมกราคม 2558 และเก็บตัวอย่างได้ 40 ชนิด เลือกส่วนของพืชมาชั่งน้ำหนัก ทำให้แห้ง และสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ได้สารสกัด 87 ตัวอย่าง นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส และต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ ในหลอดทดลอง ด้วยวิธีของ Ellman's วิธี 1,1'-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging และวิธีของ Sonnenburg's ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส พบว่าสารสกัดที่มีการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสสูงที่สุด ได้แก่ส่วนเถาของ *Entada rheedii* Spreng. (สะบ้า) คือยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 60.73 ± 5.41 และสำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ 80 มีทั้งหมด 44 ตัวอย่าง เมื่อเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์สูงที่สุด 10 อันดับแรกมาหาค่า IC_{50} พบว่า สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ *Caesalpinia digyna* Rottler (ชะเลือด, ใบและกิ่ง), *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. (สีพันคนทา, ผล) และ *Entada rheedii* Spreng. (สะบ้า, เถา) โดยมี IC_{50} 5.37 ± 0.22 , 7.74 ± 0.38 และ 8.64 ± 0.27 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเอทานอลจากส่วนรากของตัว (*Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume) และรากของแกลบหมู (*Desmodium teres* Wall. ex Benth) สามารถยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ (PDE5) ได้สูงกว่าร้อยละ 70 (ร้อยละ 78.54 ± 2.45 และ 73.20 ± 2.79 ตามลำดับ) และมีสารสกัด 4 ชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 ในระดับกลาง (ร้อยละการยับยั้ง 60-70) คือ สารสกัด *Antidesma sootepense* Craib (มะเมี๊ยะ, ลำต้น), *Cissus adnata* Roxb (น้ำเต้าป๋า, ใบ), *Stahlianthus campanulatus* Kuntze (ว่านเพชรน้อย, เหง้า) และ *Bauhinia viridescens* Desv (ส้มเสี้ยวป๋า, ราก) โดยสามารถยับยั้ง PDE5 ได้ร้อยละ 68.54 ± 4.09 , 68.23 ± 4.19 , 66.30 ± 1.33 และ 66.03 ± 3.37 ตามลำดับ สำหรับในการศึกษาขั้นต่อไป ควรมีการศึกษาด้านเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเหล่านี้ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่อาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมต่อไป

Abstract

Thai biodiversity can be a promising source of drugs. The objective of this study is to screen acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity, free radical scavenging ability and phosphodiesterase5 (PDE5) inhibitory activity from the ethanolic extracts of medicinal plants collected from Mae Wong National Park. The screening may lead to discovery of new leads for the treatment of degenerative diseases i.e. Alzheimer's disease and erectile dysfunction.

Forty medicinal plants were collected from Mae Wong National Park in September 2014 and January 2015. Selected parts of the plants were cut into small pieces, dried and extracted with 95% ethanol to yield 87 ethanolic extracts. Then, the extracts were tested for AChE inhibitory activity, free radical scavenging ability and PDE5 inhibitory activity using Ellman's colorimetric method, 1,1'-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method and Sonnenburg's radioactive method, respectively.

The results showed that among the extracts tested, *Entada rheedii* Spreng stem extract showed the highest AChE inhibition (60.73% \pm 5.41%). For free radical scavenging activity, the activity of more than 80% was obtained from 44 samples. Ten extracts that gave the highest activity were studied for IC₅₀ values. The highest free radical scavenging activity were found in *Caesalpinia digyna* Rottler (leaves and twigs), *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. (fruits) and *Entada rheedii* Spreng. (vines) with IC₅₀ values of 5.37 \pm 0.22, 7.74 \pm 0.38 และ 8.64 \pm 0.27 μ g/ml, respectively. For PDE5 inhibitory activity, the results showed that more than 70 % PDE5 inhibitory activity were obtained from the roots of *Cratogeomys cochinchinense* (Lour.) Blume and *Desmodium teres* Wall. ex Benth, (78.54 \pm 2.45% and 73.20 \pm 2.79%inhibition, respectively). In addition, four plant extracts had moderate inhibitory activity against PDE5 (60-70% inhibition) i.e. the extracts of *Antidesma sootepense* Craib (stems), *Cissus adnata* Roxb (leaves), *Stahlianthus campanulatus* Kuntze (rhizomes), and *Bauhinia viridescens* Desv (roots) with %PDE5 inhibition of . 68.54 \pm 4.09%, 68.23 \pm 4.19%, 66.30 \pm 1.33% and 66.03 \pm 3.37%, respectively. However, the further investigation on chemical characterization and pharmacological investigation of these plant extracts should be conducted to explore possibilities for the treatment of degenerative disorder.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ หมอชาวบ้านในการถ่ายทอดองค์ความรู้การใช้สมุนไพรพื้นบ้าน และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในการอำนวยความสะดวก และงานวิจัยนี้เกิดขึ้นไม่ได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชให้คณะผู้วิจัยเข้าศึกษาพันธุ์พืชสมุนไพรในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ ตามหนังสือที่ ทส 0907.4/13815 ลงวันที่ 25 กรกฎาคม 2557 สุดท้ายคณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนวิจัยสนับสนุนโครงการจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญรูป	VI
สารบัญตาราง	VII
บทที่ 1 บทนำ	
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease, AD)	4
- สาเหตุของการเกิดโรค	4
- Cholinesterase	6
- สารต้านออกซิเดชัน	6
- การนำพืชสมุนไพรมาใช้ป้องกันและรักษาภาวะสมองเสื่อม	7
การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (erectile dysfunction)	7
- กลไกการเกิดโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศและการรักษา	8
- ยากลุ่ม Phosphodiesterase5 (PDE5) Inhibitors	9
อุทยานแห่งชาติแม่วังก์ จังหวัดกำแพงเพชร	9
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย	
การสำรวจพืชสมุนไพร	11
สารบัญ (ต่อ)	หน้า
การสกัดสารสกัดหยาบจากสมุนไพร	11
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตัวอย่าง	
- การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส	12
- การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	13
- การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอร์สไฟว์	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ผลการสำรวจพืชสมุนไพรพื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วังก์	19
ผลการสกัดสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วังก์	33
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่	10
วังก์	
- ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส	41
- ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	47
- ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอร์สไฟว์	50

บทที่ 5 อภิปรายผลและวิจารณ์ผล	52
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก ลำดับพืชที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์	61

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2-1 กระบวนการแข็งตัวของอวัยวะเพศชาย	8
รูปที่ 2-2 แผนที่อยู่ยานแห่งชาติแม่วงก์	10
รูปที่ 3-1 ปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นตามการทดสอบ PDE-5 inhibitory activity assay	18
รูปที่ 4-1 กราฟแสดง %free radical scavenging (FRC) ของสารสกัด 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆและสารมาตรฐาน (ascorbic acid)	49
รูปที่ 5-1 โครงสร้างของ triterpenoid saponins ที่พบในส่วนเปลือกของเมล็ด <i>E. rheedii</i> ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	52
รูปที่ 5-2 โครงสร้างของ bergenin	53

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3-1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส	13
ตารางที่ 3-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	13
ตารางที่ 3-3 ขั้นตอนการทดสอบ PDE-5 inhibitory activity assay	17
ตารางที่ 4-1 ผลการสำรวจสมุนไพรรักษาประจำแวกตามวงศ์	19
ตารางที่ 4-2 ผลการสำรวจสมุนไพรรักษาประจำแวกตามสรรพคุณที่ใช้รักษา	21
ตารางที่ 4-3 สมุนไพรที่สำรวจพบและมีการใช้พื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์	22
ตารางที่ 4-4 สมุนไพรที่สำรวจพบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์	29
ตารางที่ 4-5 รายชื่อพืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนที่ใช้ และผลการสกัดจากส่วนต่างๆของพืช	33
ตารางที่ 4-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัด 87 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.33 mg/ml และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ (n=3)	41
ตารางที่ 4-7 รายชื่อสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและผลการหาค่า IC ₅₀ (n=3)	48
ตารางที่ 4-8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ของสารสกัดสมุนไพรรักษาในเขตอุทยานแม่วงก์ ความเข้มข้น 50 µg/ml (n=3)	50

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบัน อายุเฉลี่ยของประชากรโลกเพิ่มมากขึ้น อัตราส่วนของคนสูงอายุกับคนหนุ่มสาวก็เพิ่มขึ้นด้วย โรคที่เกิดจากความเสื่อมของร่างกาย เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (erectile dysfunction) เป็นโรคเรื้อรังและเป็นสาเหตุให้คุณภาพชีวิตของประชากรสูงอายุน้อยลง

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคที่เป็นความผิดปกติจากการเสื่อมของสมอง (neurodegenerative disorder) พบมากในกลุ่มประชากรผู้สูงอายุ โดยจนถึงปัจจุบันไม่มีวิธีใดที่สามารถรักษาผู้ป่วยโรคนี้ให้หายจากโรคโดยเด็ดขาดได้ โรคอัลไซเมอร์นับเป็นโรคที่ทำลายความสามารถในการพึ่งพาตนเองของผู้สูงอายุได้มากที่สุดและกำลังจะเป็นปัญหาทางสุขภาพและทางเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากโลกของเรามีคนสูงอายุเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และโลกต้องแบกภาระคนเป็นโรคนี้หนักขึ้น เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการรักษาแพงเป็นที่สามารถจากโรคหัวใจและมะเร็ง ขณะนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกาต้องใช้จ่ายถึงปีละ 100,000 ล้านดอลลาร์เพื่อโรคนี้

สาเหตุและพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานการพบความบกพร่องทางระบบ cholinergic ในสมองของผู้ป่วยโรคนี้ และการลดของ acetylcholine ในสมองเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับความรุนแรงของความเสื่อมในสมอง ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิประสาทวิทยาในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ [1] ความรู้นี้ได้ก่อให้เกิดแนวทางการรักษาในแง่ประคับประคอง (Palliative therapy) โดยพยายามเสริมการทำงานด้าน cholinergic ในหลายรูปแบบ กลยุทธ์ที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดก็คือ การใช้สารต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) [2] ปัจจุบันมียากลุ่ม AChE inhibitors 4 ชนิดที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาในการรักษา mild และ moderate Alzheimer's ได้แก่ tacrine donepezil rivastigmine และ galanthamine อย่างไรก็ตามสารต้าน AChE ที่มีการค้นพบมายังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น tacrine อาจก่อให้เกิดพิษต่อตับ นอกจากนี้ ผู้ป่วยแต่ละรายยังมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อยาแต่ละชนิดแตกต่างกันไป [3] ดังนั้นการค้นหายาต้าน AChE ใหม่ ๆ ยังเป็นความท้าทาย และเป็นสิ่งที่จำเป็นในสภาวะปัจจุบัน

แหล่งกำเนิดของยามีทั้งจากการสังเคราะห์และจากธรรมชาติ เป็นที่ยอมรับกันว่าธรรมชาติเป็นแหล่งแห่งความหลากหลายทางด้านเคมีและชีวภาพ สารที่สกัดจากพืชหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายตัว มีความซับซ้อนและแปลกใหม่ ทางโครงสร้าง และฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างที่ยากจะลอกเลียนแบบได้โดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี galanthamine เป็นตัวอย่างหนึ่งของสารที่ได้จากพืชที่มีฤทธิ์ต้าน AChE สารนี้สกัดได้จากพืชที่มีอยู่ทั่วไปในยุโรป ซึ่งมีชื่อว่า daffodil (*Narcissus* sp., Amaryllidaceae family) galanthamine ได้ผ่านการทดลองทางด้านคลินิกและนำออกใช้เป็นยารักษาอาการของโรคอัลไซเมอร์แล้วในยุโรปบางประเทศ

เช่น ออสเทรีย และในสหรัฐอเมริกา [3] ความสำเร็จของ galanthamine นี้ แสดงให้เห็นความสำคัญและโอกาสในการพบยาใหม่อื่น ๆ จากธรรมชาติ

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาถึงการใช้สมุนไพรทั้งในรูปแบบสารสกัดเดี่ยวๆ หรือในตำรับยาแผนโบราณ ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ เมื่อเร็วๆ นี้กลุ่มวิจัยในอังกฤษ [4] ได้รวบรวมข้อมูลการศึกษาพืชสมุนไพรที่อาจนำมาใช้ในโรคอัลไซเมอร์และได้กล่าวถึง Gingko (*Gingko biloba*) ซึ่งเป็นที่รู้จักดีว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และออกฤทธิ์ต่อสารสื่อประสาท ว่าให้ผลในการรักษาต่อผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ได้ใกล้เคียงกับ tacrine และ donepezil ในปี 2003 Howes และ Houghton ได้กล่าวถึงพืชสมุนไพรที่มีการใช้ในการบำรุงความจำและเป็นยาอายุวัฒนะจีนและในตำรับอายุรเวทของอินเดีย ว่าอาจมีฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยาเช่น มีฤทธิ์เพิ่มระดับ acetylcholine ด้านอีกเสบ หรือต้านออกซิเดชัน [5]

การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (erectile dysfunction หรือ ED) หรือการที่อวัยวะเพศชายไม่เกิดการแข็งตัว เป็นปัญหาซึ่งมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต จากการวิจัยในสหรัฐอเมริกาพบว่าร้อยละ 50 ของผู้ชายอายุ 40 ปีขึ้นไป มีปัญหา ED ตั้งแต่ในระดับไม่รุนแรงจนถึงรุนแรง [6] ในการศึกษาชายไทยอายุระหว่าง 40-70 ปี จำนวน 1,250 คน จาก 8 จังหวัดและกรุงเทพฯ พบว่าชายไทยกลุ่มนี้มีปัญหา ED ร้อยละ 37.5 โดยที่ยังอายุมากขึ้น ปัญหา ED ก็พบบ่อยขึ้น (ร้อยละ 73 ในชายไทยอายุ 60-70 ปี) โดยรวมแล้วส่วนใหญ่ ED อยู่ในขั้นไม่รุนแรง มีเพียงร้อยละ 4.7 ที่รุนแรงคือเสียการแข็งตัวอย่างสิ้นเชิง [7] กลุ่มที่มีปัญหา ED มากที่สุดคือกลุ่มที่มีโรคประจำตัว เช่น ความดันโลหิตสูง เบาหวาน โรคหัวใจ ผู้ป่วยที่เข้านอนหลังได้รับการกระทบกระเทือนและผู้ป่วยภายหลังการผ่าตัดต่อมลูกหมาก (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หลังการผ่าตัดมะเร็งต่อมลูกหมาก) ก็มักประสบปัญหา ED [6]

อวัยวะเพศชายประกอบไปด้วย เนื้อเยื่อซึ่งภายในมีหลอดเลือดเล็กๆอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดอารมณ์ทางเพศ ระบบประสาท จากไขสันหลังจะส่งสัญญาณมายังปลายประสาทบริเวณอวัยวะเพศ ต่อมาจะเกิดการกระตุ้นให้หลั่งสาร nitric oxide ขึ้น จากนั้นเกิดสารชื่อ cyclic GMP ตามมา สารนี้มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดแดงภายในอวัยวะเพศเกิดการขยายตัว และ ทำให้มีเลือดไหลเข้าสู่อวัยวะเพศมากขึ้น เมื่อมีเลือดไหลเข้ามามาก จะเกิดแรงดันขึ้น เบียดหลอดเลือดดำบริเวณนั้น ทำให้เลือดไหลกลับได้น้อยลงจึงทำให้อวัยวะเพศแข็ง จนกว่าจะหมดการกระตุ้นทางเพศ หรือ cyclic GMP ลดลง หลอดเลือดแดงจึงเริ่มหดตัว เลือดไหลเข้าน้อยลง แต่ไหลออกมากขึ้น อวัยวะเพศจึงอ่อนตัวลง จะเห็นว่ามีหลายส่วนที่ควบคุมการแข็งตัวของอวัยวะเพศ ได้แก่ ระบบประสาท หลอดเลือดแดง nitric oxide และ cyclic GMP การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศจึงไม่ได้มีสาเหตุมาจากจิตใจและความชราเท่านั้น จริงๆแล้วสาเหตุส่วนใหญ่มาจากโรคที่ทำให้เกิดความผิดปกติของหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะเพศ เช่น เบาหวาน ไขมันในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ สุกบู่หรือจัด เมื่อหลอดเลือดเสื่อม จะไม่เกิดการหลั่งสาร nitric oxide และ cyclic GMP หรือ หลั่งออกมาน้อย มาก ไม่เพียงพอที่จะทำให้อวัยวะเพศแข็งพอที่จะทำให้เกิดการมีเพศสัมพันธ์ได้อย่างพอใจ [6, 8]

เมื่อปี 1998 มีการวางตลาดยาที่ใช้รักษา ED ตัวแรกคือ sildenafil citrate (Viagra) นับเป็นปรากฏการณ์ของวงการยาที่ยากลุ่มใหม่นี้ได้รับความสนใจจากผู้ป่วยที่มีปัญหานี้อย่างท่วมท้น ในขณะที่มียาที่ใช้ในการรักษา ED ที่ได้รับขึ้นทะเบียนในสหรัฐอเมริกาแล้วอีก 2 ชนิด คือ vardenafil (Levitra) และ tadalafil (Cialis) ยาเหล่านี้ มีกลไกการออกฤทธิ์คือการยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 ซึ่งมีอยู่มากบริเวณอวัยวะเพศชาย เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ทำลาย cyclic GMP เมื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ ผลตามมาก็คือ cyclic GMP มีปริมาณมากขึ้น (เพราะถูกทำลายลดลง) และมากพอที่จะทำให้อวัยวะเพศแข็งตามปกติ [9, 10]

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นแหล่งกำเนิดของสารที่มีความหลากหลายทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ มีรายงานว่าสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดมีฤทธิ์ต้าน PDE เช่น สารกลุ่ม flavonoids [11] [12] [13], coumarins [14], alkaloids [15] ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าจะมีการค้นพบสารต้าน PDE ในสมุนไพรที่ใช้ทำการทดสอบ พืชสมุนไพรไทยที่มีรายงานสารต้าน PDE แล้วได้แก่ กวาวเครือแดง ซึ่งพบว่าสาร 3, 7, 3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ สาร 3, 3'-dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-O- β -D-glucopyranoside เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้าน cAMP PDE [13] อย่างไรก็ตามยังไม่แน่ชัดว่าสารทั้งสองนี้ จะมีความจำเพาะเจาะจงกับ PDE-5 หรือไม่

ยาหรือสมุนไพรที่จะสามารถนำมารักษาหรือบรรเทาอาการโรคที่เกิดจากการเสื่อมนี้ จึงมีความสำคัญทั้งทางด้านสุขภาพและเศรษฐกิจ ประเทศไทยเป็นแหล่งที่สมบรูณ์ของความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเฉพาะในพื้นที่ป่า และเขตอุทยานแห่งชาติ ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะสำรวจองค์ความรู้พื้นบ้านด้านการใช้สมุนไพร และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยจะมุ่งเน้นสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคในผู้สูงอายุ เช่น สมุนไพรที่ใช้ในยาอายุวัฒนะ ยาบำรุงกำลัง และยากระตุ้นความรู้สึกทางเพศ เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ และการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ โดยจะทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase, AChE) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งเกี่ยวกับโรคอัลไซเมอร์ และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ (phosphodiesterase5, PDE5) ซึ่งเชื่อมโยงกับการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศชาย ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะก่อให้เกิดการส่งเสริมการใช้สมุนไพรโดยมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์อ้างอิง และอาจค้นพบสมุนไพรที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาสมัยใหม่หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ โดยการพิสูจน์คุณค่าของสมุนไพรเหล่านี้ จะนำไปสู่การอนุรักษ์พืชอย่างยั่งยืนเพื่อการใช้ประโยชน์ของสมุนไพรต่อไป

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease, AD)

