ภาคผนวก ก



คำสั่ง ภาควิชาชีววิทยา

ที่ ชว 3232/2552

เรื่อง การแต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาทุนโครงการ การผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ระดับปริญญาโท-เอก

.....

เพื่อให้การดำเนินโครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ระดับโท-เอก งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2553 ดำเนินการเป็นไปตามแผนงานและบรรลุวัตถุประสงค์ตามเป้าหมาย จึงขอแต่งตั้งผู้มีนามต่อไปนี้เป็นคณะกรรมการ

1. รองศาสตราจารย์ จริยา เล็กประยูร	ประธานกรรมการ
2. รองศาสตราจารย์ ดร.กำธร ธีรคุปต์	รองประธานกรรมการ
3. รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง	รองประธานกรรมการ
4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์	กรรมการ
5. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงแข สิทธิเจริญชัย	กรรมการและเลขานุการ

โดยให้กรรมการมีหน้าที่พิจารณาหลักเกณฑ์ในการให้ทุน พิจารณาโครงการที่เสนอขอรับทุน จัดสรรทุนเพื่อการศึกษาวิจัยและทุนไปเสนอผลงาน และติดตามผลงานของโครงการที่ได้รับทุน ทั้งนี้โดยให้มีวาระ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 25 ธันวาคม พ.ศ. 2552 เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ 25 ธันวาคม พ.ศ. 2552

กำธร ธีรคุปต์

(รองศาสตราจารย์ ดร.กำธร ธีรคุปต์)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา

ภาคผนวก ข

<u>หลักเกณฑ์ในการขอรับการสนับสนุนการทำวิจัยจากโครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพระดับปริญญาโท-เอก ประจำปีงบประมาณ 2553</u>

1. โครงการวิจัยทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ที่เสนอขอรับทุนสนับสนุนต้องมีอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอาจารย์ประจำในภาควิชาชีววิทยา หรือภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. โครงการที่เสนอขอรับทุนสนับสนุนต้องเป็นวิทยานิพนธ์ของนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาชีววิทยา สาขาวิชาสัตววิทยา สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ สาขาวิชาพันธุศาสตร์ และหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรชีวภาพ ซึ่งหลักสูตรดังกล่าว จะได้รับการพิจารณาก่อน สำหรับหลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวภาพด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องจะพิจารณาเป็นกรณีไป
3. โครงการที่เสนอขอรับทุนสนับสนุนต้องได้รับการอนุมัติหัวข้อวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตศึกษา ก่อนวันที่ยื่นแบบเสนอโครงการ ฯ
4. โครงการวิจัยที่เสนอขอรับทุนสนับสนุนต้องไม่เคยได้รับทุนอื่นใดมาแล้ว ยกเว้นทุนที่ได้รับมาไม่เพียงพอในการดำเนินการวิจัย ทั้งนี้การพิจารณาอนุมัติอยู่ในดุลพินิจของคณะกรรมการพิจารณาทุน
5. นิสิตและอาจารย์ที่ปรึกษาต้องตีพิมพ์ผลงานวิจัยร่วมกันในวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ
6. โครงการวิจัยที่ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาทุน จะได้รับงบประมาณ ดังนี้

นิสิตระดับมหาบัณฑิต จะได้รับงบประมาณ <u>ไม่เกิน 100,000 บาท</u> **/โครงการ** และขอได้ไม่เกิน 2 ครั้ง

นิสิตระดับดุษฎีบัณฑิต จะได้รับงบประมาณ <u>ไม่เกิน 100,000 บาท</u> **/ปี/โครงการ** และขอได้ไม่เกิน 2 ครั้ง

ภาคผนวก ค

หลักเกณฑ์ในการขอรับการสนับสนุนการไปเสนอผลงานวิชาการในระดับนานาชาติ จากโครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพระดับปริญญาโท-เอก ประจำปีงบประมาณ 2553

คุณสมบัติของผู้เสนอขอรับทุน

เป็นนิสิตระดับปริญญาโทหรือปริญญาเอก ที่กำลังศึกษาอยู่ในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเสนอขอรับทุน