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease, AD) พบอุบัติการณ์การเกิดสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยจากอายุของผู้ป่วยโรคนี้ที่เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ทุก 5 ปี ของอายุที่เพิ่มขึ้น ตั้งแต่อายุ 60 ปี ซึ่งในปี ค.ศ. 2010 Dementia เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติทางสมอง ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็นหลายชนิด โดยชนิดที่พบมากที่สุดกว่าร้อยละ 60-80[16] คือโรคอัลไซเมอร์ มีผู้ป่วย Dementia ประมาณ 35.6 ล้านคน และคาดว่าจำนวนผู้ป่วย จะเพิ่มมากขึ้นถึง 2 เท่า ในทุกๆ 20 ปี กล่าวได้ว่า ในปี ค.ศ. 2030 จะมีผู้ป่วยโรคดังกล่าว เพิ่มขึ้นเป็น 65.7 ล้านคน และปี ค.ศ. 2050 จะยังมีผู้ป่วยเพิ่มขึ้นไปอีก ประมาณ 115.4 ล้านคน โดยในปี ค.ศ. 2010 ร้อยละ 58 ของผู้ป่วยโรคนี้ทั้งหมดอาศัยอยู่ในประเทศกำลังพัฒนา[17, 18] และจากการสำรวจในปี ค.ศ. 2010 ของประเทศสหรัฐอเมริกา มีค่าใช้จ่ายในการดูแลผู้ป่วยต่อปีรายละ 40,689 – 51,290 ดอลลาร์สหรัฐ หรือคิดรวมค่าใช้จ่ายทั้งหมดสำหรับผู้ป่วยราว 157–215 พันล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี จากผลสำรวจของ Access Economics Pty Limited 18 พบว่า ในปี ค.ศ. 2005 ประเทศไทยมีผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อมสูงถึง 229,100 คน และคาดว่าจะเพิ่มเป็น 450,200 คน และ 1,233,200 คนภายในปี ค.ศ. 2020 และ 2050 ตามลำดับ ซึ่งในปัจจุบันการรักษาโรคอัลไซเมอร์ด้วยยาในผู้ป่วยไทย ต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายอย่างต่ำเป็นจำนวน 80-200 บาทต่อคนต่อวัน หากพิจารณาต่อปีแล้วพบว่าต้องเสียค่าใช้จ่ายในด้านยาอย่างต่ำ มากถึงปีละ 29,200-73,000 บาทต่อคน [19, 20]

สาเหตุของการเกิดโรค

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท โดยมีการพยายามอธิบายถึงสาเหตุของการเกิดโรคมากมาย ได้แก่ [21, 22]

1. Oxidative stress
2. การลดลงของ Acetylcholine
3. การสะสมของ β -amyloid ในสมอง
4. การขาดวิตามินบี 12 และโฟเลต
5. การเกิด advanced glycation end-products ในสมอง

การวินิจฉัยโรคนอกจากจะสังเกตอาการภายนอกแล้วยังมีการตรวจวิเคราะห์หาสารต่าง ๆ ดังนี้คือ[21]

- (1) การเพิ่มขึ้นของ isoprostanes จาก lipid peroxidation
- (2) การสะสมของ extracellular amyloid- β peptide ในเซลล์ประสาท
- (3) การสะสมของ hyperphosphorylated tau protein (microtubule assembly protein)

(4) การลดลงของ acetylcholine (ACh) ในสมอง

(5) การเพิ่มขึ้นของ nitric oxide synthase (iNOS) ใน microglia และ astrocytes ที่อยู่รอบ β -amyloid plaques

(6) การเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ peroxynitrite ในเซลล์ประสาท และ

(7) การทำงานเพิ่มขึ้นของ catalase, superoxide dismutase และ glutathione reductase ใน hippocampus และ amygdala (บริเวณหนึ่งในสมองที่มักถูกทำลายในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์) สิ่งเหล่านี้จะช่วยปกป้องถึงพยาธิสภาพของสมองที่ถูกทำลายมากขึ้นในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์

กระบวนการ Lipid peroxidation เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่ส่งผลอย่างมากต่อการเสียหายของเนื้อเยื่อสมอง และการเพิ่มขึ้นของสารทุติยภูมิ (secondary product) ทั้งการสลายและสร้างกรดไขมันโดยใช้ออกซิเจนย่อมสามารถทำลายระบบประสาทได้[23]

มีการศึกษาจำนวนมากที่เปรียบเทียบการเกิด lipid peroxidation ในสมองของคนที่เป็นโรคอัลไซเมอร์กับ กลุ่มควบคุมที่ใช้วิธีการจับคู่โดยใช้อายุเป็นตัวอ้างอิง และทำการวัดปริมาณสารผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิได้จากปฏิกิริยา lipid peroxidation เช่น 4-hydroxy-2-nonenal, acrolein, isoprostanes, และ neuroprostanes พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของสารดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญในสมองผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ และยังพบว่าในคนที่เป็นโรคอัลไซเมอร์มีการเพิ่มขึ้นของ isoprostanes ใน cerebrospinal fluid (CSF) จึงคาดว่าอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะความจำเสื่อม จากผลการศึกษาดังกล่าวการเกิด lipid peroxidation เป็นสาเหตุในการเกิดอัลไซเมอร์ได้ การใช้สารที่มีฤทธิ์ antioxidant เพื่อลดการเกิดสารทุติยภูมิ เช่น isoprostanes จึงสามารถใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ รวมทั้งอาจใช้ปริมาณของสาร isoprostanes ใน cerebrospinal fluid (CSF) เพื่อติดตามประเมินการรักษาได้[23]

การลดลงของ acetylcholine (ACh) ในสมอง เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีการพัฒนาแนวคิดในการพัฒนายาเพื่อบรรเทาอาการจากความเสื่อมของสมอง โดย ACh จะมีส่วนช่วยในการเพิ่มความจำให้กับผู้ป่วย และการเพิ่มปริมาณของ ACh จะยังส่งผลให้ผู้ป่วยอาการความจำเสื่อมที่น้อยลง จึงมีการนำ acetylcholinesterase inhibitor มาใช้ในการเพิ่มปริมาณ ACh เนื่องจาก acetylcholinesterase (AChE) เป็นเอนไซม์ที่ทำลาย ACh ในสมองด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส หากมีการได้รับสารหรือยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว จะส่งผลเพิ่มปริมาณ Acetylcholine ใน neuronal synaptic cleft ของสมอง ส่งผลให้การขนส่งกระแสประสาทในสมองเพิ่มขึ้น อาการของผู้ป่วยจึงลดลง[23]

ภาวะสมองเสื่อมมีพยาธิสภาพมาจากหลายสาเหตุ อีกทั้งยังเป็นภาวะที่มีความซับซ้อนอย่างมาก ในปัจจุบันจึงมีการวิจัยเพื่อที่จะพัฒนายาหรือค้นหาสารต่างๆ เพื่อมาป้องกันหรือฟื้นฟูสภาพของโรค เช่น ยับยั้งการสะสม senile plaque และ $A\beta$, ยับยั้งการเกิด oxidative stress, รักษาความสมดุลและให้สารสื่อ

ประสาทเพื่อรักษาสมดุลของระบบ cholinergic, การกระตุ้น nicotinic และ muscarinic receptors เป็นต้น [21-23]

Cholinesterase

เอนไซม์ในกลุ่ม cholinesterase ประกอบไปด้วย 2 ชนิด ได้แก่ AChE ดังที่กล่าวข้างต้น และอีกชนิดหนึ่งคือ butyrylcholinesterase (BuChE) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ไม่ได้มีการนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการพัฒนายาเพื่อใช้ในการรักษาและบรรเทาอาการของโรคอัลไซเมอร์ เนื่องจากมีรายงานว่าในสมองของคนปกติ จะพบเอนไซม์ AChE เป็นหลัก (ประมาณ 80%) และ BuChE จะพบได้น้อยมาก อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของสมองในคนปกติน้อย จนกระทั่งมีการศึกษาทางประสาทวิทยาพบว่า ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ฤทธิ์ของ BuChE จะเพิ่มสูงขึ้น รวมถึงความสามารถในการกระจายตัวเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ AChE อาจลดลงหรือไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่ง BuChE มีความสามารถในการทำลาย ACh ในสมองผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสเช่นเดียวกัน อีกทั้งยังมีรายงานว่า BuChE จะส่งผลกระทบต่อเพิ่มความเสี่ยงหรือความก้าวหน้าของโรคอัลไซเมอร์ด้วย ในปัจจุบันยังไม่มีการพัฒนายาที่มีความสามารถยับยั้งที่มีความจำเพาะต่อ BuChE ได้ [21, 22]

สารต้านออกซิเดชัน

ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ สามารถนำสารต้านออกซิเดชันที่มาใช้ลดภาวะ lipid peroxidation หรือภาวะ oxidative stress ได้ โดยสารดังกล่าวสามารถแบ่งออกได้ตามโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ได้ดังนี้[22]

1. direct antioxidant เป็นสารประกอบที่รบกวนการเกิด free radical โดยเข้าทำปฏิกิริยากับ reactive oxygen species สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ aryl amine และ indole, carotene, lycopene, retinol และ polyene, tocopherol, flavonoid และ polyphenol เป็นต้น
2. indirect antioxidant เป็นสารประกอบที่ป้องกันการเกิด free radical สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ aminooxidase inhibitor, calcium antagonist, dopamine receptor agonist, glutamate receptor antagonist, ion chelator และ nitric oxide synthase inhibitor
3. metabolic antioxidant สารในกลุ่มนี้จะช่วยลดการทำลายเซลล์
4. สารช่วยปรับระดับของ free radical ได้แก่ ubiquinone และ idebenone, N-acetyl-cysteine, glutathione, 2-oxo-thiazolidine-4-carboxylate, N-butyl- α -phenylnitron, carnitine, creatine และ lipoic acid (thioctic acid)

การนำพืชสมุนไพรมาใช้ป้องกันและรักษาภาวะสมองเสื่อม

สำหรับแพทย์แผนไทยหรือการแพทย์พื้นบ้านได้มีการนำพืชสมุนไพรมาใช้ป้องกันและรักษาภาวะสมองเสื่อม ปัจจุบันพืชสมุนไพรไทยเหล่านี้มีรายงานการวิจัยทางด้านเภสัชวิทยาด้านการป้องกันและรักษาภาวะสมองเสื่อมที่สอดคล้องกับการใช้ดั้งเดิม เช่น พรหมมิ[24] กระทิงลาย[25] ขมิ้นชัน[26] เป็นต้น โดยสมุนไพรบางชนิดได้พัฒนาออกมาอยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์แล้ว เช่น พรหมมิ พืชสมุนไพรทั้งหมดนี้ล้วนแล้วแต่มีศักยภาพในการนำมาวิจัยและพัฒนาต่อไป[22]

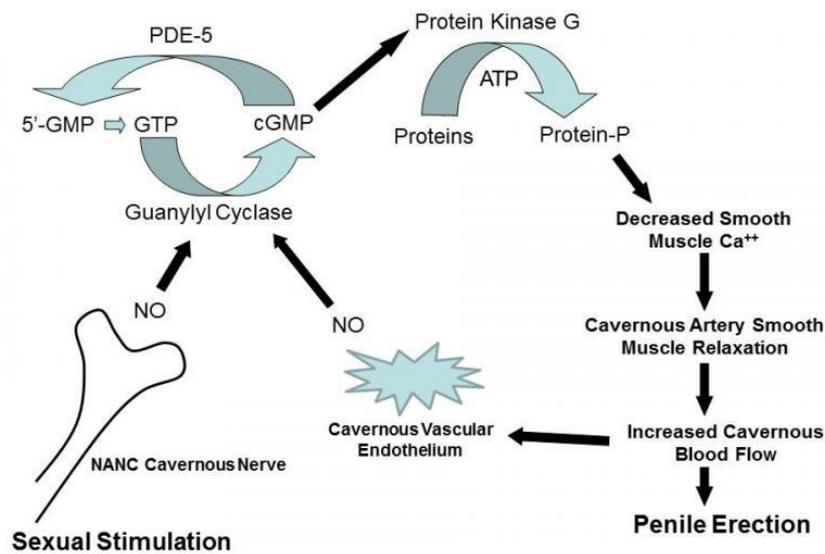
ในส่วนของงานวิจัยนี้ ได้มุ่งเน้นศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรส และต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเคยมีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทั้ง 2 นี้ และบางชนิดได้มีการนำมาใช้บ้างแล้ว เช่น Huperzine A เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นอัลคาลอยด์จำพวก unsaturated sesquiterpene alkaloid ที่แยกได้จากมอส *Huperzia serrata* มีชื่อเรียกในภาษาจีนว่า Qian Ceng Ta หรือ Jin Bu Huan อัลคาลอยด์ชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้ง acetylcholinesterase โดยมีรายงานว่าสามารถผ่าน blood-brain barrier ของสมองได้ดีกว่า physostigmine, galanthamine, donepezil และ tacrine ซึ่งเป็นยาที่มีการนำมาใช้รักษาภาวะนี้ในปัจจุบัน มีการนำ huperzine A มาทดสอบทางคลินิกในระยะที่ 4 กับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์พบว่า สามารถเพิ่มความจำและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ยาหลอก อาการข้างเคียงจาก peripheral cholinergic effect ของ huperzine A มีน้อยมาก แต่ประเทศสหรัฐอเมริกาและบางประเทศในยุโรปยังไม่รับรองให้ใช้ huperzine A เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ แต่ให้ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับผู้ป่วยที่สูญเสียความจำและสมองเสื่อมเท่านั้น เนื่องจาก huperzine A มีรายงานความเป็นพิษต่อตับ (hepatotoxicity)[27, 28] อีกตัวอย่างหนึ่ง ในปัจจุบันได้มีการนำสารต้านออกซิเดชัน resveratrol ซึ่งเป็นสารจำพวก hydroxystilbene ที่สกัดจากเปลือกของผลองุ่นดำเต็มลงในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีสรรพคุณบำรุงความจำ โดย สารชนิดนี้สามารถลดการเกิด reactive oxygen species ได้ จึงช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์จากการถูกทำลายโดยกระบวนการออกซิเดชันได้[21]

การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (erectile dysfunction)

การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (erectile dysfunction หรือ ED) หรือการที่อวัยวะเพศชายไม่เกิดการแข็งตัว เป็นปัญหาซึ่งมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต จากการวิจัยในสหรัฐอเมริกาพบว่าร้อยละ 50 ของผู้ชายอายุ 40 ปีขึ้นไป มีปัญหา ED ตั้งแต่ในระดับไม่รุนแรงจนถึงรุนแรง[6] ในการศึกษาชายไทยอายุระหว่าง 40-70 ปี จำนวน 1,250 คน จาก 8 จังหวัดและกรุงเทพฯ พบว่าชายไทยกลุ่มนี้มีปัญหา ED ร้อยละ 37.5 โดยที่ยังอายุมากขึ้น ปัญหา ED ก็พบบ่อยขึ้น (ร้อยละ 73 ในชายไทยอายุ 60-70 ปี) โดยรวมแล้วส่วนใหญ่ ED อยู่ในขั้นไม่รุนแรง มีเพียงร้อยละ 4.7 ที่รุนแรงคือเสียการแข็งตัวอย่างสิ้นเชิง[6] กลุ่มที่มีปัญหา ED มากที่สุดคือกลุ่มที่มีโรคประจำตัว เช่น ความดันโลหิตสูง เบาหวาน โรคหัวใจ ผู้ป่วยที่ไขสันหลังได้รับการกระทบกระเทือนและผู้ป่วยภายหลังการผ่าตัดต่อมลูกหมาก (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หลังการผ่าตัดมะเร็งต่อมลูกหมาก) ก็มักประสบปัญหา ED [6, 8, 10]

กลไกการเกิดโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศและการรักษา[6, 8, 10, 29]

กระบวนการแข็งตัวของอวัยวะเพศชาย เกิดจากผลของการทำงานหลายส่วนประกอบกัน กล่าวคือ เมื่อมีสิ่งเร้าทางเพศ จะกระตุ้นระบบประสาทอัตโนมัติ ทำให้เกิดการหลั่งสารที่เรียกว่า nitric oxide (NO) และ cyclic GMP ซึ่งมีผลทำให้หลอดเลือดแดงบริเวณอวัยวะเพศขยายตัว และทำให้มีเลือดไหลเข้าสู่อวัยวะเพศมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันเมื่อมีเลือดไหลเข้ามามากขึ้น ทำให้เกิดแรงดันมากขึ้น กดหลอดเลือดดำบริเวณนั้น ทำให้เกิดการคั่งของเลือดภายในอวัยวะเพศ ส่งผลให้อวัยวะเพศแข็งตัว อวัยวะเพศจะอ่อนตัวลงเมื่อ ไม่ได้ถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้าอีก หรือ cyclic GMP ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ phosphodiesterase-5 (PDE5) หลอดเลือดแดงจะเริ่มหดตัว เลือดไหลเข้าน้อยลง แต่ไหลออกมากขึ้น อวัยวะเพศจึงอ่อนตัวลง จะเห็นว่ากระบวนการแข็งตัวของอวัยวะเพศชายนั้นเกิดจากหลายส่วนประกอบกัน ไม่ว่าจะเป็น ระบบประสาท ระบบหลอดเลือด nitric oxide และ cyclic GMP การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศจึงเกิดได้จากหลายสาเหตุ ไม่ได้มีสาเหตุจากจิตใจและความชราเท่านั้น สาเหตุส่วนใหญ่มาจากโรคที่ทำให้เกิดความเสื่อมของหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะเพศ เช่น เบาหวาน ไขมันในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ สูบบุหรี่จัด เมื่อหลอดเลือดเสื่อม จะไม่เกิดการหลั่งสาร nitric oxide และ cyclic GMP หรือ หลั่งออกมาน้อยมาก ซึ่งทำให้อวัยวะเพศไม่สามารถแข็งตัวได้นานพอที่จะมีเพศสัมพันธ์ได้อย่างพึงพอใจ



รูปที่ 2-1 กระบวนการแข็งตัวของอวัยวะเพศชาย

สำหรับการรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การผ่าตัด การใช้อุปกรณ์สูญญากาศ เป็นต้น การใช้ยาก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง โดยยากกลุ่มหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายคือ PDE-5 Inhibitors

ยากลุ่ม Phosphodiesterase5 (PDE5) Inhibitors [9, 10]

ยากลุ่ม PDE-5 inhibitors เป็นยาหลักในการรักษาโรคห่อนสมรรถภาพทางเพศ มีกลไกการออกฤทธิ์ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PDE-5 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลาย cGMP ทั้งนี้ การที่ cGMP ไม่ถูกทำลาย จะทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดแดงจากการเหนี่ยวนำของ nitric oxide และการแข็งตัวขององคชาติ ตามมา ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil และ Avanafil ถึงแม้ว่ายาจะมีประสิทธิภาพดี แต่ก็มีปัญหาเรื่องอาการไม่พึงประสงค์ได้ เช่น ยา Sildenafil และ Vardenafil มีความชอบจับกับ PDE-6 ที่จอประสาทตา ทำให้ผู้ป่วยมีการมองเห็นและการรับรู้สีผิดปกติ ได้แก่ มองภาพไม่ชัดและมองภาพเป็นสีเขียว-ฟ้า (cyanopsia) ในขณะที่ Tadalafil มีความชอบจับกับ PDE-11 ที่กล้ามเนื้อลาย ทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ดังนั้นสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ป่วย เนื่องจากอาจมีอาการไม่พึงประสงค์น้อยกว่า

ในประเทศไทย มีการใช้สมุนไพรหลายชนิดสำหรับผู้ที่เข้าสู่วัยสูงอายุอย่างแพร่หลาย เช่น ยาอายุวัฒนะ ยาบำรุงสมอง ยาบำรุงกำลังและเพิ่มสมรรถภาพทางเพศชาย เช่น กวาวเครือแดง กระชายดำ ม้ากระทืบโรง โถไม้รู้ลัม ปอกระสา เก่าก็ จึงเป็นที่น่าสนใจว่า พืชสมุนไพรเหล่านี้ อาจ มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นยา รักษาการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศในผู้ชายสูงอายุได้

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ มีพื้นที่ครอบคลุมท้องที่อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร และอำเภอแม่วงก์ และกิ่งอำเภอแม่เปิน จังหวัดนครสวรรค์ มีเนื้อที่ประมาณ 558.750 ไร่ หรือ 894 ตารางกิโลเมตร ตั้งรูปที่ 1 อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ได้ถูกประกาศให้เป็นอุทยานแห่งชาติเมื่อวันที่ 2 เมษายน 2528 โดยกำหนดบริเวณที่ดินป่าคลองขลุงและป่าคลองแม่วงก์ในท้องที่ตำบลปางตาไว อำเภอคลองขลุง (ปัจจุบันเป็นอำเภอปางศิลาทอง) จังหวัดกำแพงเพชร และป่าแม่วงก์-แม่เปิน ในท้องที่ตำบลแม่แล้ง และตำบลห้วยน้ำหอม อำเภอลาดยาว จังหวัดนครสวรรค์ (ปัจจุบันเป็นตำบลแม่แล้ง อำเภอแม่วงก์ และตำบลแม่เปิน กิ่งอำเภอแม่เปิน) เป็นอุทยานแห่งชาติ ประกาศไว้ในราชกิจจานุเบกษาเล่ม 104 ตอนที่ 183 ลงวันที่ 14 กันยายน 2530 นับเป็นอุทยานแห่งชาติลำดับที่ 55 ของประเทศไทย โดยลักษณะพืชพรรณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ประกอบด้วย ป่าดิบเขา ประมาณ 0.88 % ป่าดิบแล้ง ประมาณ 21.85 % ป่าดิบแล้งผสมป่าเบญจพรรณชื้นประมาณ 9.24% ป่าเบญจพรรณ ประมาณ 59.05 % ป่าเต็งรัง ประมาณ 6.77 % และทุ่งหญ้าหรือไร่ร้าง ประมาณ 2.21 % [30, 31]

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์เป็นพื้นที่ที่มีการอนุรักษ์มาเป็นเวลานานและมีความหลากหลายทางชีวภาพมาก อีกทั้งยังมีผู้ที่มีความรู้ด้านการใช้สมุนไพรหรือหมอชาวบ้าน ที่มีการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคหรือภาวะต่างๆอยู่ในบริเวณนั้น จึงน่าสนใจและทำการศึกษาว่า บริเวณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์จะมีพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการเสื่อมหรือไม่ และพืชสมุนไพรเหล่านั้นจะมีฤทธิ์ในกับยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ต้านฟอสโฟไดเอสเทอร์สไฟฟว์หรือไม่

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การสำรวจพืชสมุนไพร

สำรวจและบันทึกข้อมูลพืชสมุนไพรในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร โดยทำการสำรวจ 2 ครั้ง ในวันที่ 13-14 กันยายน พ.ศ. 2557 และในวันที่ 16-18 มกราคม พ.ศ.2558 โดยมีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้

1) สร้างแบบสัมภาษณ์เพื่อใช้ในการสำรวจพืชสมุนไพรที่บ้านในท้องถิ่นโดยเก็บข้อมูลดังต่อไปนี้คือ ชื่อวิทยาศาสตร์ของสมุนไพร ชื่อท้องถิ่น ชื่อวงศ์ การใช้ประโยชน์ทางยาและด้านอื่นจากสมุนไพรในท้องถิ่น

2) ลงพื้นที่ เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยการสัมภาษณ์หมอชาวบ้าน 4 ท่าน คือ

1. คุณชาญชัย ศรีนาเมือง 41 ม.5 ต.ชมพู อ.เนินมะปราง อ.พิษณุโลก โทรศัพท์ 08316242152
2. คุณประณีต ศีรประสงค์ ที่อยู่ 50 ม.7 ต.ปางตาไว อ.ปางศิลาทอง จ.กำแพงเพชร โทรศัพท์ 0932317121
3. คุณสุวรรณ คำแก้ว ที่อยู่ 50 ม.7 ต.ปางตาไว อ.ปางศิลาทอง จ.กำแพงเพชร
4. คุณสดี ไค้คำมูล ที่อยู่ 120 ม.7 ต.ปางตาไว อ.ปางศิลาทอง จ.กำแพงเพชร

3) จัดทำตัวอย่างพืชแห้ง (voucher specimen) และบันทึกภาพเพื่อความสะดวกในการตรวจสอบข้อมูล โดยตัวอย่างพืชแห้งจัดเก็บที่พิพิธภัณฑสถานพืช (Herbarium) ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร การพิสูจน์เอกลักษณ์พืชทำโดย ดร. ปราณี นางงาม

4) นำข้อมูลที่ได้มาจัดทำเป็นหนังสือ “สมุนไพรในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์” เพื่อเผยแพร่แก่ประชาชนที่สนใจต่อไป

3.2. การสกัดสารสกัดหยาบจากสมุนไพร

3.2.1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

1. Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. กระจกกรอง
3. ethanol 95%
4. Büchner funnel
5. rotary evaporator

3.2.2. การเตรียมสารสกัด

3.2.2.1. วิธีการสกัดด้วย ethanol 95%

1. แยกพืชออกเป็นส่วนต่างๆที่จะใช้ในการสกัด
2. ล้างพืชให้สะอาด
3. นำพืชมาบดละเอียด

4. นำพืชที่แยกส่วนแล้วไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 °C
5. หมักพืชด้วย ethanol 95% ใน Erlenmeyer flask ในอัตราส่วนพืชต่อ ethanol เท่ากับ 1:5
6. กรองสารสกัดผ่านสุญญากาศด้วย Büchner funnel ครั้งที่ 1 และนำพืชที่บดละเอียดไปหมักต่อรอบที่ 2 ด้วยอัตราส่วนเท่าเดิม เป็นเวลา 3 วัน
7. กรองสารสกัดผ่านสุญญากาศด้วย Büchner funnel ครั้งที่ 2
8. นำสารสกัดที่ได้ทั้งสองครั้งรวมกันแล้วนำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator
9. เก็บสารสกัดลงในขวดยาหม่อง ชั่งน้ำหนักสารสกัดแห้ง
10. เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 °C เพื่อทำการทดลองต่อไป

3.2.2.2. วิธีการสกัดด้วยน้ำสำหรับโคไมรัลล์

1. หลังจากผ่านการบดและอบให้แห้งแล้ว ใส่สารสกัดลงในขวดยาหม่อง ขนาด 15 ml
2. ผิดผ้าด้วยฟรอยด์ เจาะรูด้านบน
3. นำไปเข้าเครื่อง freeze dry machine จำนวน 3 วัน
4. ชั่งน้ำหนักสารสกัดแห้ง
5. เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 °C เพื่อทำการทดลองต่อไป

3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตัวอย่าง

3.3.1. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส [32, 33]

จากวิธีการทดสอบของ Ellman และคณะ และปรับโดย Ingkaninan และคณะ โดยวิธีการที่ใช้คือ ใช้ acetylthiocholine (ACh) เป็นสารตั้งต้น สารจะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis กับ AChE ได้ thiocholine ออกมา สารนี้จะเกิดปฏิกิริยากับ 5,5 dithiobis-2 nitrobenzoate (DTNB) ได้สารสีเหลืองซึ่งสามารถตรวจวัดได้ที่ 405 nm โดยนำสารผสมของ 3mM DTNB 125 μ l, 15mM acetylthiocholine iodide (ATCI) 25 μ l, 50mM Tris-HCl buffer pH 8.0 50 μ l, และสารตัวอย่างที่ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี methanol ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ 25 μ l เติมลงใน wells แล้วจึงเติมเอนไซม์ AChE เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง การทดลองนี้ ทำใน 96-welled plate และ ใช้ microplate reader ในการตรวจวัด velocity ในการ absorb แสง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงค่า activity ของเอนไซม์ โดยค่าการยับยั้งเอนไซม์ของตัวอย่างจะถูกเทียบกับ galanthamine โดยจะวัดความไวของปฏิกิริยาโดยนำ microplate ไปอ่านค่าที่ความยาวคลื่น 405 nM ทุก 5 วินาที เป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่อง a CERES UV 900C microplate reader (Bio-Tek instrument, USA) ฤทธิ์ของเอนไซม์คำนวณจากเปอร์เซ็นต์ของความไวของปฏิกิริยาเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของ control ฤทธิ์ในการยับยั้งคำนวณจากเปอร์เซ็นต์ของฤทธิ์ของเอนไซม์หักจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกขั้นตอนจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง อนึ่งในการตรวจวัด จะวัด velocity ในการ absorb แสงของตัวอย่าง และ reagent ก่อนที่จะใส่เอนไซม์ แล้วนำมาหักออกจากค่าที่วัดได้หลังใส่เอนไซม์ เพื่อให้เป็นค่าที่ถูกต้องแม่นยำขึ้น การทดลองทั้งหมดทำแบบ triplicate และจะแสดงผลด้วยค่า mean และ standard deviation

ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้าน AChE ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของตัวอย่าง 0.1 mg/ml จะถูกนำมาหาค่า IC₅₀ (ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์) โดยการละลายตัวอย่างใน methanol (ให้ความเข้มข้นสุดท้ายไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์) แล้วเจือจางด้วย Tris-HCl buffer ที่ 10-12 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แล้ววัดค่า เปอร์เซ็นต์ acetylcholinesterase inhibition นำมา plot dose-response curve แล้ววิเคราะห์ IC₅₀ โดยใช้ software package Prism (Graph Pad Inc, San Diego, USA).

ตารางที่ 3-1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

Method	Tris HCl pH8 (μ L)	ATCI (μ L)	Sample (μ L)	DTNB (μ L)	AChE (μ L)
Sample or STD.	50	25	25	125	25
Control	75	25	0	125	25

3.3.2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[34, 35]

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย DPPH assay ทำได้โดยนำสารสกัดมาเตรียมเป็นสารละลายใน methanol เจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆในช่วง 50 μ g–1000 μ g/ml บีบสารละลายตัวอย่าง 100 μ l ใส่ในหลุม microtiter plate ในแต่ละความเข้มข้น แล้วเติมสารละลายของ DPPH ใน absolute ethanol 100 μ l หลังจากนั้น ทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 nm เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมี methanol แทนสารสกัด โดยใช้ methanol เท่านั้นเป็น blank จากนั้นจึงนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

$$A_{\text{sample}} = \text{ค่าการดูดกลืนของแสงชุดสารสกัด}$$

$$A_{\text{control}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงชุดควบคุม}$$

หาค่า IC₅₀ จากการนำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของสารตัวอย่างมาสร้างกราฟ และรายงานผลเป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Method	Sample or STD. (μ L)	MeOH (μ L)	0.2 mM DPPH (μ L)
Sample or STD.	75	0	150

Control	0	75	150
Blank of Sample	75	150	0
Blank of Control	0	225	0

3.3.3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอร์สไฟว์[36]

3.3.3.1. การเตรียม PDE 5 solution

สารเคมีที่ใช้

1. Buffer P = 150 mM tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) (Sigma Chemical, St. Louis,

MO, U.S.A.), pH 7.5 + 6 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) (Sigma Chemical, St. Louis,

MO, U.S.A.) + 3 mM dithiothreitol (DTT) (Amresco, Ohio, U.S.A)

2. Buffer PP = Buffer P + 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma-alorich, Germany)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง homogenizer
2. เครื่อง centrifuge

วิธีการเตรียม PDE 5 solution

1. นำปอดหนูมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ
2. ใส่ buffer PP 2 ml
3. นำปอดหนูที่ตัดแล้วมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer
4. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4°C 14000 rpm เป็นเวลา 20 นาที
5. ดูดเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายใส (supernatant) แล้วแช่เย็นไว้เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์

ทางชีวภาพต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

วิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่าง (stock solution) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้าน PDE5

1. ชั่งสารสกัดสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ
2. เติม methanol (MeOH) ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 5 mg/ml
3. ดูดสารสกัดจากข้อ 2 มา 50 µl
4. เติมน้ำลงไป 950 µl จะได้ความเข้มข้นสารสกัด 250 µg/ml

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตัวอย่าง PDE-5 inhibitory activity assay ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 µg/ml

สารเคมีที่ใช้

1. 5 mM EGTA
2. Buffer A = (100 mM Tris(pH 7.5), 100 mM imidazole) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.) + 15 mM magnesium chloride (MgCl₂) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.)+ 1.0 mg/ml bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.)
3. PDE-5 solution
4. 5% Methanol (MeOH)
5. น้ำ
6. สารละลายสารสกัดสมุนไพรรูปใน 5%MeOH
7. [³H] cGMP (50,000 cpm) (Perkin Elmer, Boston, MA, U.S.A.)
8. 1.25 mg/ml snake venom (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.)
9. Low salt buffer (20 mM Tris-HCl, pH 6.8)
10. High salt buffer (20 mM Tris-HCl + 500 mM sodium Chloride (NaCl), pH 6.8)
11. scintillation fluid (Perkin Elmer, U.S.A.)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. diethylaminoethyl sephadex (DEAE-Sephadex) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.)
2. scintillation counter (Tri-Carb 2910 TR, Perkin Elmer, U.S.A.)

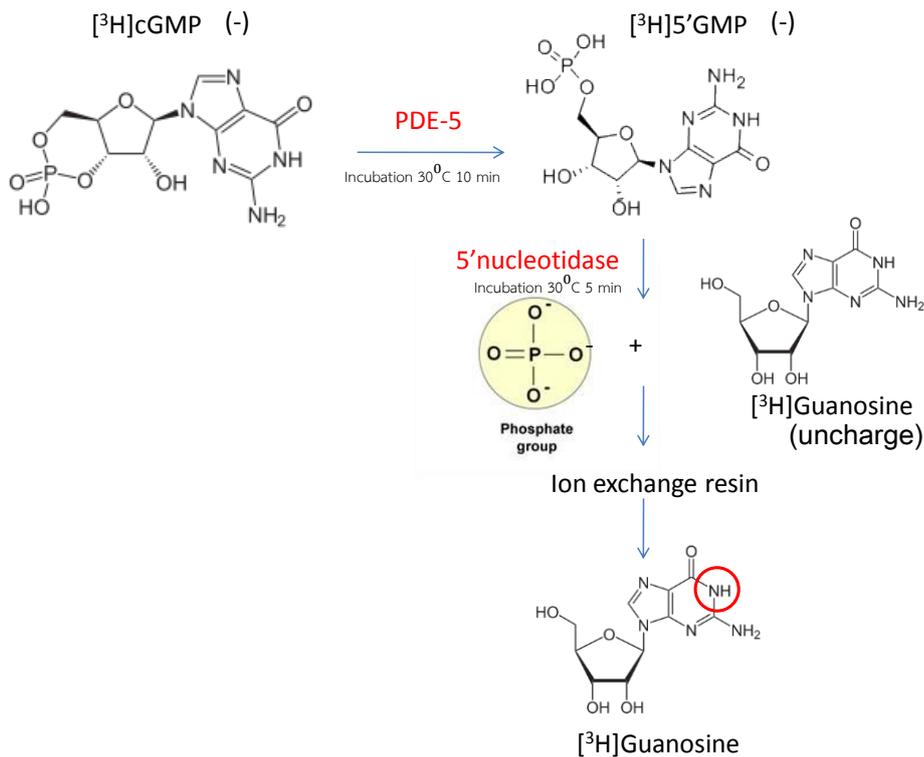
วิธีการทดสอบ

1. เติม 50 µl ของ 5 mM EDTA ลงใน eppendroff
2. เติม 50 µl ของ buffer A
3. เติม 50 µl ของ diluted PDE-5 enzyme (จะต้อง dilute stock enzyme ให้ได้ค่า %hydrolysis อยู่ในช่วง 20-25%)
4. เติม 50 µl ของสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ (ในกรณีเป็นสารสกัดให้เตรียม sample stock เท่ากับ 250 µl/ml)
5. เติมสารตั้งต้น [³H] cGMP (ที่มีความแรงของสารรังสีเท่ากับ 50000 cpm) ขึ้นตอนนี้ปฏิกิริยาจะเริ่มต้น
6. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 10 นาที
7. หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือด นาน 1 นาที
8. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในถังน้ำแข็ง
9. เติม 50 µl ของ 1.25 mg/ml snake venom
10. นำไปบ่มต่อที่ อุณหภูมิ 30 °C นาน 5 นาที เพื่อเริ่มปฏิกิริยาขั้นที่ 2 ในการเปลี่ยน [³H] – 5'GMP ไปเป็น [³H]Guanosine และ phosphate
11. เติม 250 µl ของ low salt buffer (20 mM This-HCl pH 6.8)

12. เทสารละลายทั้งหมดในข้อ 11 ลงใน DEAE ion exchange column โดยขั้นตอนนี้ไม่ต้องรับสารละลายที่ไหลผ่าน column
13. นำ vial สะอาด ขนาด 7 มารองรับใต้ column
14. เริ่มต้นการ elute สาร [³H]Guanosine โดยการเติม 500 µl ของ low salt buffer ลงไป รอจนไม่มีสารละลายไหลออกมาจาก column แล้วจึงทำซ้ำอีก 3 ครั้ง
15. เติม 4 ml ของ scintillation fluid ลงใน vial
16. ปิดฝา vial ให้สนิท เขียน label รหัสตัวอย่างให้ชัดเจนบนฝา แล้วเขย่าให้สารละลายเข้ากันจนใส
17. นำไปวัดค่าปริมาณรังสีด้วยเครื่อง liquid scintillation counter

ตารางที่ 3-3 ขั้นตอนการทดสอบ PDE-5 inhibitory activity assay

Chemical	Volume (μ l)		
	Blank	Control	Sample
1. 5 mM EGTA	50	50	50
2. Buffer A	50	50	50
3. PDE-5 solution	0	50	50
4. 5% MeOH	50	50	0
5. Water	50	0	0
6. Sample in 5% MeOH	0	0	50
7. [3 H] cGMP (50,000 cpm)	50	50	50
นำไปปมที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือด นาน 1 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในถังน้ำแข็ง			
1.25 mg/ml snake venom	50	50	50
นำไปปมต่อที่ อุณหภูมิ 30 °C นาน 5 นาที			
Low salt buffer	250	250	250
เทสารละลาย ลงใน DEAE ion exchange column โดยขั้นตอนนี้ไม่ต้องรับสารละลายที่ไหลผ่าน column นำ vial สะอาด ขนาด 7ml มารองรับใต้ column			
Chemical	Volume (μ l)		
	Blank	Control	Sample
Low salt buffer	500 x 4	500 x 4	500 x 4
scintillation fluid	4 ml	4 ml	4 ml
ปิดฝา vial ให้สนิท เขียน label รหัสตัวอย่างให้ชัดเจนบนฝา แล้วเขย่าให้สารละลายเข้ากันจนใส นำไปวัดค่าปริมาณรังสีด้วยเครื่อง liquid scintillation counter			



รูปที่ 3-1 ปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นตามการทดสอบ PDE-5 inhibitory activity assay

การคำนวณ%PDE5 inhibition [37]

$$\% \text{ hydrolysis control} = \left[\frac{(\text{CPM}_{\text{control}} - \text{CPM}_{\text{background}})}{(\text{CPM}_{\text{total count}} - \text{CPM}_{\text{background}})} \right] \times 100$$

$$\% \text{ hydrolysis sample} = \left[\frac{(\text{CPM}_{\text{sample}} - \text{CPM}_{\text{background}})}{(\text{CPM}_{\text{total count}} - \text{CPM}_{\text{background}})} \right] \times 100$$

$$\% \text{ PDE-5 inhibition} = \left[1 - \frac{\% \text{ hydrolysis sample}}{\% \text{ hydrolysis control}} \right] \times 100$$

โดย $\text{CPM}_{\text{sample}}$ คือค่า radioactivity จากการทดลองที่มีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบ

$\text{CPM}_{\text{background}}$ คือ ค่า radioactivity จากการทดลองที่ไม่มีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบ

$\text{CPM}_{\text{total count}}$ คือค่า radioactivity รวมระหว่าง substrate และ salt buffer

% hydrolysis sample และ % hydrolysis control คือ enzyme activities ของสารตัวอย่างและ solvent ที่ใช้ในการทดลองตามลำดับ

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการสำรวจพืชสมุนไพรพื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