นิสิตที่ประสงค์จะขอรับทุน ควรยื่นแบบเสนอขอรับทุนของบัณฑิตวิทยาลัย เพื่อพิจารณารับทุนจากบัณฑิตวิทยาลัยก่อน ส่วนการขอทุนสนับสนุนจากโครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพระดับปริญญาโท-เอก ให้กรอกแบบเสนอขอทุนของโครงการฯ และแนบหลักฐานประกอบการพิจารณา ให้โครงการฯ ดังนี้

1. หนังสือตอบรับให้นำผลงานไปเสนอในที่ประชุมในรูปแบบด้วยวาจา (Oral Presentation) หรือในรูปแบบโปสเตอร์ (Poster Presentation)
2. เอกสารแสดงรายละเอียดเกี่ยวกับการประชุม
3. บทคัดย่อและบทความทางวิชาการ/ผลงานทางวิชาการฉบับสมบูรณ์
4. ประมาณการค่าใช้จ่ายในการไปประชุม

หลักเกณฑ์การขอทุน

1. โครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพระดับปริญญาโท-เอก จากศูนย์เชี่ยวชาญ เฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพจะได้รับการพิจารณาก่อน สำหรับโครงการที่ไม่ได้รับทุนจะพิจารณาสนับสนุนตามความเหมาะสมเป็นราย ๆ ไป
2. การขอรับทุนสนับสนุนไปเสนอผลงานที่ต่างประเทศ จะพิจารณาโครงการวิจัยที่เสนอในรูปแบบด้วยวาจา (oral presentation) ในระดับปริญญาเอกก่อนสำหรับโครงการวิจัยที่จะนำไปเสนอในรูปแบบโปสเตอร์หรือเป็นโครงการในระดับปริญญาโทจะพิจารณาเป็นอันดับรอง
3. ผลงานทางวิชาการที่จะนำไปเสนอต้องมีชื่อนิสิตและอาจารย์ที่ปรึกษาปรากฏร่วมกัน โดยที่นิสิตจะเป็นผู้ที่เสนอผลงานในที่ประชุม และมีชื่อปรากฏในผลงานเป็นชื่อแรก
4. หลักฐานการตอบรับให้ไปเสนอผลงานทางวิชาการจากในหรือต่างประเทศ

ภาคผนวก ง

บันทึกข้อความ

ส่วนงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ โทร. 2185275-6

ที่ ชว /2552 วันที่ 25 พฤศจิกายน พ.ศ. 2552

เรื่อง มอบวิทยานิพนธ์ให้ห้องสมุดภาควิชาชีววิทยา

เรียน หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา

สิ่งที่ส่งมาด้วย วิทยานิพนธ์ จำนวน 10 เล่ม

เนื่องจากโครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพระดับปริญญาโทและเอกได้สนับสนุนงานวิจัยด้านอนุกรมวิธาน นิเวศวิทยา และความหลากหลายทางชีวภาพของนิสิตระดับปริญญาโทและปริญญาเอกไปแล้วนั้น ขณะนี้ได้ผลงานวิจัยที่แล้วเสร็จจากวิทยานิพนธ์ของนิสิตในปี 2551 เป็นจำนวน 10 เล่ม จึงได้มอบวิทยานิพนธ์ไว้ที่ห้องสมุดภาควิชาชีววิทยา เพื่อเป็นประโยชน์ในการค้นคว้าในงานวิจัย และการเรียนการสอน ดังนี้

เล่มที่	ชื่อโครงการ	ชื่อนิสิต/สาขาวิชา/หลักสูตร
1	แบบชีวประวัติของงูกลุ่มโฮมาลอปซีนในและนอกแอ่งโคราชประเทศไทย	นายฉัตรพรรษ พงษ์เจริญ สาขาสัตววิทยา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
2	ผลของอะทราซีนต่อการเจริญระยะต้นและการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834)	นายกฤษฎา คทาวุธพูนพันธ์ สาขาสัตววิทยา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
3	สัณฐานวิทยา การขัน และการใช้พื้นที่ของไก่ป่าดุ้มหูแดง *Gallus gallus spadiceus* ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี	นายสุทธิพงศ์ อาศิรพจน์ สาขาสัตววิทยา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
4	ปรสิตในเนื้อเยื่อ และพยาธิสภาพในกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834)	นายเจตจันทร์ เศรษฐสิทธิ์ สาขาสัตววิทยา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
5	ความหลากชนิดและความชุกชุมของมดในพื้นที่ป่าดิบแล้ง พื้นที่สวนป่าสักและพื้นเกษตรกรรม ตำบลห้วยเขย่ง อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี	น.ส. ปิตินันท์ ต่อโชติ สาขาสัตววิทยา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