จากการสำรวจพืชสมุนไพรพื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ. กำแพงเพชร ในวันที่ 13-14 กันยายน พ.ศ. 2557 และในวันที่ 16-18 มกราคม พ.ศ.2558 พบพืชสมุนไพรทั้งหมด 51 ชนิด โดยอยู่ใน 29 วงศ์ โดยพบพืชในวงศ์ Fabaceae และ Malvaceae มากที่สุด คือ 12 ชนิด และ 6 ชนิดตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) แบ่งตามสรรพคุณที่รักษาออกเป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มยาบำรุงกำลัง, กลุ่มยาเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ, กลุ่มยาเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร, กลุ่มยาลดไข้, กลุ่มยาเกี่ยวกับระบบทางเดินปัสสาวะ และ กลุ่มยาถอนพิษ (ตารางที่ 4-2)

ตารางที่ 4-1 ผลการสำรวจสมุนไพรจำแนกตามวงศ์

ลำดับ	วงศ์(Families)	จำนวนชนิด	ร้อยละ
1	FABACEAE	12	23.53
2	MALVACEAE	6	11.76
3	ACANTHACEAE	2	3.92
4	ASTERACEAE	2	3.92
5	EUPHOBIAEAE	2	3.92
6	RHAMNACEAE	2	3.92
7	STEMONACEAE	2	3.92
8	ZINGIBERACEAE	2	3.92
9	ANNONACEAE	1	1.96
10	APOCYNACEAE	1	1.96
11	ARISTOLOCHIACEAE	1	1.96
12	CAPPARACEAE	1	1.96
13	CONNARACEAE	1	1.96
14	CONVOLVULACEAE	1	1.96
15	CUCURBITACEAE	1	1.96
16	DIOSCOREACEAE	1	1.96
17	HYPERICACEAE	1	1.96
18	HYPOXIDACEAE	1	1.96
19	LEEACEAE	1	1.96
20	MENISPERMACEAE	1	1.96
21	ORCHIDACEAE	1	1.96

ตารางที่ 4-1 ผลการสำรวจสมุนไพรรักษาโรคตามวงศ์ (ต่อ)

ลำดับ	วงศ์(Families)	จำนวนชนิด	ร้อยละ
22	OROBANCHACEAE	1	1.96
23	OXALIDACEAE	1	1.96
24	PHYLLANTHACEAE	1	1.96
25	PLANTAGINACEAE	1	1.96
26	RUBIACEAE	1	1.96
27	SAPINDACEAE	1	1.96
28	SYMPLOCACEAE	1	1.96
29	TALINACEAE	1	1.96
	รวม	51	100.00

ตารางที่ 4-2 ผลการสำรวจสมุนไพรรักษาตามสรรพคุณที่ใช้รักษา

ลำดับ	สรรพคุณ	จำนวนชนิด	ร้อยละ
1	กลุ่มโรคและอาการเจ็บป่วยอื่นๆ	18	35.29
2	กลุ่มยาบำรุงกำลัง	8	15.69
3	กลุ่มยาเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร	8	15.69
4	กลุ่มยาลดไข้	7	13.73
5	กลุ่มยาถอนพิษพิษ	6	11.76
6	กลุ่มยาเกี่ยวกับระบบทางเดินปัสสาวะ	2	3.92
7	กลุ่มยาเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ	2	3.92
	รวม	51	100.00

ตารางที่ 4-3 สมุนไพรที่สำรวจพบและมีการใช้พื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ	ส่วนที่ใช้	Collection No.
1.	กำลังเจ็ดข้างสาร	หญ้าขึ้นาก	ACANTHACEAE	<i>Dicliptera roxburghiana</i> Nees	ยาบำรุงกำลังทั้งชายและหญิง	ทั้งต้นต้มน้ำดื่ม	PN2120
2.	ฮ่อม,คราม	ห้อมข้าง	ACANTHACEAE	<i>Phlogacanthus curvijlorus</i> Nees	ใช้ย้อมผ้า	ทั้งต้น	Ing060
3.	รางจืดเถา	รางจืด	ACANTHACEAE	<i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl.	ใบ	คั้นน้ำใบสด แก้ไข้ ถอนพิษ	Ing043
4.	น้ำน้อย	กลิ้งกล่อม	ANNONACEAE	<i>Polyalthia suberosa</i> Thwaites	เพิ่มน้ำมัน	ลำต้นเนื้อไม้	PN2132
5.	โตไม่รู้ล้ม	หญ้าไก่ นกคุ้ม โตไม่รู้ล้ม	ASTERACEAE	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>	ยาบำรุงกำลัง	ทั้งต้นดอกแห้ง/ต้มน้ำดื่ม	Ing020
6.	คำหยองป่า	ประจำดีควาย, ฝอยทองอินทนนท์	ASTERACEAE	<i>Gynura cusimbua</i> (D. Don) S. Moore	ใช้เป็นยาหอม,ยา ลม	ดอกต้มน้ำดื่ม	Ing061
7.	ขี้ครอก	ขี้อันใหญ่	CUCURBITACEAE	<i>Pavonia repanda</i> (Roxb. ex Sm.) Spreng.	แก้แผลฝีหนอง	ลูกสดหรือลูกแห้ง	PN2122
8.	มะระขี้นก	มะระ	CURCUBITACEAE	<i>Momordica charantia</i> L.	แก้ไข้	ใบ ยอดต้มน้ำดื่ม	PN2121
9.	กลอย	กลอย มันกลอย	DIOSCOREACEAE	<i>Dioscorea hispida</i> Dennst.	แก้ผ้า	หัว	Ing027

ตารางที่ 4-3 สมุนไพรที่สำรวจพบและมีการใช้พื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ	ส่วนที่ใช้	Collection No.
10.	หนวดตองแตก	-	EUPHOBIAEAE	<i>Baliospermum salonifolium</i> (Burm.) Suresh	ยาระบาย,รักษา ไข้	รากต้มน้ำดื่ม	PN2137
11.	เปล้าตองแตก(เปล้าเล็ก)	ตองแตกใบยาว ตองแตกเล็ก เปล้า ดอย เปล้าตองแตก	EUPHORBIACEAE	<i>Baliospermum calycinum</i> Müll. Arg.	แก้ลิ้นเป็นฝ้า ลอกฝ้าขาวใน ปาก	ยาง	Ing022
12.	ส้มเสี้ยวป่า กากหลงเขา เสี้ยวป้อม เสี้ยวน้อย	เสี้ยวพ้อม	FABACEAE	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	ใช้เป็นยาลม	ต้น	Ing033
13.	ชะเลือด หนามปูย่า หนามพะย้า ช้าเรือด ฝักชะยา	กำจาย กระจาย	FABACEAE	<i>Caesalpinia digyna</i> Rottler	ขับลมในกระเพาะ	ยอด	Ing036
14.	ถั่วแระผี	หิ้งเม่น	FABACEAE	<i>Crotalaria pallida</i> Aiton	แก้ไอเสบ แก้ไข้	ฝักต้มน้ำดื่ม	Ing053
15.	รางจืดต้น	คางเลื่อย	FABACEAE	<i>Crotalaria tetragona</i> Andrews	ถอนพิษ ถอนพิษ เบื่อเมา	ใบ ต้น ฝัก ราก	PN2124
16.	แพงคำฮ้อย	อีเหนียว นางเหนียว	FABACEAE	<i>Desmodium gangeticum</i> (L.) DC.	ยาระบาย ยาถ่าย	ใบต้มน้ำดื่ม	Ing051
17.	สะบ้า	สะบ้า สะบ้ามอญ	FABACEAE	<i>Entada rheedii</i> Spreng.	บำรุงกำลัง	เถาต้มน้ำดื่ม	Ing041
18.	โสดทะนงขาว,นูดพระ, เกล็ดน้มนวล	ขี้ตั้ง นูดพระ หงอน ไก่	FABACEAE	<i>Flemingia strobilifera</i> (L.) W. T. Aiton	แก้พิษสัตว์กัด ต่อย เบื่อเมา	รากต้มน้ำดื่ม	Ing047

ตารางที่ 4-3 สมุนไพรที่สำรวจพบและมีการใช้พื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ	ส่วนที่ใช้	Collection No.
19.	ห้าควาย	ฝักเหี่ยววัว	FABACEAE	<i>Millettia caerulea</i> Baker	ถ่ายพยาธิในวัว ควาย	ใบ เปลือกต้น	PN2129
20.	โลดทะนงแดง ,เกล็ดปลาซ่อน	-	FABACEAE	<i>Phyllodium pulchellum</i> (L.) Desv.	ถอนพิษงูกัด	ราก	PN2125
21.	โลดทะนงขาว,ข้าวเม่านก	ข้าวเม่านก	FABACEAE	<i>Tadehagi triquetrum</i> (L.) H. Ohashi	แก้พิษเมาเบื่อ	ต้นต้มน้ำดื่ม	PN2133
22.	หญ้าหางเสือ	หางหมาจอก	FABACEAE	<i>Uraria crinita</i> (L.) DC.	แก้หอบหืด แก้ไอ	รากต้มน้ำดื่ม	Ing048
23.	ตี้วแดง(ตี้วเกลี้ยง)	ตี้วเกลี้ยง	HYPERICACEAE	<i>Cratoxylum</i> <i>cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ต้นหรือราก ผสม ลำต้น กำแพงเจ็ดชั้นต้ม น้ำดื่มแก้กระษัย เป็นยาระบาย	ต้นหรือราก	Ing038
24.	ตาลเดี่ยว(ใบแบบตาล)	ว่านพร้าว	HYPOXIDACEAE	<i>Curculigo</i> <i>orchioides</i> Gaertn.	แก้หน้าเป็นฝ้า	หัว ต้น	Ing028

ตารางที่ 4-3 สมุนไพรที่สำรวจพบและมีการใช้พื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ	ส่วนที่ใช้	Collection No.
25.	กะตังขาว	กะตังใบ	LEEACEAE	<i>Leea indica</i> (Brum. f.) Merr.	ใบ ต้มแล้วย่างไฟ ใช้พอกศีรษะแก้ วิงเวียน และตำ พอกแก้ปวดเมื่อย กล้ามเนื้อ	ใบ	PN2143
26.	Abelmoschus	ชะมดตัน เทียนชะมด ฝ้ายผี Musk mallow	MALVACEAE	<i>Abelmoschus moschatus</i> Medik. Subsp. Moschatus	แก้ไอ	ใบต้มน้ำดื่ม	PN2126
27.	ปอบิด	ปอบิด ขี้นใหญ่ มะ ปิด	MALVACEAE	<i>Helicteres isora</i> L.	แก้ปวดเมื่อย แก้ เบาหวาน	ลูก(ผล)ต้มน้ำดื่ม	Ing025
28.	กระเจี๊ยบเขา,กระเจี๊ยบ ป่า,ส้มสันดาน	ปอแก้ว	MALVACEAE	<i>Hibiscus radiatus</i> Cav.	ถ่ายพยาธิตัวจิ๊ด	กลีบดอกต้มน้ำดื่ม	PN2131
29.	ขัดมอญตัวผู้, หญ้าขัด,	หญ้าขัด	MALVACEAE	<i>Sida rhombifolia</i> subsp. <i>rhombifolia</i>	แก้กระตุก ขัดเบา	ราก ต้มต้มน้ำดื่ม	PN2127
30.	ชะมดตัน	ปอลมปม	MALVACEAE	<i>Thespesia lampas</i> (Cav.) Dalzell	แก้ไอ	รากต้มน้ำดื่ม	PN2130
31.	เครือหมาน้อย	-	MENISPERMACE AE	<i>Cyclea varians</i> Craib	ยาอายุวัฒนะ	ใบ ยอด	PN2123

ตารางที่ 4-3 สมุนไพรที่สำรวจพบและมีการใช้พื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ	ส่วนที่ใช้	Collection No.
32.	แผ่นดินเย็น/ตาลเดี่ยว ใบบัว	-	ORCHIDACEAE	<i>Nervilia aragoana</i> Gaudich.	รักษาสิว/ฝ้า	หัวใต้ดินฝนเป็นผง ผสมกับแป้งทาหน้า	Ing030
33.	ดอกดิน	ดอกดินแดง	OROBANCHACEA E	<i>Aeginetia indica</i> L.	ทำขนม แก้วแผล เรือรัง เผาไฟให้เป้ นาถ่าน บดเป็นผง โรยยา	ทั้งต้นตากแห้ง	PN2096
34.	ดอกดิน	ดอกดินแดง	OROBANCHACEA E	<i>Aeginetia indica</i> L.	ทำขนม แก้วแผล เรือรัง เผาไฟให้เป้ นาถ่าน บดเป็นผง โรยยา	ทั้งต้นตากแห้ง	PN2096
35.	กระทืบยอบ	-	OXALIDACEAE	<i>Biophytum sensitivum</i> (L.) DC.	แก้เบาหวาน แก้ ไข้ แก้มะเร็ง แก้ อัมพาต	ทั้งต้นต้มน้ำดื่ม	Ing055
36.	มะเฒ่า,หมักเฒ่า	มะเฒ่าสาย	PHYLLANTHACE AE	<i>Antidesma sootepense</i> Craib	ยาระบาย แก้ ท้องเสีย	ผลสุกและดิบ กิน สด, กิ่งใบต้มน้ำแก้ ท้องเสีย	PN2086
37.	กรดน้ำ	กรดน้ำ กระต่ายจาม ใหญ่ ชัดมอนเล็ก	PLANTAGINACEA E	<i>Scoparia dulcis</i> L.	แก้ไข้	ใบ ต้ม รากต้มน้ำ ดื่ม	PN2136

ตารางที่ 4-3 สมุนไพรที่สำรวจพบและมีการใช้พื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ	ส่วนที่ใช้	Collection No.
38.	รางแดง เถาวัลย์เหล็ก เครือเขาแกลบ	รางแดง	RHAMNACEAE	<i>Ventilago denticulata</i> Willd.	แก้พิษ ไตพิการ	เถา แก่น เปลือกต้ม น้ำดื่ม	Ing021
39.	เล็บเหยี่ยว	เล็บเหยี่ยว	RHAMNACEAE	<i>Ziziphus oenoplia</i> (L.) Mill. Var. <i>oenoplia</i>	ยาบำรุงร่างกาย แก้ไข้ ดีซ่าน	เนื้อไม้ต้มน้ำดื่ม	PN2153
40.	พญาเสือโคร่ง	-	ROSACEAE	<i>Docynia delavayi</i> C.K.Schneid.	บำรุงกำลัง บำรุง ธาตุ	เปลือกต้นต้มน้ำดื่ม	PN2155
41.	คัตเค้า, ปู่เจ้าขวางคลอง	คัตเค้าเครือ	RUBIACEAE	<i>Oxyceros horridus</i> Lour.	แก้ไข้	ลำต้นต้มน้ำดื่ม	PN2140
42.	เครื่องเห่า	เครื่องเห่า	RUTACEAE	<i>Toddalia asiatica</i> (L.) Lam.	ขับปัสสาวะ	ต้นต้มน้ำดื่ม	PN2156
43.	ต่อไล่, ก้ามปู, ตานขโมย, ตานอีลีน	ต่อไล่	SAPINDACEAE	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	บำรุงเลือด	ราก ลำต้นต้มน้ำดื่ม	PN2101
44.	กระโดน	-	SYMPLOCACEAE	<i>Symplocos</i> sp.	แก้ท้องเสีย	ยอดใบอ่อนทานสด/ เปลือกต้มน้ำทานน้ำ	PN2087
45.	โสมไทย	-	TALINACEAE	<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.	บำรุงร่างกาย	หัวต้มน้ำดื่ม	Ing042
46.	ข่าคม	-	ZINGIBERACEAE	<i>Alpinia</i> sp.	แก้ปวดเมื่อย	เหง้า	Ing058
47.	ส้มกบแดง, พญาหงอน นาค	หงอนนาค	ZINGIBERACEAE	<i>Boesenbergia xiphostachya</i> (Gagnep.) Loes.	ใช้เป็นอาหาร	ลำต้น	PN2090

ตารางที่ 4-3 สมุนไพรที่สำรวจพบและมีการใช้พื้นบ้านในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ	ส่วนที่ใช้	Collection No.
48.	กระชาย	กระชาย	ZINGIBERACEAE	<i>Boesenbergia rotunda</i> (L.) Mansf.	ขับลม	เหง้าต้มน้ำดื่ม	PN 2092
49.	นมนาง ,เถานมสาว	พุงแก พุงซี่ น้านอง	CAPPARACEAE	<i>Capparis siamensis</i> Kurz	เพิ่มน้ำนม	เถาต้มน้ำดื่ม	PN2134
50.	หงอนไก่ป่า,หมาตายไม่ ต้องลาก	หงอนไก่	CONNARACEAE	<i>Cnestis palala</i> (Lour.) Merr.	ถอนพิษจากยา เสพติด(ทำให้ อาเจียน),ยาเบื่อ	ราก	Ing044
51.	จิงจ้อ	จิงจ้อเหลือง	CONVOLVULACEAE	<i>Merremia vitifolia</i> (Burm. f.) Hallier f.	แก้ไข้	เถา ลูก รากต้มน้ำดื่ม	PN2146

หมายเหตุ: * หมายถึง อ้างอิงจากชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม 2557

ตารางที่ 4-4 สมุนไพรที่สำรวจพบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ**	ส่วนที่ใช้**	Collection No.
1	หญ้าบังไพร	หญ้าบังไพร	ACANTHACEAE	<i>Andrographis laxiflora</i> (Blume) Lindau	-	-	PN2141
2	ระงับ	ระงับ	ACANTHACEAE	<i>Barleria siamensis</i> Craib	-	.-	PN2144
4	unknown	-	ACANTHACEAE	<i>Strobilanthes microcarpa</i> T.Anderson	-	-	Ing066
5	unknown	-	ACANTHACEAE	<i>Strobilanthes serrata</i> J. B. Imlay	-	-	PN2152
6	unknown	-	ACANTHACEAE	<i>Strobilanthes speciosus</i> Bl.	-	-	Ing064
7	จิงจ้อร่างแห	เถาตดหมา	CONVOLVULACEAE	<i>Xenostegia tridentate</i>	-	-	PN2147
8	unknown	มหาสแดง	CYATHEACEAE	<i>Cyathea gigantea</i> (Wall. ex Hook.) Holttum	ไม้ประดับ	-	Ing062
9	เสี้ยวดอกเหลือง	เสี้ยวพอม	FABACEAE	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv. var. <i>viridescens</i>	ไม้ประดับ	-	PN2135

ตารางที่ 4-4 สมุนไพรที่สำรวจพบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ**	ส่วนที่ใช้**	Collection No.
10	เกลือบหมู	หญ้าตัดแมว	FABACEAE	<i>Desmodium teres</i> Benth.	-	-	Ing035
11	หญ้าหางอิน	หางหมา	FABACEAE	<i>Uraria cordifolia</i> Wall.	-	-	Ing052
12	หญ้าแม่ร้าง	ฉัตรพระอินทร์ดอกใหญ่	LAMIACEAE	<i>Hyptis capitata</i> Jacq.	-	-	Ing046
13	ปอซี่ไก่	ขี้ฉ้อ	MALVACEAE	<i>Helicteres elongata</i> Wall. ex Bojer	-	-	PN2102
14	unknown	ตลับเกลี้ยง	MALVACEAE	<i>Sida mysorensis</i> Wight & Arn.	-	-	PN2127
15	กล้วยไม้ดิน	เอื้องหอมเตย	ORCHIDACEAE	<i>Habenaria lucida</i> Wall. ex Lindl.	ไม้ประดับ	-	PN2088
16	ลูกใต้ใบ, มะยมป่า	มะยมเกลี้ยง	PHYLLANTHACEAE	<i>Sauropus quadrangularis</i> (Willd.) Müll. Arg.	-	-	PN2104
17	พญาแดง	พญาแดง	POLYGONACEAE	<i>Persicaria chinensis</i> (L.) Nakai var. <i>chinensis</i>	-	-	PN2149

ตารางที่ 4-4 สมุนไพรที่สำรวจพบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ**	ส่วนที่ใช้**	Collection No.
18	หนามทะเลว้าง	เคล็ดน้ำ	RUBIACEAE	<i>Catunaregam longispina</i> (Link) Tirveng.	-	-	PN2145
19	โปรงฟ้า, ลอดฟ้า	นมวัว	RUTACEAE	<i>Micromelum integerrimum</i> (Buch.-Ham ex DC.) Wight & Arn. ex Roem.	-	-	PN2150
20	สีพันคนทา	คนทา	SIMAROUBACEAE	<i>Harrisonia perforata</i> (Blanco) Merr.	ลดไข้	รากต้มน้ำดื่ม	Ing040
21	सानเห็บ	ไข่ปลา	URTICACEAE	<i>Debregeasia longifolia</i> (Burm.f.) Wedd.	-	-	PN2154
22	น้ำเต้าปา	หุน	VITACEAE	<i>Cissus adnata</i> Roxb.	-	-	Ing034
23	unknown	กระเจียวขาว	ZINGIBERACEAE	<i>Curcuma parviflora</i> Wall.	ทาแก้ปวดเมื่อย	ทั้งต้นคั้นยวกับน้ำมัน	PN2105
24	เข้าพรรษาขาว, เลี้ยวน้อย	-	ZINGIBERACEAE	<i>Globba albiflora</i> Ridl. Var. albiflora	-	-	PN2078
25	เข้าพรรษาเหลือง	-	ZINGIBERACEAE	<i>Globba</i> sp.	-	-	PN2100

ตารางที่ 4-4 สมุนไพรที่สำรวจพบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อทั่วไป*	ชื่อวงศ์*	ชื่อวิทยาศาสตร์*	สรรพคุณ**	ส่วนที่ใช้**	Collection No.
26	ว่านเพชรน้อย	-	ZINGIBERACEAE	<i>Stahlianthus campanulatus</i> Kuntze			PN2097
27	กระทือ	-	ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber</i> sp.	-	-	PN2106
28	unknown	-	to be identified	<i>Curcuma</i> sp.	-	-	PN2089
29	รางจืด	-	to be identified	<i>Thunbergia</i> sp.	-	-	Ing024
30	กระเจียวเล็ก	-	to be identified	to be identified	-	-	PN2099
31	ดาบพระฤาษีพม่า ตีเมีย, ขี้กระตีด , ตีดหมา, ตีดแมว , หญ้าสองปล้อง	-	to be identified	to be identified	-	-	Ing049
32	ปฐู	-	to be identified	to be identified	-	-	PN2142
33	เปล้าใหญ่	-	to be identified	to be identified	-	-	Ing023

หมายเหตุ: * หมายถึง อ้างอิงจากชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม 2557 ** หมายถึง อ้างอิงจาก ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ <http://www.qsbg.or>

4.2 ผลการสกัดสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ตารางที่ 4-5 รายชื่อพืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนที่ใช้ และผลการสกัดจากส่วนต่างๆของพืช

No.	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	%yield เทียบกับ น้ำหนักพืชแห้ง
1	กำลังเจ็ดข้างสาร	ACANTHACEAE	<i>Dicliptera roxburghiana</i> Nees	ลำต้น ใบ ดอก	17.4
2	ไก่ฟ้าน้อย	ARISTOLOCHIACEAE	<i>Aristolochia tagala</i> Cham.	เหนือดิน	22.33
3	โตไม่รู้ล้ม	ASTERACEAE	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>	ใต้ดิน	2.29
4	โตไม่รู้ล้ม	ASTERACEAE	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>	ใบ	1.85
5	โตไม่รู้ล้ม	ASTERACEAE	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>	ใต้ดิน*	8.12
6	โตไม่รู้ล้ม	ASTERACEAE	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>	ใบ*	2.19
7	หงอนไก่ป่า, หมาตาย ไม่ต้องลาก	CONNARACEAE	<i>Cnestis palala</i> (Lour.) Merr.	เหนือดิน	2.81
8	หงอนไก่ป่า, หมาตาย ไม่ต้องลาก	CONNARACEAE	<i>Cnestis palala</i> (Lour.) Merr.	ราก	3.12
9	กลอย	DIOSCOREACEAE	<i>Dioscorea hispida</i> Dennst.	ใต้ดิน	11.04
10	เปล้าทองแตก(เปล้า เล็ก)	EUPHORBIACEAE	<i>Baliospermum calycinum</i> Müll. Arg.	ใบ ก้าน	24.04

ตารางที่ 4-5 รายชื่อพืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนที่ใช้ และผลการสกัดจากส่วนต่างๆของพืช (ต่อ)

No.	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	%yield เทียบกับ น้ำหนักพืชแห้ง
11	ส้มเสี้ยวป่า กากหลง เขา เสี้ยวป้อม เสี้ยว น้อย	FABACEAE	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	ต้น	12.15
12	ส้มเสี้ยวป่า กากหลง เขา เสี้ยวป้อม เสี้ยว น้อย	FABACEAE	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	ราก	7.18
13	ส้มเสี้ยวป่า กากหลง เขา เสี้ยวป้อม เสี้ยว น้อย	FABACEAE	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	ใบ	15.21
14	ชะเลียด หนามปุย่า หนามพะย้า ข้าเรือต ผักชะยา	FABACEAE	<i>Caesalpinia digyna</i> Rottler	ใบ กิ่ง	19.67
15	กระดิ่ง (หึ่งหาย) ใบ ใหญ่	FABACEAE	<i>Crotalaria tetragona</i> Andrews	ราก	5.88

ตารางที่ 4-5 รายชื่อพืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนที่ใช้ และผลการสกัดจากส่วนต่างๆของพืช (ต่อ)

No.	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	%yield เทียบกับ น้ำหนักพืชแห้ง
16	กระดิ่ง (หิงหาย) ใบใหญ่	FABACEAE	<i>Crotalaria tetragona</i> Andrews	ผลดำ	1.61
17	กระดิ่ง (หิงหาย) ใบใหญ่	FABACEAE	<i>Crotalaria tetragona</i> Andrews	ผลเขียว	2.22
18	แกลบหมู	FABACEAE	<i>Desmodium teres</i> Benth.	ราก	20.02
19	แกลบหมู	FABACEAE	<i>Desmodium teres</i> Benth.	ใบ	19.18
20	สะบ้า	FABACEAE	<i>Entada rheedii</i> Spreng.	เถา	11.52
21	สะบ้า	FABACEAE	<i>Entada rheedii</i> Spreng.	ลูก	7.45
22	ห้าควาย	FABACEAE	<i>Millettia caerulea</i> Baker	ใบ	25.44
23	ห้าควาย	FABACEAE	<i>Millettia caerulea</i> Baker	กิ่ง	15.32
24	หญ้าหางเสื่อ	FABACEAE	<i>Uraria crinita</i> (L.) DC.	ราก	15.25
25	หญ้าหางเสื่อ	FABACEAE	<i>Uraria crinita</i> (L.) DC.	ต้น	5.7
26	หญ้าหางเสื่อ	FABACEAE	<i>Uraria crinita</i> (L.) DC.	ใบ	12.39
27	ตีวแดง(ตีวเกลี้ยง)	HYPERICACEAE	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ก้าน	6.2

ตารางที่ 4-5 รายชื่อพืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนที่ใช้ และผลการสกัดจากส่วนต่างๆของพืช (ต่อ)

No.	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	%yield เทียบกับ น้ำหนักพืชแห้ง
28	ตีวแดง(ตีวเกลี้ยง)	HYPERICACEAE	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ราก	3.34
29	ตีวแดง(ตีวเกลี้ยง)	HYPERICACEAE	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ใบ	11.93
30	ตีว	HYPERICACEAE	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ราก	21.46
31	ตีว	HYPERICACEAE	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	กิ่ง	20.52
32	ตีว	HYPERICACEAE	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ใบ	27.03
33	ตาลเดี่ยว	HYPOXIDACEAE	<i>Curculigo orchioides</i> Gaertn.	ใต้ดิน	18.52
34	ตาลเดี่ยว	HYPOXIDACEAE	<i>Curculigo orchioides</i> Gaertn.	ใบ	12.42
35	ตาลเดี่ยว	HYPOXIDACEAE	<i>Curculigo orchioides</i> Gaertn.	เหนือดิน	19.9
36	ปอซี่ไก่อ	MALVACEAE	<i>Helicteres elongata</i> Wall. ex Bojer	ใบ	5.01
37	ปอซี่ไก่อ	MALVACEAE	<i>Helicteres elongata</i> Wall. ex Bojer	ก้าน	10.12
38	ปอซี่ไก่อ	MALVACEAE	<i>Helicteres elongata</i> Wall. ex Bojer	ใบ	18.98
39	ปอซี่ไก่อ	MALVACEAE	<i>Helicteres elongata</i> Wall. ex Bojer	ก้าน	6.73
40	ปอบิด	MALVACEAE	<i>Helicteres isora</i> L.	กิ่ง	20.2
41	ปอบิด	MALVACEAE	<i>Helicteres isora</i> L.	ผล	51.32

42	ปอบิด	MALVACEAE	<i>Helicteres isora</i> L.	ใบ	14.16
43	เครือหมาน้อย	MENISPERMACEAE	<i>Cyclea varians</i> Craib	ใบ กิ่ง	19.04

ตารางที่ 4-5 รายชื่อพืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนที่ใช้ และผลการสกัดจากส่วนต่างๆของพืช (ต่อ)

No.	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	%yield เทียบกับ น้ำหนักพืชแห้ง
44	แผ่นดินเย็น	ORCHIDACEAE	<i>Nervilia aragoana</i> Gaudich.	ใบ	36.1
45	แผ่นดินเย็น	ORCHIDACEAE	<i>Nervilia aragoana</i> Gaudich.	ใต้ดิน	37.11
46	ดอกดินแดง	OROBANCHACEAE	<i>Aeginetia indica</i> L.	เหนือดินและใต้ดิน	9.14
47	มะเม่า,หมักเม่า	PHYLLANTHACEAE	<i>Antidesma sootepense</i> Craib.	ต้น	5.16
48	มะเม่า,หมักเม่า	PHYLLANTHACEAE	<i>Antidesma sootepense</i> Craib.	ผล	17.66
49	มะเม่า,หมักเม่า	PHYLLANTHACEAE	<i>Antidesma sootepense</i> Craib.	ใบ	18.52
50	รางแดง เถาวัลย์เหล็ก เครือ เขาเกลบ	RHAMNACEAE	<i>Ventilago denticulata</i> Willd.	เถา	2.66
51	พญาเสือโคร่ง	ROSACEAE	<i>Docynia delavayi</i> C.K.Schneid.	แก่น	7.68
52	พญาเสือโคร่ง	ROSACEAE	<i>Docynia delavayi</i> C.K.Schneid.	เปลือก	5.13
53	ต่อไล่ กำมปู	SAPINDACEAE	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	ลำต้น	21.13

	ตานขโมย ตานอีลีน				
--	------------------	--	--	--	--

ตารางที่ 4-5 รายชื่อพืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนที่ใช้ และผลการสกัดจากส่วนต่างๆของพืช (ต่อ)

No.	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	%yield เทียบกับ น้ำหนักพืชแห้ง
54	ต่อไล่ กำมปู ตานขโมย ตานอีลีน	SAPINDACEAE	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	ใบ	9.91
55	ต่อไล่ กำมปู ตานขโมย ตานอีลีน	SAPINDACEAE	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	ราก	11.43
56	สีพันคนทา	SIMAROUBACEAE	<i>Harrisonia perforata</i> (Blanco) Merr.	ผล	11.78
57	หนอนตายอยาก (รากป่อง)	STEMONACEAE	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	ก้าน	10.37
58	หนอนตายอยาก (รากป่อง)	STEMONACEAE	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	ราก	2.05
59	หนอนตายอยาก (รากป่อง)	STEMONACEAE	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	ใบ	39.54
60	หนอนตายอยาก (รากป่อง)	STEMONACEAE	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	ไต่ดิน	5.49

ตารางที่ 4-5 รายชื่อพืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนที่ใช้ และผลการสกัดจากส่วนต่างๆของพืช (ต่อ)

No.	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	%yield เทียบกับ น้ำหนักพืชแห้ง
61	กระโดน	SYMPLOCACEAE	<i>Symplocos sp.</i>	กิ่ง ลำต้น	10.32
62	กระโดน	SYMPLOCACEAE	<i>Symplocos sp.</i>	ใบ	31.67
63	โสมไทย	TALINACEAE	<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.	ราก	4.4
64	โสมไทย	TALINACEAE	<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.	เหนือดิน	17.34
65	น้ำเต้าป๋า	VITACEAE	<i>Cissus adnata</i> Roxb.	ใบ	23.92
66	น้ำเต้าป๋า	VITACEAE	<i>Cissus adnata</i> Roxb.	ต้น	20.5
67	น้ำเต้าป๋า	VITACEAE	<i>Cissus adnata</i> Roxb.	ราก	7.17
68	กระชายเล็ก	ZINGIBERACEAE	<i>Boesenbergia rotunda</i> (L.) Mansf.	ใต้ดิน	12.78
69	ส้มกบแดง พญา หงอนนาค	ZINGIBERACEAE	<i>Boesenbergia xiphostachya</i> (Gagnep.) Loes.	เหนือดิน	36.21
70	ส้มกบขาว	ZINGIBERACEAE	<i>Boesenbergia xiphostachya</i> (Gagnep.) Loes.	เหนือดิน	29.2
71	เข้าพรรษาขาว	ZINGIBERACEAE	<i>Globba albiflora</i> Ridl. var. <i>albiflora</i>	ราก	7.05

72	เข้าพรรษาขาว	ZINGIBERACEAE	<i>Globba albiflora</i> Ridl. var. <i>albiflora</i>	ดอก	30.13
73	เข้าพรรษาเหลือง	ZINGIBERACEAE	<i>Globba sp.</i>	ดอก	57.11
74	เข้าพรรษาเหลือง	ZINGIBERACEAE	<i>Globba sp.</i>	ราก	27.04

ตารางที่ 4-5 รายชื่อพืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเตอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนที่ใช้ และผลการสกัดจากส่วนต่างๆของพืช (ต่อ)

No.	ชื่อพื้นบ้าน	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้	%yield เทียบกับ น้ำหนักพืชแห้ง
75	เข้าพรรษาเหลือง	ZINGIBERACEAE	<i>Globba sp.</i>	เหนือดิน	24.28
76	unknown	ZINGIBERACEAE	<i>Stahlianthus campanulatus</i> Kuntze	ใต้ดิน	4.88
77	unknown	ZINGIBERACEAE	<i>Stahlianthus campanulatus</i> Kuntze	เหนือดิน	5.58
78	กระทือแดง	ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber sp.</i>	ดอก	16.03
79	กระทือแดง	ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber sp.</i>	ใบ	12.16
80	กระทือแดง	ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber sp.</i>	ต้น	7.07
81	กระทือแดง	ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber sp.</i>	ใต้ดิน	9.65
82	กระทือเขียว	ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber sp.</i>	ราก	37.42
83	กระทือเขียว	ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber sp.</i>	ใบ	20.37
84	กระทือเขียว	ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber sp.</i>	ต้น	18.24
85	รางจืด	unknown	<i>Thunbergia sp.</i>	เถา	12.98
86	unknown	unknown	<i>Curcuma sp.</i>	ใต้ดิน	29.25
87	unknown	unknown	<i>Curcuma sp.</i>	ดอก	31.29

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ทำในพีช 40 ชนิด แยกสกัดได้ 87 ตัวอย่าง (ดูรายละเอียดในตารางที่ 4-5) โดยใช้ Ellman's method ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำผลมาเฉลี่ย ผลที่ได้และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงในตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัด 87 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.33 mg/ml และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ (n=3)

No.	Scientific names	ชื่อพื้นบ้าน	ส่วนที่ใช้	%free radical scavenging±SD	AChE inh(%)±SD
1	<i>Dicliptera roxburghiana</i> Nees	กำลังเจ็ดข้าง สาร	รวม	74.12 ±9.76	10.20 ±4.00
2	<i>Aristolochia tagala</i> Cham.	ไก่ฟ้าน้อย	เหนือดิน	70.91 ±4.95	3.21 ±2.36
3	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>	โตไม่รู้ล้ม	ใต้ดิน	94.71 ±0.21	5.34 ±3.80
4	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>	โตไม่รู้ล้ม	ใบ	95.29 ±0.90	10.49 ±1.17
5	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>	โตไม่รู้ล้ม	ใต้ดิน	89.17 ±3.22	8.34 ±2.23
6	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>	โตไม่รู้ล้ม	ใบ	87.29 ±0.91	2.32 ±2.44
7	<i>Cnestis palala</i> (Lour.) Merr.	หงอนไก่ป่า ,หมาตายไม่ ต้องลาก	เหนือดิน	95.80 ±0.55	8.08 ±6.97
8	<i>Cnestis palala</i> (Lour.) Merr.	หงอนไก่ป่า ,หมาตายไม่ ต้องลาก	ราก	92.14 ±0.65	27.59 ±6.39
9	<i>Dioscorea hispida</i> Dennst.	กลอย	ใต้ดิน	84.87 ±5.01	12.93 ±7.62
10	<i>Baliospermum calycinum</i> Müll. Arg.	เปล้าทองแตก (เปล้าเล็ก)	รวม	41.22 ±3.09	3.01 ±4.14

ตารางที่ 4-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัด

87 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.33 mg/ml และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ ($n=3$) (ต่อ)

No.	Scientific names	ชื่อพื้นบ้าน	ส่วนที่ใช้	%free radical scavenging \pm SD	AChE inh($\%$) \pm SD
11	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	ส้มเสี้ยวป่า กาหลงเขา เสี้ยวป้อม เสี้ยว น้อย	ต้น	45.54 \pm 7.28	0.94 \pm 8.93
12	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	ส้มเสี้ยวป่า กาหลงเขา เสี้ยวป้อม เสี้ยว น้อย	ราก	23.04 \pm 26.61	5.75 \pm 13.43
13	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	ส้มเสี้ยวป่า กาหลงเขา เสี้ยวป้อม เสี้ยว น้อย	ใบ	68.59 \pm 2.46	12.65 \pm 3.04
14	<i>Caesalpinia digyna</i> Rottler	ชะเลือด หนาม ปู้ย่า หนามพะ ย่า ช้ำเรือด ผักชะยา	ใบ กิ่ง	96.46 \pm 0.61	11.26 \pm 6.49
15	<i>Crotalaria tetragona</i> Andrews	กระดิ่ง (หิงหาย) ใบ ใหญ่	ราก	86.54 \pm 1.4	17.61 \pm 2.76
16	<i>Crotalaria tetragona</i> Andrews	กระดิ่ง (หิงหาย) ใบ ใหญ่	ผลดำ	50.68 \pm 7.89	7.60 \pm 3.80
17	<i>Crotalaria tetragona</i> Andrews	กระดิ่ง (หิงหาย) ใบ ใหญ่	ผลเขียว	46.16 \pm 1.07	7.35 \pm 6.45
18	<i>Desmodium teres</i> Benth.	แกลบหมู	ราก	68.12 \pm 13.06	6.69 \pm 7.63
19	<i>Desmodium teres</i> Benth.	แกลบหมู	ใบ	92.63 \pm 2.36	10.81 \pm 9.54
20	<i>Entada rheedii</i> Spreng.	สะบ้า	เถา	95.26 \pm 0.27	60.73 \pm 5.41

ตารางที่ 4-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัด

87 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.33 mg/ml และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ (n=3) (ต่อ)

No.	Scientific names	ชื่อพื้นบ้าน	ส่วนที่ใช้	%free radical scavenging±SD	AChE inh(%)±SD
21	<i>Entada rheedii Spreng.</i>	สะบ้า	ลูก	92.94 ±0.30	8.00 ±2.18
22	<i>Millettia caerulea Baker</i>	ห้าควาย	ใบ	84.22 ±8.40	17.37 ±3.35
23	<i>Millettia caerulea Baker</i>	ห้าควาย	กิ่ง	54.97 ±4.98	32.64 ±2.31
24	<i>Uraria crinita (L.) DC.</i>	หญ้าหางเสือ	ราก	38.01 ±6.64	3.86 ±7.84
25	<i>Uraria crinita (L.) DC.</i>	หญ้าหางเสือ	ต้น	36.23 ±4.22	6.58 ±6.75
26	<i>Uraria crinita (L.) DC.</i>	หญ้าหางเสือ	ใบ	81.57 ±3.53	9.68 ±5.81
27	<i>Cratoxylum cochinchinense (Lour.) Blume</i>	ตัวแดง(ตัวเกลี้ยง)	ก้าน	94.06 ±1.06	26.34 ±3.96
28	<i>Cratoxylum cochinchinense (Lour.) Blume</i>	ตัวแดง(ตัวเกลี้ยง)	ราก	90.90 ±4.14	37.71 ±2.83
29	<i>Cratoxylum cochinchinense (Lour.) Blume</i>	ตัวแดง(ตัวเกลี้ยง)	ใบ	95.42 ±0.35	14.64 ±5.58
30	<i>Cratoxylum cochinchinense (Lour.) Blume</i>	ตัว	ราก	95.76 ±0.43	29.84 ±8.27
31	<i>Cratoxylum cochinchinense (Lour.) Blume</i>	ตัว	กิ่ง	92.42 ±1.07	16.26 ±10.54
32	<i>Cratoxylum cochinchinense (Lour.) Blume</i>	ตัว	ใบ	93.42 ±2.73	11.99 ±4.16
33	<i>Curculigo orchoides Gaertn.</i>	ตาลเด็ยว	ใต้ดิน	93.45 ±0.18	8.50 ±8.15
34	<i>Curculigo orchoides Gaertn.</i>	ตาลเด็ยว	ใบ	80.94 ±6.51	6.33 ±3.11
35	<i>Curculigo orchoides Gaertn.</i>	ตาลเด็ยว	เหนือดิน	90.53 ±5.48	8.14 ±3.54
36	<i>Helicteres elongata Wall. ex Bojer</i>	ปอชี้ไก่	ใบ	91.23 ±2.31	4.50 ±3.61
37	<i>Helicteres elongata Wall. ex Bojer</i>	ปอชี้ไก่	ก้าน	95.04 ±0.17	3.48 ±4.00
38	<i>Helicteres elongata Wall. ex Bojer</i>	ปอชี้ไก่	ราก	94.83 ±0.50	7.17 ±3.65

ตารางที่ 4-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัด

87 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.33 mg/ml และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ (n=3) (ต่อ)

No.	Scientific names	ชื่อพื้นบ้าน	ส่วนที่ใช้	%free radical scavenging±SD	AChE inh(%)±SD
39	<i>Helicteres elongata</i> Wall. ex Bojer	ปอซีไก่อ	ราก	94.94 ±1.0	13.10 ±3.68
40	<i>Helicteres isora</i> L.	ปอบิด	กิ่ง	65.64 ±7.10	7.96 ±3.52
41	<i>Helicteres isora</i> L.	ปอบิด	ผล	92.17 ±4.09	9.31 ±7.71
42	<i>Helicteres isora</i> L.	ปอบิด	ใบ	88.46 ±3.45	3.28 ±3.19
43	<i>Cyclea varians</i> Craib	เครือหมาน้อย	รวม	78.89 ±4.23	56.54 ±0.36
44	<i>Nervilia aragoana</i> Gaudich.	แผ่นดินเย็น	ใบ	31.25 ±6.45	13.92 ±1.99
45	<i>Nervilia aragoana</i> Gaudich.	แผ่นดินเย็น	ใต้ดิน	19.28 ±4.04	4.19 ±1.15
46	<i>Aeginetia indica</i> L.	ดอกดินแดง	รวม	85.11 ±3.39	17.15 ±0.44
47	<i>Antidesma sootepense</i> Craib.	มะเเมา,หมักเเมา	ต้น	96.45 ±0.76	30.27 ±2.02
48	<i>Antidesma sootepense</i> Craib.	มะเเมา,หมักเเมา	ผล	27.16 ±3.17	12.84 ±3.62
49	<i>Antidesma sootepense</i> Craib.	มะเเมา,หมักเเมา	ใบ	94.26 ±2.98	23.10 ±1.57
50	<i>Ventilago denticulata</i> Willd.	รางแดง เถาวัลย์เหล็ก เครือเขาแกลบ	เถา	78.73 ±6.46	34.03 ±2.01
51	<i>Docynia delavayi</i> C.K.Schneid.	พญาเสือโคร่ง	แก่น	80.41 ±1.79	21.06 ±12.60
52	<i>Docynia delavayi</i> C.K.Schneid.	พญาเสือโคร่ง	เปลือก	94.16 ±0.18	40.75 ±2.66
53	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	ต่อไส้ ก้ามปู ตานขโมย ตาน อีลีน	ลำต้น	71.89 ±5.76	6.81 ±3.54
54	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	ต่อไส้ ก้ามปู ตานขโมย ตาน อีลีน	ใบ	94.12 ±2.10	8.53 ±0.59
55	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	ต่อไส้ ก้ามปู ตานขโมย ตาน อีลีน	ราก	95.14 ±1.02	24.34 ±3.41
56	<i>Harrisonia perforata</i> Merr.	สีพันคนทา	ผล	95.89 ±0.20	6.25 ±4.80

ตารางที่ 4-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัด

87 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.33 mg/ml และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ (n=3) (ต่อ)

No.	Scientific names	ชื่อพื้นบ้าน	ส่วนที่ใช้	%free radical scavenging±SD	AChE inh(%)±SD
57	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	หนอนตาย อยาก	ก้าน	71.69 ±11.36	14.70 ±5.71
58	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	หนอนตาย อยาก	ราก	86.55 ±5.90	15.13 ±7.46
59	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	หนอนตาย อยาก	ใบ	75.29 ±7.64	12.01 ±6.06
60	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	หนอนตาย อยาก	ใต้ดิน	88.69 ±3.85	30.49 ±3.81
61	<i>Symplocos</i> sp.	กระโดน	กิ่ง ลำ ต้น	88.93 ±3.69	4.63 ±11.25
62	<i>Symplocos</i> sp.	กระโดน	ใบ	96.25 ±0.91	14.59 ±5.73
63	<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.	โสมไทย	ราก	32.57 ±1.68	9.78 ±6.51
64	<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.	โสมไทย	เหนือดิน	55.77 ±5.26	12.38 ±3.03
65	<i>Cissus adnata</i> Roxb.	น้ำเต้าป๋า	ใบ	80.54 ±7.42	7.61 ±10.75
66	<i>Cissus adnata</i> Roxb.	น้ำเต้าป๋า	ต้น	90.43 ±4.47	10.53 ±5.94
67	<i>Cissus adnata</i> Roxb.	น้ำเต้าป๋า	ราก	95.04 ±0.32	40.13 ±0.66
68	<i>Boesenbergia rotunda</i> (L.) Mansf.	กระชายเล็ก	ใต้ดิน	38.43 ±3.55	6.52 ±3.63
69	<i>Boesenbergia xiphostachya</i> (Gagnep.) Loes.	ส้มกบแดง พญาหงอนนาค	เหนือดิน	55.44 ±3.93	5.13 ±3.23
70	<i>Boesenbergia xiphostachya</i> (Gagnep.) Loes.	ส้มกบขาว	เหนือดิน	71.66 ±5.14	8.97 ±8.71
71	<i>Globba albiflora</i> Ridl. var. <i>albiflora</i>	เข้าพรรษาขาว	ราก	32.68 ±2.34	2.50 ±2.81
72	<i>Globba albiflora</i> Ridl. var. <i>albiflora</i>	เข้าพรรษาขาว	ดอก	48.37 ±3.43	8.08 ±2.60

ตารางที่ 4-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสกัด

87 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.33 mg/ml และ 0.1 mg/ml ตามลำดับ (n=3) (ต่อ)

No.	Scientific names	ชื่อพื้นบ้าน	ส่วนที่ใช้	%free radical scavenging±SD	AChE inh(%)±SD
73	<i>Globba sp.</i>	เข้าพรรษา เหลือง	ดอก	43.99 ±7.25	13.38 ±4.26
74	<i>Globba sp.</i>	เข้าพรรษา เหลือง	ราก	29.97 ±3.31	8.67 ±7.06
75	<i>Globba sp.</i>	เข้าพรรษา เหลือง	เหนือดิน	38.18 ±8.12	7.49 ±0.77
76	<i>Stahlianthus campanulatus</i> Kuntze	unknown	ใต้ดิน	49.13 ±5.85	44.61 ±3.57
77	<i>Stahlianthus campanulatus</i> Kuntze	unknown	เหนือดิน	53.89 ±3.2	11.99 ±1.36
78	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมแดง	ดอก	63.38 ±7.21	6.32 ±6.20
79	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมแดง	ใบ	67.83 ±4.56	8.94 ±3.01
80	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมแดง	ต้น	52.29 ±2.61	6.86 ±0.11
81	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมแดง	ใต้ดิน	50.69 ±3.78	14.86 ±6.11
82	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมเขียว	ราก	75.35 ±8.31	11.85 ±5.20
83	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมเขียว	ใบ	39.50 ±6.32	7.02 ±0.75
84	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมเขียว	ต้น	41.38 ±5.24	5.16 ±5.60
85	<i>Thunbergia sp.</i>	รางจืด	เถา	49.54 ±3.95	10.19 ±0.41
86	<i>Curcuma sp.</i>	unknown	ใต้ดิน	37.77 ±4.89	7.74 ±3.73
87	<i>Curcuma sp.</i>	unknown	ดอก	41.02 ±6.66	11.83 ±3.13

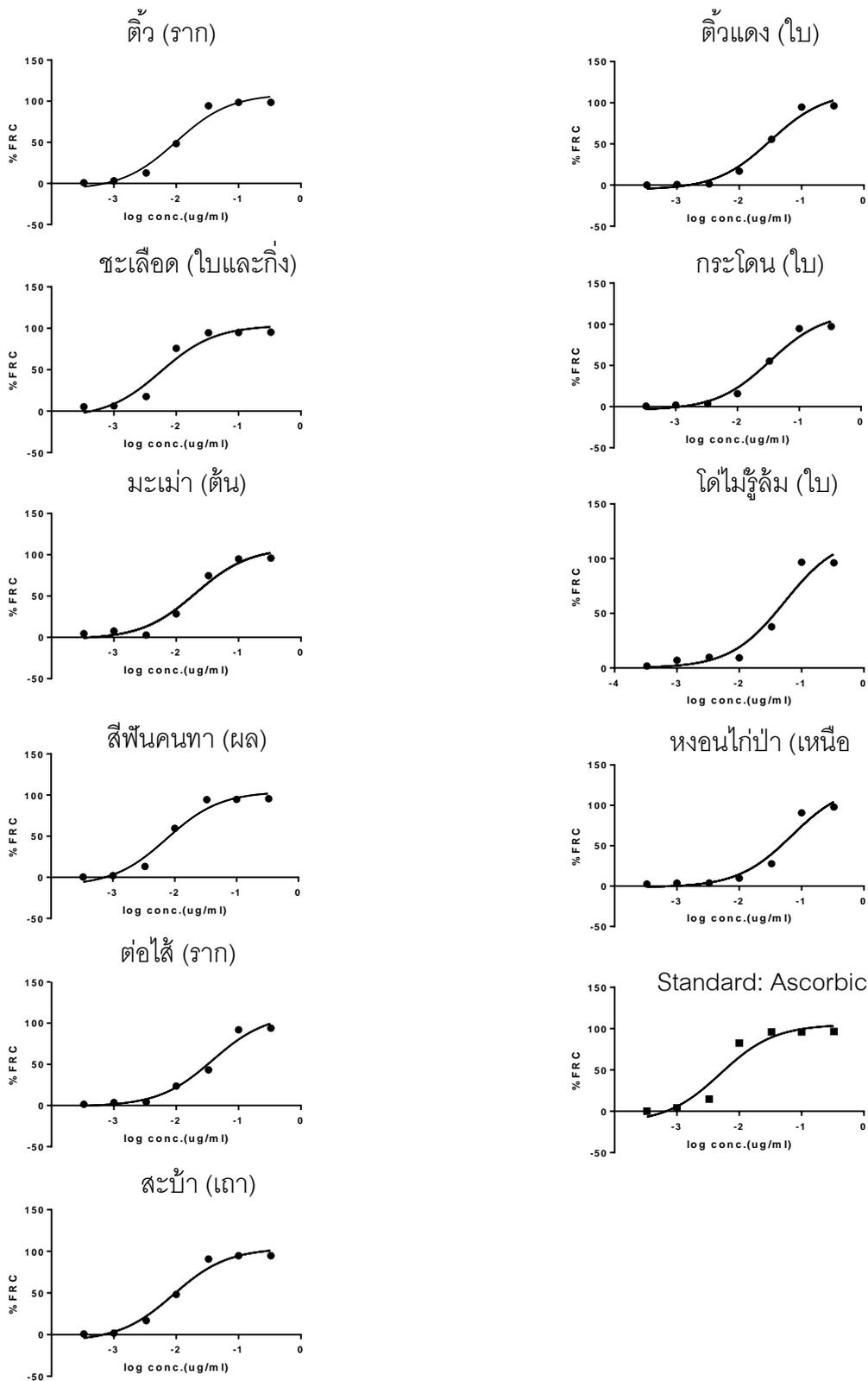
4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำในพืช 40 ชนิด แยกสกัดได้ 87 ตัวอย่าง (ดูรายละเอียดในตารางที่ 4-5) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.33 mg/ml โดยใช้ spectrophotometric assay ที่ใช้ DPPH เป็น reagent เพื่อทดสอบฤทธิ์ โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง และนำผลมาเฉลี่ย ผลที่ได้และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงในตารางที่ 4-6 พบว่ามีสารสกัดพืช 44 ตัวอย่างที่มี %free radical scavenging มากกว่าร้อยละ 80 และมีการคัดเลือกสารสกัดพืช 10 ตัวอย่างที่มี %free radical scavenging สูงที่สุด เพื่อมาหาค่า IC_{50}

จากตารางที่ 4-6 พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.33 mg/ml มีสารสกัดพืช 44 ชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (%free radical scavenging >80%) เช่น ชะเลื้อย ส่วนใบและกิ่ง, มะเมี๊ยะ ส่วนลำต้น, สีสันคนทา ส่วนผล, สะบ้า ส่วนเถาและเมล็ด เป็นต้น สารสกัดพืช 14 ตัวอย่างที่มี %free radical scavenging ในช่วงร้อยละ 60-80 และสารสกัดพืช 29 ตัวอย่างมี %free radical scavenging ต่ำกว่าร้อยละ 50 และเมื่อนำสารสกัดพืช 10 ตัวอย่างที่มี %free radical scavenging สูงที่สุด เพื่อศึกษา IC_{50} ของสารสกัดพบว่า ชะเลื้อย ส่วนใบและกิ่ง, สีสันคนทา ส่วนผล และสะบ้า ส่วนเถา มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี (ค่า IC_{50} ต่ำ) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.37 ± 0.22 , 7.74 ± 0.38 และ 8.64 ± 0.27 ug/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4-7)

ตารางที่ 4-7 รายชื่อสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและผลการหาค่า IC₅₀ (n=3)

ที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นบ้าน	ส่วนที่ใช้สกัด	IC ₅₀ (ug/ml)±SD
1	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. scaber	โตไม่รู้ล้ม	ใบ	56.48 ±2.32
2	<i>Cnestis palala</i> (Lour.) Merr.	หงอนไก่ป่า (หมาตายไม่ต้องลาก)	ส่วนบน	66.11 ±2.82
3	<i>Caesalpinia digyna</i> Rottler	ชะเลือด (หนามปูย่า หนามพะ ย่า ช้ำเรือด ผักชะยา)	ใบและกิ่ง	5.37 ±0.22
4	<i>Entada rheedii</i> Spreng.	สะบ้า	เถา	8.64 ±0.27
5	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ตัวแดง (ตัวเกลี้ยง)	ใบ	30.96 ±0.84
6	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ตัว	ราก	11.92 ±1.40
7	<i>Antidesma sootepense</i> Craib.	มะเมาะ,หมักเมาะ	ลำต้น	18.25 ±1.54
8	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	ต่อไส้ (กำมปู ตานขโมย ตานอีลีน)	ราก	37.95 ±3.01
9	<i>Harrisonia perforata</i> (Blanco) Merr.	สีพันคนทา	ผล	7.74 ±0.38
10	<i>Symplocos</i> sp.	กระโดน	ใบ	31.73 ±1.39



รูปที่ 4-1 กราฟแสดง %free radical scavenging (FRC) ของสารสกัด 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารมาตรฐาน (ascorbic acid)

4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอร์สไฟว์

จากตารางที่ 4-8 พบว่าพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 ได้มากกว่า 70% (active) มี 2 ชนิด คือ รากของตั่ว และรากของเกลบหมู โดยสามารถยับยั้ง PDE5 ได้ 78.54% และ 73.20% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PDE5 60-70% (moderate active) คือ สารสกัดจากลำต้นของมะเเฒ่า, ใบของน้ำเต้าป๋า, เหง้าของว่านเพชรน้อยและรากของส้มเสี้ยวป่า โดยสามารถยับยั้ง PDE5 ได้ 68.54%, 68.23%, 66.30% และ 66.03% ตามลำดับ

ตารางที่ 4-8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอร์สไฟว์ของสารสกัดสมุนไพรในเขตอุทยานแม่วงก์ ความเข้มข้น 50 µg/ml (n=3)

No.	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นบ้าน	ส่วนที่ใช้	%PDE5inh. ± SD
1	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ตั่ว	ราก	78.54±2.45
2	<i>Desmodium teres</i> Wall. ex Benth.	เกลบหมู	ราก	73.20±2.79
3	<i>Antidesma sootepense</i> Craib.	มะเเฒ่า, หมักเเฒ่า	ต้น	68.54±4.09
4	<i>Cissus adnata</i> Roxb.	น้ำเต้าป๋า	ใบ	68.23±4.19
5	<i>Stahlianthus campanulatus</i> Kuntze	ว่านเพชรน้อย	ใต้ดิน	66.30±1.33
6	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	ส้มเสี้ยวป่า กาทหลงเขา เสี้ยวป้อม เสี้ยวน้อย	ราก	66.03±3.37
7	<i>Helicteres isora</i> L.	ปอบิด	กิ่ง	59.74±3.85
8	<i>Aeginetia indica</i> L.	ดอกดินแดง	ทั้งต้น	59.67±6.41
9	<i>Zingiber</i> sp.	กระเทียม	ราก	57.28±4.00
10	<i>Symplocos</i> sp.	กระโดน	ใต้ดิน	50.56±3.92
11	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	ต่อไส้ ก้ามปู ตานขโมย ตานอีลั่น	ลำต้น	47.32±4.45
12	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.	ส้มเสี้ยวป่า กาทหลงเขา เสี้ยวป้อม เสี้ยวน้อย	ต้น	46.33±2.73
13	<i>Uraria crinita</i> (L.) Desv. ex DC.	หญ้าหางเสือ	ต้น	45.29±3.69
14	<i>Globba</i> sp.	เข้าพรรษาเหลือง	เหนือดิน	43.06±4.56
15	<i>Zingiber</i> sp.	กระเทียมแดง	ดอก	42.56±5.43
16	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	หนอนตายอยาก (รากป่อง)	ราก	41.56±1.89
17	<i>Zingiber</i> sp.	กระเทียมแดง	ต้น	40.71±5.51

ตารางที่ 4-8 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ของสารสกัดสมุนไพรในเขตอุทยานแม่วงก์ ความเข้มข้น 50 µg/ml (n=3) (ต่อ)

No.	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพื้นบ้าน	ส่วนที่ใช้	%PDE5inh. ± SD
18	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมเขียว	ต้น	40.52±5.25
19	<i>Helicteres elongata</i> Wall. ex Bojer	ปอขี้ไก่	ใบ	39.68±6.08
20	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมเขียว	ใบ	35.76±3.73
21	<i>Zingiber sp.</i>	กระเทียมแดง	ใบ	34.37±1.48
22	<i>Helicteres elongata</i> Wall. ex Bojer	ปอขี้ไก่	ก้าน	32.26±3.18
23	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	หนอนตายอยาก (รากปอง)	ใบ	30.42±3.02
24	<i>Uraria crinita</i> (L.) Desv. ex DC.	หญ้าหางเสือ	ราก	28.31±0.59
25	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	ตี้ว	กิ่ง	27.22±2.09
26	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.	ต่อไส้ ก้ามปู ตานขโมย ตานอีลีน	ใบ	26.92±0.75
27	<i>Globba sp.</i>	เข้าพรรษาเหลือง	ดอก	24.64±1.37
28	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.	หนอนตายอยาก (รากปอง)	ก้าน	23.48±2.27
29	<i>Baliospermum calycinum</i> Müll. Arg.	เปล้าตองแตก(เปล้า เล็ก)	ทั้งต้น	22.84±2.95
30	<i>Globba sp.</i>	เข้าพรรษาเหลือง	ราก	2.32±0.32

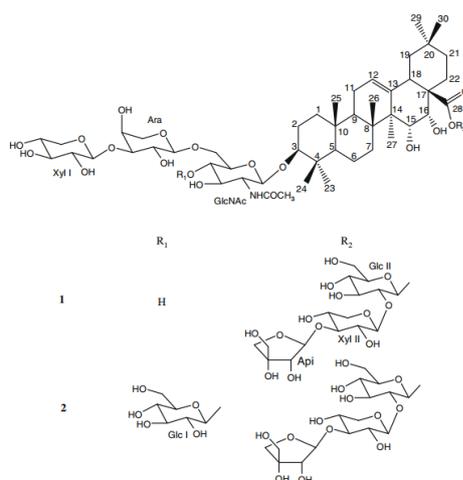
บทที่ 5

อภิปรายผลและวิจารณ์ผล

จากการสำรวจพืชสมุนไพรในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ พบพืชสมุนไพร 87 ชนิด ซึ่งอยู่ใน 29 วงศ์ โดยพบพืชในวงศ์ Fabaceae และ Malvaceae มากที่สุด คือ 12 ชนิด และ 6 ชนิดตามลำดับ

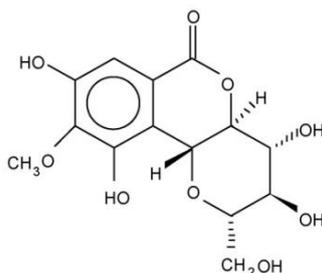
สำหรับผลในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรที่สำรวจพบที่มีความเกี่ยวข้องกับต่อโรคที่เกิดจากการเสื่อมนั้นพบว่า ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml ของสารสกัดเอทานอลจากส่วนเถาของสะบ้า (*Entada rheedii* Spreng.) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งหมด 44 ตัวอย่างที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าร้อยละ 80 และเมื่อเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 10 อันดับแรกมาหาค่า IC_{50} พบว่า สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดคือ *Caesalpinia digyna* Rottler (ชะเลียด, ใบและกิ่ง), *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr. (สีพันคนทา, ผล) และ *Entada rheedii* Spreng. (สะบ้า, เถา) โดยมี IC_{50} 5.37 ± 0.22, 7.74 ± 0.38 และ 8.64 ± 0.27 µg/ml ตามลำดับ

จากงานวิจัยก่อนหน้าของ Nzowa T และคณะ [38] พบว่าส่วนเปลือกของเมล็ดของ *Entada rheedii* แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในวิธี DPPH radical scavenging assay โดยพบว่าสาร Rheediiinoside A (**1**) และ Rheediiinoside B (**2**) ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่ม triterpenoid saponins (รูปที่ 5-1) เป็นสารสำคัญที่เป็นตัวออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 80 ± 5.1 µM และ 54 ± 4.2 µM ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีสารรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนเถาของ *E. rheedii* มาก่อน จึงอาจนับได้ว่างานวิจัยชิ้นนี้เป็นครั้งแรกในการรายงานครั้งแรกในการแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของพืชชนิดนี้ หากแต่ยังมีความจำเป็นต้องพิสูจน์ต่อไปว่าสารสำคัญใดที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลนี้อาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อม โดยเฉพาะโรคอัลไซเมอร์ต่อไป



รูปที่ 5-1 โครงสร้างของ triterpenoid saponins ที่พบในส่วนเปลือกของเมล็ด *E. rheedii* ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในปี 2007 Srinivasan และคณะ [39] สามารถแยกสาร bergenin (รูปที่ 5-2) ออกจากส่วนรากของ *Caesalpinia digyna* สารดังกล่าวแสดงค่าซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 165.35±1.60µg/ml นอกจากนี้งานวิจัยของ Mahato และคณะ [40, 41] พบว่าสาร Caesalpine A และ Caesalpine C ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม spermidine alkaloids เป็นสารสำคัญที่พบได้ในมากในส่วนของใบของ *C. digyna* เป็นไปได้ว่าสารนี้อาจจะเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้สารสกัดส่วนใบ ของ *C. digyna* แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยนี้ ซึ่งในพิสูจน์ข้อสมมุติฐานนี้ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



รูปที่ 5-2 โครงสร้างของ bergenin

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 µg/ml ของสารสกัดเอทานอลจากส่วนรากของต้น (*Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume) และรากของแกลบหมู (*Desmodium teres* Wall. ex Benth) สามารถยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ได้มากกว่าร้อยละ 70 และจากการทบทวนวรรณกรรมของคณะผู้วิจัยพบว่า [42] รายงานว่าสารสำคัญใน *C. cochinchinense* ประกอบด้วย Triterpenoids และ xanthenes และสาร 1,7-dimethoxy-2-hydroxy-xanthenes ซึ่งแยกได้จากรากของ *Securidata longepedunculata* มีฤทธิ์ในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบ corpus cavernosum ของกระต่าย โดยมี %relaxation เท่ากับ 63% [43] นอกจากนี้ สาร 1,3,6,8-Tetrahydroxy-2,5-dimethylxanthone และ 1,6,8-Trihydroxy-2,3,4,7-tetramethoxyxanthone ซึ่งเป็นสาร xanthenes ชนิดใหม่ที่แยกได้จากสารสกัดอะซิโตนของเปลือกรากของ *S. longepedunculata* มีค่ามี%relaxation ที่ corpus cavernosum smooth muscle ของกระต่าย เท่ากับ 97% และ 30.5% ตามลำดับ [44] คณะผู้วิจัยจึงคาดว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ใน *C. cochinchinense* น่าจะเป็นสารในกลุ่ม xanthenes ทั้งนี้เป็นเพียงแค่ข้อสันนิษฐานเท่านั้น ยังคงจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สำหรับแกลบหมูหรือ *Desmodium teres* นั้นยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ PDE5 inhibitor มาก่อน Suriyavathana และคณะ[45] ได้รายงานไว้ว่า พืชสกุล *Desmodium* พบสารกลุ่ม alkaloid, flavanoids, phenols, steroids and tannins เป็นองค์ประกอบหลักในพืช และเมื่อทำการสืบค้นต่อไป พบว่า จากงานวิจัยของ Shin และคณะ และ Ko และคณะ ได้เปิดเผยไว้ว่า สารกลุ่ม flavonoids สามารถยับยั้งเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้ [11, 12] และนอกจากนี้จากงานวิจัย Li Y. ยังพบว่า Icaritin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoids มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม control (p < 0.05) [46] จึง

คาดว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง PDE 5 ใน *D. teres* น่าจะเป็นสารกลุ่ม flavonoids อย่างไรก็ตามควร
ทำการศึกษเกี่ยวกับ PDE5 inhibitor activity ใน *D. teres* เพิ่มเติมต่อไป

จากงานวิจัยของ Djouossi และคณะ [47, 48] ค้นพบว่า สารสำคัญใน *Antidesma chevalieri* (มะ
เฒ่า) คือสารกลุ่ม flavonoids โดยได้ค้นพบสาร isoflavonoid glycoside ตัวใหม่ คือ Chevalierinoside A,
B และ C และสาร friedelin, friedelan-3-ol และ betulinic acid แต่อย่างไรก็ตามมะเฒ่าที่ใช้ในงานวิจัยนี้
เป็น *Antidesma sootepense* ซึ่งอาจจะมีความเป็นไปได้สารสำคัญน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับ *A. Chevalieri*
ก็เป็นได้ และสาร flavonoids เหล่านี้อาจจะมีเกี่ยวข้องกับการแสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส
ทั้งนี้เนื่องจากสารในกลุ่ม flavonoids มีการรายงานว่าสามารถออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ชนิดนี้ได้ [11, 12]

สำหรับพืชอีกชนิดที่แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ในระดับกลาง (ค่าแสดงการยับยั้ง
อยู่ในช่วง 60-70%) คือ *Cissus quadrangularis* ซึ่งจากศึกษาค้นคว้าข้อมูลพบว่าสารสำคัญที่พบได้ในพืชชนิด
นี้ได้แก่ lipids, stilbenoids, triterpenoids, steroids, iridoids และ flavonoids [49] ซึ่งจะกลุ่มนี้
โดยเฉพาะเคยมีการเปิดเผยแล้วว่าสามารถออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้ [11, 12] แต่ทั้งนี้ยังคง
มีความจำเป็นต้องพิสูจน์เพิ่มเติมว่าสารใดใน *C. Quadrangularis* ที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว
ต่อไป

ปัจจุบัน *Stahlianthus campanulatus* Kuntze นั้นยังไม่มีพบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้าน
เอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรสไฟว์ มีงานวิจัยของ Pingsusaen และคณะ [50] ได้รายงานไว้ว่า เมื่อนำเหง้าของ
S. involucreatus มาสกัดด้วย ethanol และนำไปทดสอบฤทธิ์ anti-inflammatory, antinociceptive and
antipyretic พบว่ามีฤทธิ์ anti-inflammatory and antinociceptive แต่ไม่มีฤทธิ์ antipyretic ตามลำดับ
อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ที่เป็น PDE5 inhibitors ใน *S. campanulatus* ต่อไป

จากการทบทวนวรรณกรรม ของ Temkitthawon และคณะ พบว่า ใบของ *Bauhinia winitii* Craib
ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Leguminosae นั้น เมื่อสกัดด้วย ethanol แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ตาม PDEs inhibitory
activity assay โดยใช้ final concentration ของสารสกัด เท่ากับ 0.1 mg/ml และทำการทดสอบ 3 ครั้ง
พบว่ามีฤทธิ์ complete inhibitory effect against PDEs และเมื่อนำไปทดสอบ IC₅₀ ต่อพบว่า IC₅₀ เท่ากับ
22.00±2.49 µg/ml และได้อภิปรายไว้ว่าฤทธิ์ดังกล่าวของสารสกัด *B. winitii* น่าจะเกิดจากสารกลุ่ม
flavonoids ซึ่งจะพบได้มาในพืชวงศ์ Leguminosae ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าฤทธิ์ต้านเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอ
เรสไฟว์ของ *B. viridescens* ซึ่งเป็นพืชในสกุล และวงศ์เดียวกันกับ *B. winitii* อาจจะมาจกสารกลุ่ม
flavonoids ด้วยเช่นกัน หากแต่ยังคงต้องทำการพิสูจน์ในเชิงลึกเพิ่มเติมต่อไปว่าสารใดที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวที่
แท้จริงใน *B. viridescens*

จากงานวิจัยนี้ยังคงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่าสารใดในสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ทาง
ชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคที่เกิดจากการเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (erectile

dysfunction) ต่อไป ทั้งนี้การศึกษาทางเคมีและชีวภาพของสารจากสมุนไพรเหล่านี้จะก่อให้เกิดความรู้ซึ่งอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้สมุนไพรให้เกิดประโยชน์สูงสุดได้ต่อประชาชน และผู้ประกอบการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร สารต้านอนุมูลอิสระอะเซทิลโคลีโนเอสเตอเรส สารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระฟอสโฟไดเอสเทอร์สไฟร์ ที่จะถูกค้นคว้าต่อไปจากงานวิจัยนี้ อาจใช้ในการควบคุมคุณภาพ หรือ standardization ของสารสกัดพืชชนิดนั้นๆ และอาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการทำ *in vivo* study หรือการศึกษาอื่นๆ เพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพของสารสกัดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Perry, E.K., *THE CHOLINERGIC HYPOTHESIS—TEN YEARS ON*. British Medical Bulletin, 1986. **42**(1): p. 63-69.
2. Enz, A., et al., *Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease*. Progress in brain research, 1993. **98**: p. 431-431.
3. Schelterns, P. and H. Feldman, *Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives*. The Lancet Neurology, 2003. **2**(9): p. 539-547.
4. Perry, G., et al., *Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation*. Neuroreport, 1999. **10**(11): p. 2411-2415.
5. Howes, M.-J.R. and P.J. Houghton, *Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2003. **75**(3): p. 513-527.
6. Feldman, H.A., et al., *Erectile dysfunction and coronary risk factors: prospective results from the Massachusetts male aging study*. Preventive medicine, 2000. **30**(4): p. 328-338.
7. Permpongkosol, S., et al., *Increased prevalence of erectile dysfunction (ED): results of the second epidemiological study on sexual activity and prevalence of ED in Thai males*. The Aging Male, 2008. **11**(3): p. 128-133.
8. Rybalkin, S.D., et al., *PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain*. The EMBO Journal, 2003. **22**(3): p. 469-478.
9. Moreland, R.B., et al., *Sildenafil citrate, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor:: research and clinical implications in erectile dysfunction*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 1999. **10**(3): p. 97-104.
10. Brock, G., *Oral Agents: First-Line Therapy for Erectile Dysfunction*. European Urology Supplements, 2002. **1**(8): p. 12-18.
11. Ko, W.-C., et al., *Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships*. Biochemical Pharmacology, 2004. **68**(10): p. 2087-2094.
12. Shin, H.J., et al., *A Prenylated Flavonol, Sophoflavescenol: A Potent and Selective Inhibitor of cGMP Phosphodiesterase 5*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002. **12**(17): p. 2313-2316.

13. Roengsumran, S., et al., *Flavonoid and flavonoid glycoside from Butea superba Roxb. and their cAMP phosphodiesterase inhibitory activity*. J Sci Res Chula Univ, 2000. **25**: p. 169-176.
14. Hoult, J. and M. Paya, *Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential*. General Pharmacology: The Vascular System, 1996. **27**(4): p. 713-722.
15. Watanabe, K., et al., *Effects of vinca alkaloids on calcium-calmodulin regulated cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase activity from brain*. Biochemical pharmacology, 1981. **30**(4): p. 335-340.
16. Wang, H. and X. Tang, *Anticholinesterase effects of huperzine A, E2020, and tacrine in rats*. Zhongguo yao li xue bao= Acta pharmacologica Sinica, 1998. **19**(1): p. 27-30.
17. Prince, M., et al., *The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis*. Alzheimer's & Dementia, 2013. **9**(1): p. 63-75. e2.
18. Alz.org [homepage on the internet]. Chicago: Types of dementia. [updated 2014; cited 2014 September 6]. Available form: <http://www.alz.org/dementia/types-of-dementia.asp>.
19. Hurd, M.D., et al., *Monetary costs of dementia in the United States*. New England Journal of Medicine, 2013. **368**(14): p. 1326-1334.
20. Bangkokhealth.com [homepage on the internet]. Thailand: “โรคอัลไซเมอร์” ภาวะสมองเสื่อมที่พบบ่อยที่สุดในผู้สูงอายุ และแนวโน้มสถานการณ์โรคในประเทศไทย, 2012 [updated 2012 October 19; cited 2014 September 15]. Available form: <http://www.bangkokhealth.com/index.php/health/health-system/brain/2220-2012-10-19-09-06-28.html>
21. ชาญชัย สาดแสงจันทร์. ศักยภาพของพืชสมุนไพรไทยกับภาวะสมองเสื่อม *Potential of Thai Medicinal Plants against Dementia*. ใน: วารสาร ไทยโภชนาการ (ฉบับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์)มศก. ปีที่ 7 ฉบับเดือนมกราคม – เดือนธันวาคม; 2555. หน้า 1-23.
22. ชูติมา ลิ้มมัทวาริทธิ์. การรักษาโรคอัลไซเมอร์. ใน: วารสาร ไทยโภชนาการ ปีที่ 1; 2548. หน้า 12-31.
23. อัญมณี ปิ่นน้อย, จิตต์ธิดา ชูแสงเลิศวิจิตร, ชมภูนุท อมาตยกุล, นุชนาฏ สิตปรีชา. บัญชียาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ปีงบประมาณ 2554. ใน: พรพรรณ ทวีชาติวิทยากุล, พวง เพ็ญ ฤทธิวีรกุล. (บรรณาธิการ) บัญชียาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ฝ่ายเภสัชกรรมโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์; 2554. หน้า 24.

24. Uabundit, N., et al., *Cognitive enhancement and neuroprotective effects of Bacopa monnieri in Alzheimer's disease model*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. **127**(1): p. 26-31.
25. Morris, J., R. MacGillivray, and C.M. Mathieson, *Celastrus paniculata in mental deficiency: a pilot experiment*. The British Journal of Psychiatry, 1953. **99**(414): p. 158-160.
26. Chin, D., et al., *Neuroprotective properties of curcumin in Alzheimer's disease-merits and limitations*. Current medicinal chemistry, 2013. **20**(32): p. 3955-3985.
27. Montine, T.J., et al., *Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease 1, 2*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(5): p. 620-626.
28. Webmd.com [homepage on the internet]. Washington: Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. [updated 2012 October 29; cited 2014 September 21]. Available form: <http://www.webmd.com/alzheimers/cholinesterase-inhibitors-for-alzheimers-disease>
29. Essayan, D.M., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation*. Biochemical pharmacology, 1999. **57**(9): p. 965-973.
30. Park.dnp.go.th [homepage on the internet]. Thailand: แม่ ว ง ก ี่ (Mae Wong), 20xx [updated 2009; cited 2014 August 27]. Available form: http://park.dnp.go.th/visitor/nationparkshow.php?PTA_CODE=1054
31. Seub.or.th [homepage on the internet]. Thailand: อุทยานแห่งชาติแม่วังก์, 2009 [updated 2009 November 06; cited 2014 August 27]. Available form: http://www.seub.or.th/index.php?option=com_content&view=article&id=110:2009-11-06-06-44-30&catid=34:17-&Itemid=41
32. Ingkaninan, K., et al., *Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies*. Journal of Ethnopharmacology, 2003. **89**(2): p. 261-264.
33. Ellman, G.L., et al., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology, 1961. **7**(2): p. 88-95.
34. Thaipong, K., et al., *Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*. Journal of food composition and analysis, 2006. **19**(6): p. 669-675.
35. Yen, G.-C. and C.-L. Hsieh, *Antioxidant effects of dopamine and related compounds*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1997. **61**(10): p. 1646-1649.

36. Sonnenburg, W.K., et al., *Identification, quantitation, and cellular localization of PDE1 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases*. *Methods*, 1998. **14**(1): p. 3-19.
37. Temkitthawon, P., et al., *Kaempferia parviflora, a plant used in traditional medicine to enhance sexual performance contains large amounts of low affinity PDE5 inhibitors*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011. **137**(3): p. 1437-1441.
38. Nzowa, L.K., et al., *Rheediinosides A and B, two antiproliferative and antioxidant triterpene saponins from Entada rheedii*. *Phytochemistry*, 2010. **71**(2-3): p. 254-261.
39. Srinivasan, R., et al., *Antioxidant activity of Caesalpinia digyna root*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. **113**(2): p. 284-291.
40. Mahato, S.B., N.P. Sahu, and P. Luger, *Structure of caesalpinine A: a novel spermidine alkaloid from Caesalpinia digyna Rottl*. *Journal of the American Chemical Society*, 1983. **105**(13): p. 4441-4445.
41. Mahato, S.B., et al., *Stereochemistry of a macrocyclic spermidine alkaloid from Caesalpinia digyna Rottl. X-Ray determination of the structure of caesalpinine C (celallocinnine)*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1985(2): p. 193-196.
42. Nguyen, L.H.D. and L.J. Harrison, *Triterpenoid and xanthone constituents of Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry*, 1999. **50**(3): p. 471-476.
43. Rakuambo, N., J. Meyer, and A. Hussein, *Xanthone isolated from Securidaca longepedunculata with activity against erectile dysfunction*. *Fitoterapia*, 2004. **75**(5): p. 497-499.
44. Meyer, J.M., N. Rakuambo, and A. Hussein, *Novel xanthenes from Securidaca longepedunculata with activity against erectile dysfunction*. *Journal of ethnopharmacology*, 2008. **119**(3): p. 599-603.
45. Venkatachalam, U. and S. Muthukrishnan, *Hepatoprotective activity of Desmodium gangeticum in paracetamol induced liver damage in rats*. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2013. **3**(3): p. 273-277.
46. Li, Y., et al., *Icariin combined with breviscapine improves the erectile function of spontaneously hypertensive rats*. *The journal of sexual medicine*, 2014. **11**(9): p. 2143-2152.

47. Djouossi, M.G., et al., *Chevalierinoside A: a new isoflavonoid glycoside from the stem bark of Antidesma chevalieri Beille (Euphorbiaceae)*. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia, 2014. **28**(2): p. 309-314.
48. Djouossi, M.G., et al., *Chevalierinoside B and C: Two new isoflavonoid glycosides from the stem bark of Antidesma laciniatum Muell. Arg (syn. Antidesma chevalieri Beille)*. Phytochemistry Letters, 2014. **9**: p. 149-152.
49. Rao, G., et al., *Chemical constituents and melanin promotion activity of Cissus quadrangularis Linn.* Res J Chem Sci, 2011. **1**: p. 25-29.
50. Pingsusaen, P., et al., *Investigation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of Stahlianthus involucreatus rhizome ethanol extract.* Journal of ethnopharmacology, 2015. **162**: p. 199-206.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ลำดับพืชที่พบในอุทยานแห่งชาติ

No.	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	ACANTHACEAE	<i>Andrographis laxiflora</i> (Blume) Lindau
2	ACANTHACEAE	<i>Barleria siamensis</i> Craib
3	ACANTHACEAE	<i>Dicliptera roxburghiana</i> Nees
4	ACANTHACEAE	<i>Phlogacanthus curvijlorus</i> Nees
5	ACANTHACEAE	<i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl.
6	ANNONACEAE	<i>Polyalthia suberosa</i> (Roxb.) Thwaites
7	APIACEAE	<i>Hydrocotyle javanica</i> Thunb.
8	APOCYNACEAE	<i>Myriopteron extensum</i> (Wight & Arn.) K. Schum.
9	ARISTOLOCHIACEAE	<i>Aristolochia tagala</i> Cham.
10	ASTERACEAE	<i>Elephantopus scaber</i> L. var. <i>scaber</i>
11	ASTERACEAE	<i>Eupatorium odoratum</i> L.
12	ASTERACEAE	<i>Gynura cusimbua</i> (D. Don) S.Moore
13	ASTERACEAE	<i>Spilanthes paniculata</i> Wall. ex DC.
14	CAPPARACEAE	<i>Capparis siamensis</i> Kurz
15	COMMELINACEAE	<i>Floscopa scandens</i> Lour.
16	CONNARACEAE	<i>Cnestis palala</i> (Lour.) Merr.
17	CONVOLVULACEAE	<i>Merremia vitifolia</i> (Burm. f.) Hallier f.
18	CUCURBITACEAE	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thumb.) Makino
19	CUCURBITACEAE	<i>Pavonia repanda</i> (Roxb. ex Sm.) Spreng.
20	DIOSCOREACEAE	<i>Dioscorea hispida</i> Dennst.
21	EUPHOBIAEAE	<i>Baliospermum solanifolium</i> (Burm.) Suresh
22	EUPHOBIAEAE	<i>Baliospermum calycinum</i> Müll. Arg.
23	FABACEAE	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv. var. <i>viridescens</i>
24	FABACEAE	<i>Bauhinia viridescens</i> Desv.
25	FABACEAE	<i>Caesalpinia digyna</i> Rottler
26	FABACEAE	<i>Crotalaria pallida</i> Aiton
27	FABACEAE	<i>Crotalaria tetragona</i> Andrews
28	FABACEAE	<i>Desmodium teres</i> Benth.
29	FABACEAE	<i>Entada rheedii</i> Spreng.
30	FABACEAE	<i>Flemingia strobilifera</i> (L.) W. T. Aiton
31	FABACEAE	<i>Millettia caerulea</i> Baker
32	FABACEAE	<i>Phyllodium pulchellum</i> (L.) Desv.
33	FABACEAE	<i>Tadehagi triquetrum</i> (L.) H. Ohashi
34	FABACEAE	<i>Uraria cordifolia</i> Wall.
35	FABACEAE	<i>Uraria crinita</i> (L) DC.
36	HYPERICACEAE	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume
37	HYPOXIDACEAE	<i>Curculigo orchioides</i> Gaertn.

No.	ชื่อวงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์
38	LAMIACEAE	<i>Hyptis capitata</i> Jacq.
39	LEEACEAE	<i>Leea indica</i> (Brum. f.) Merr.
40	MALVACEAE	<i>Helicteres elongata</i> Wall. ex Bojer
41	MALVACEAE	<i>Helicteres isora</i> L.
42	MALVACEAE	<i>Hibiscus radiatus</i> Cav.
43	MALVACEAE	<i>Sida mysorensis</i> Wight & Arn.
44	MALVACEAE	<i>Sida rhombifolia</i> L. subsp. <i>Rhombifolia</i>
45	MALVACEAE	<i>Thespesia lampas</i> (Cav.) Dalzell
46	MENISPERMACEAE	<i>Cyclea varians</i> Craib
47	ORCHIDACEAE	<i>Habenaria lucida</i> Wall. ex Lindl.
48	ORCHIDACEAE	<i>Nervilia aragoana</i> Gaudich.
49	OROBANCHACEAE	<i>Aeginetia indica</i> L.
50	OXALIDACEAE	<i>Biophytum sensitivum</i> (L.) DC.
51	PHYLLANTHACEAE	<i>Antidesma sootepense</i> Craib
52	PHYLLANTHACEAE	<i>Sauropus quadrangularis</i> (Willd.) Müll. Arg.
53	PLANTAGINACEAE	<i>Scoparia dulcis</i> L.
54	POLYGONACEAE	<i>Persicaria chinensis</i> (L.) Nakai var. <i>chinensis</i>
55	RHAMNACEAE	<i>Ventilago denticulata</i> Willd.
56	RHAMNACEAE	<i>Ziziphus oenoplia</i> (L.) Mill. Var. <i>oenoplia</i>
57	ROSACEAE	<i>Docynia delavayi</i> C.K.Schneid.
58	RUBIACEAE	<i>Catunaregam longispina</i> (Link) Tirveng.
59	RUBIACEAE	<i>Oxyceros horridus</i> Lour.
60	RUTACEAE	<i>Micromelum integerrimum</i> (Buch.-Ham. ex DC.) Wight & Arn. ex M. Roem.
61	SAPINDACEAE	<i>Allophylus cobbe</i> (L.) Raeusch.
62	SIMAROUBACEAE	<i>Harrisonia perforata</i> (Blanco) Merr.
63	STEMONACEAE	<i>Stemona tuberosa</i> Lour.
64	SYMPLOCACEAE	<i>Symplocos</i> sp.
65	TALINACEAE	<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.
66	URTICACEAE	<i>Debregeasia longifolia</i> (Burm.f.) Wedd.
67	VITACEAE	<i>Cissus adnata</i> Roxb.
68	ZINGIBERACEAE	<i>Alpinia</i> sp.
69	ZINGIBERACEAE	<i>Boesenbergia rotunda</i> (L.) Mansf.
70	ZINGIBERACEAE	<i>Boesenbergia xiphostachya</i> (Gagnep.) Loes.
71	ZINGIBERACEAE	<i>Globba albiflora</i> Ridl. Var. <i>albiflora</i>
72	ZINGIBERACEAE	<i>Stahlianthus campanulatus</i> Kuntze
73	ZINGIBERACEAE	<i>Zingiber</i> sp.



Collection number: PN2141

หญ้าง้างไพร

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Andrographis laxiflora* (Blume) Lindau

ชื่อวงศ์: ACANTHACEAE



Collection number: PN2144

ระงับ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Barleria siamensis* Craib

ชื่อวงศ์: ACANTHACEAE



Collection number: PN2120

กำลังเจ็ดข้างสาร

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Dicliptera roxburghiana* Nees

ชื่อวงศ์: ACANTHACEAE



Collection number: Ing060

ย้อม,คราม

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Phlogacanthus curviflorus* Nees

ชื่อวงศ์: ACANTHACEAE



Collection number: Ing043

รางจืดเถา

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Thunbergia laurifolia* Lindl.

ชื่อวงศ์: ACANTHACEAE



Collection number: PN2132

น้ำน้อย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Polyalthia suberosa* (Roxb.) Thwaites

ชื่อวงศ์: ANNONACEAE



Collection number: PN2151

ผักหนอก

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Hydrocotyle javanica* Thunb.

ชื่อวงศ์: APIACEAE



Collection number: PN2093

ชะเอม

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Myriopteron extensum* (Wight & Arn.) K. Schum.

ชื่อวงศ์: APOCYNACEAE



Collection number: PN2098

โกไฟ้าน้อย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Aristolochia tagala* Cham.

ชื่อวงศ์: ARISTOLOCHIACEAE



Collection number: Ing020

โตไม่รู้ล้ม

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Elephantopus scaber* L. var. *scaber*

ชื่อวงศ์: ASTERACEAE



Collection number: PN2148

สาบเสือ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Eupatorium odoratum* L. ชื่อวงศ์: ASTERACEAE



Collection number: Ing061

คำหยองป่า

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Gynura cusimbua* (D. Don) S.Moore

ชื่อวงศ์: ASTERACEAE



Collection number: Ing057

ผักคราดซี่หมู

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Spilanthes paniculata* Wall. ex DC.

ชื่อวงศ์: ASTERACEAE



Collection number: PN2134

นมนาง,เถานมสาว

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Capparis siamensis* Kurz

ชื่อวงศ์: CAPPARACEAE



Collection number: Ing054

เอื้องเพชรม้า,ผักปราบช้าง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Floscopa scandens* Lour.

ชื่อวงศ์: COMMELINACEAE



Collection number: Ing044

หงอนไก่ป่า, หมาตายไม่ต้องลาก

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Cnestis palala* (Lour.) Merr.

ชื่อวงศ์: CONNARACEAE



Collection number: PN2146

จิงจ้อ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Merremia vitifolia* (Burm. f.) Hallier f.

ชื่อวงศ์: CONVULVACEAE



Collection number: Ing059

เจียวกู่หลาน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb.) Makino

ชื่อวงศ์: CUCURBITACEAE



Collection number: PN2122

ช้ครอก

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Pavonia repanda* (Roxb. ex Sm.) Spreng.

ชื่อวงศ์: CUCURBITACEAE



Collection number: Ing027

กลอย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Dioscorea hispida* Dennst.

ชื่อวงศ์: DIOSCOREACEAE



Collection number: PN2137

หนดี ตองแตก

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Baliospermum solanifolium* (Burm.) Suresh

ชื่อวงศ์: EUPHORBIACEAE



Collection number: Ing022

เปล้าตองแตก (เปล้าเล็ก)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Baliospermum calycinum* Müll. Arg.

ชื่อวงศ์: EUPHORBIACEAE

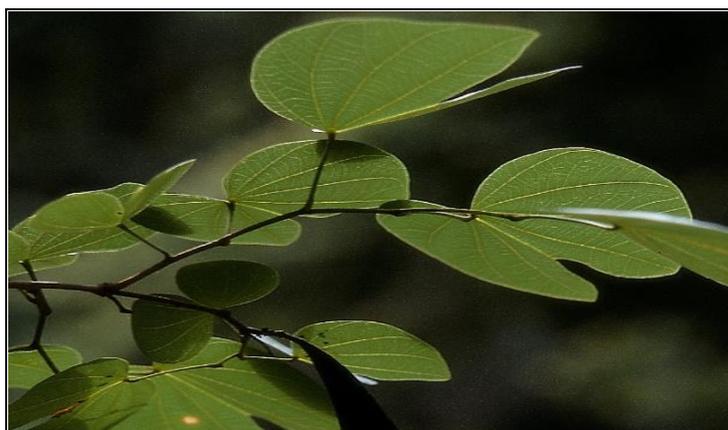


Collection number: PN2135

เสี้ยวดอกเหลือง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Bauhinia viridescens* Desv. var. *viridescens*

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing033

ส้มเสี้ยวป่า (กาหลงเขา เสี้ยวป้อม เสี้ยวน้อย)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Bauhinia viridescens* Desv.

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing036

ชะเลียด (หนามปูย่า)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Caesalpinia digyna* Rottler

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing053

ถั่วแระผี

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Crotalaria pallida* Aiton

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing045

กระดิ่งหึ่งหาย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Crotalaria tetragona* Andrews

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing035

แกลบหนู

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Desmodium teres* Benth.

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing041

สะบ้า

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Entada rheedii* Spreng.

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing047

โสดทะนงขาว, นูดพระ, เกร็ดนิ่มนวล

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Flemingia strobilifera* (L.) W. T. Aiton

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: PN2129

ท่าควาย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Millettia caerulea* Baker

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: PN2125

โศดทะนงแดง, เกี๋ยปลาซ้อน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Phyllodium pulchellum* (L.) Desv.

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: PN2133

โศดทะนงขาว, ซ้าวเม่านก

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Tadehagi triquetrum* (L.) H. Ohashi

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing052

หญ้าหางอัน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Uraria cordifolia* Wall.

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing039

หญ้าหางเสือ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Uraria crinita* (L.) DC.

ชื่อวงศ์: FABACEAE



Collection number: Ing038 / PN2094

ดีวัว

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume

ชื่อวงศ์: HYPERICACEAE



Collection number: Ing028

ตาลเดี่ยว

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Curculigo orchioides* Gaertn.

ชื่อวงศ์: HYPOXIDACEAE



Collection number: Ing046

หญ้าแม่ร้าง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Hyptis capitata* Jacq.

ชื่อวงศ์: LAMIACEAE



Collection number: PN2143

กะดังขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Leea indica* (Brum. f.) Merr.

ชื่อวงศ์: LEEACEAE



Collection number: PN2102

ปอซีโก้

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Helicteres elongata* Wall. ex Bojer

ชื่อวงศ์: MALVACEAE



Collection number: Ing025

ปอบิด

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Helicteres isora* L.

ชื่อวงศ์: MALVACEAE



Collection number: PN2131

กระเจี๊ยบเขา, ส้มสันดาน, กระเจี๊ยบป่า

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Hibiscus radiatus* Cav.

ชื่อวงศ์: MALVACEAE



Collection number: PN2138

ตลับเกลี้ยง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Sida mysorensis* Wight & Arn.

ชื่อวงศ์: MALVACEAE



Collection number: PN2127

หญ้าขัดมอญ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Sida rhombifolia* L. subsp. *Rhombifolia*

ชื่อวงศ์: MALVACEAE



Collection number: PN2130

ชะมดต้น

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Thespesia lampas* (Cav.) Dalzell

ชื่อวงศ์: MALVACEAE



Collection number: PN2123

เครือหมาน้อย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Cyclea varians Craib*

ชื่อวงศ์: MENISPERMACEAE

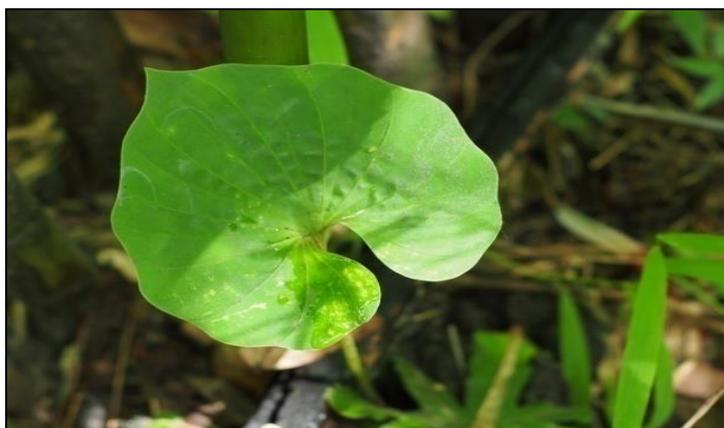


Collection number: PN2088

กล้วยไม้ดิน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Habenaria lucida Wall. ex Lindl.*

ชื่อวงศ์: ORCHIDACEAE



Collection number: PN2091

แผ่นดินเย็น

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Nervilia aragoana Gaudich.*

ชื่อวงศ์: ORCHIDACEAE



Collection number: PN2096

ดอกดิน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Aeginetia indica* L.

ชื่อวงศ์: OROBANCHACEAE



Collection number: Ing055

กระเทียมยอบ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Biophytum sensitivum* (L.) DC.

ชื่อวงศ์: OXALIDACEAE



Collection number: PN2086

มะเฒ่า (หมักเฒ่า)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Antidesma sootepense* Craib.

ชื่อวงศ์: PHYLLANTHACEAE



Collection number: PN2104

ลูกใต้ใบ, มะยมป่า

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Sauropus quadrangularis* (Willd.) Müll. Arg.

ชื่อวงศ์: PHYLLANTHACEAE



Collection number: PN2136

กรตน้ำ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Scoparia dulcis* L.

ชื่อวงศ์: PLANTAGINACEAE



Collection number: PN2149

พญาดง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Persicaria chinensis* (L.) Nakai var. *chinensis*

ชื่อวงศ์: POLYGONACEAE



Collection number: Ing021

รางแดง (เถาว์ล้วยเหล็ก เครือเขาแกลบ)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Ventilago denticulata* Willd.

ชื่อวงศ์: RHAMNACEAE



Collection number: PN2153

เล็บเหยี่ยว

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Ziziphus oenoplia* (L.) Mill. Var. *oenoplia*

ชื่อวงศ์: RHAMNACEAE



Collection number: PN2155

พญาเสือโคร่ง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Docynia delavayi* C.K.Schneid.

ชื่อวงศ์: ROSACEAE



Collection number: PN2145

หนามทะเลวังหวง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Catunaregam longispina* (Link) Tirveng.

ชื่อวงศ์: RUBIACEAE



Collection number: PN2140

คัตเค้, ปู่เจ้าขวางคลอง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Oxyceros horridus* Lour.

ชื่อวงศ์: RUBIACEAE



Collection number: PN2150

โปรงฟ้า, ลอดฟ้า

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Micromelum integerrimum* (Buch.-Ham. ex DC.) Wight & Arn. ex M. Roem.

ชื่อวงศ์: RUTACEAE



Collection number: PN2101

ต่อไล่ (กำมปู ตานขโมย ตานอีลีน)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Allophylus cobbe* (L.) Raeusch.

ชื่อวงศ์: SAPINDACEAE



Collection number: Ing040

สีฟันคนทา

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Harrisonia perforata* (Blanco) Merr.

ชื่อวงศ์: SIMAROUBACEAE



Collection number: Ing026

หนอนตายอยาก

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Stemonon tuberosa* Lour.

ชื่อวงศ์: STEMONACEAE



Collection number: PN2087

กระโดน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Symplocos* sp.

ชื่อวงศ์: SYMPLOCACEAE



Collection number: Ing042

โสมไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd.

ชื่อวงศ์: TALINACEAE



Collection number: PN2154

ล้านเห็บ

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Debregeasia longifolia* (Burm.f.) Wedd.

ชื่อวงศ์: URTICACEAE



Collection number: Ing034

น้ำเต้าป้า

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Cissus adnata* Roxb.

ชื่อวงศ์: VITACEAE



Collection number: Ing058

ข่าคม

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Alpinia* sp.

ชื่อวงศ์: ZINGIBERACEAE



Collection number: PN2092

กระชาย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.

ชื่อวงศ์: ZINGIBERACEAE



Collection number: PN2090

ส้มกบแดง (พญาหงอนนาค)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Boesenbergia xiphostachya* (Gagnep.) Loes. ชื่อวงศ์: ZINGIBERACEAE



Collection number: PN2078

เข้าพรรษาขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Globba albiflora* Ridl. Var. *albiflora* ชื่อวงศ์: ZINGIBERACEAE



Collection number: PN2097

-

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Stahlianthus campanulatus* Kuntze ชื่อวงศ์: ZINGIBERACEAE



Collection number: PN2106

กระเทียม

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Zingiber* sp.

ชื่อวงศ์: ZINGIBERACEAE



Collection number: Ing024

รางจืด

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Thunbergia* sp.

ชื่อวงศ์: unknown



Collection number: PN2089

-

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Curcuma* sp.

ชื่อวงศ์: unknown