6	ความแปรผันทางพันธุกรรมของนกยูง *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ในภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทยโดยไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ	นายไพรัช ถาวรวรรณ์ สาขาสัตววิทยา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
7	ความหลากหลายของเฟิร์นและพืชใกล้เคียงเฟิร์นบริเวณเขานันใหญ่ อุทยานแห่งชาติเขานัน จังหวัดนครศรีธรรมราช	น.ส. ชนิดา สงวนทรัพย์ สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
8	ความเป็นไปได้ในการใช้มวนกรรเชียงจิ๋ว *Micronecta grisea* แทนการใช้เทมีฟอสชนิดเม็ดเกล็ดซีโอไลท์ในการควบคุมลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti*	น.ส. จุฑาภรณ์ อัมระปาล สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
9	การทบทวนอนุกรมวิธานของพืชวงศ์หญ้าเผ่าย่อยข้าวฟ่างในประเทศไทย	น.ส. อรทัย เนียมสุวรรณ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
10	การทบทวนอนุกรมวิธานของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* SW. หมู่ *Formosae* (Benth. & Hook. F.) Hook. F. (Orchidaceae) ในประเทศไทยและพื้นที่ใกล้เคียง	น.ส. อภิรดา สถาปัตยานนท์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

จึงเรียนมาเพื่อทราบ และขอความอนุเคราะห์จากห้องสมุดจัดเก็บไว้เป็นกลุ่มในโครงการวิจัยดังกล่าว เพื่อสะดวกในการตรวจสอบของผู้ประเมินโครงการด้วย จักขอบคุณยิ่ง

(รองศาสตราจารย์ จริยา เล็กประยูร)
ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย
โครงการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์
ความหลากหลายทางชีวภาพ

โทร. 02-2185266-7
โทรสาร 02-2185267

ภาคผนวก จ

โครงการ CEB_M_34_2007

ความหลากหลายของมอสบริเวณกิ่วแม่ปานและบริเวณอ่าง อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

นางสาวโยษิตา นะที

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOSSES DIVERSITY IN KEW MAE PAN AND ANG KA AREAS,DOI INTHANON NATIONAL PARK, CHAING MAI PROVINCE

Miss Yosita Nathi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Master of Science Program in Botany
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009
Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	MOSSES DIVERSITY AT KEW MAE PAN AND ANG KA AREAS,DOI INTHANON NATIONAL PARK, CHAING MAI PROVINCE
By	Miss Yosita Nathi
Field of Study	Botany
Advisor	Assistant Professor Tosak Seelanan, Ph. D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

S. Hannongbua ..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Supot Hannongbua, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

Thaweesakdi Boonkerd .....Chairman

(Professor Thaweesakdi Boonkerd, Ph. D.)

.....Advisor

(Assistant Professor Tosak Seelanan, Ph. D)

Chumpol Khunwasi .....Examiner

(Assistant Professor Chumpol Khunwasi, Ph. D.)

Kanya Santanachote .....External Examiner

(Dr.Kanya Santanachote, Ph. D.)

โยษิตา นะที : ความหลากหลายของมอสส์ในบริเณกิ่วแม่ปานและบริเวณอ่างกา อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่. (DIVERSITY OF MOSSES IN KHEW MAE PAN AND ANGKA AREAS, DOI INTHANON NATIONAL PARK, CHIANG MAI PROVINCE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ.ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์, 274 หน้า.

การสำรวจความหลากหลายของมอสส์ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ จากพื้นที่ตัวแทน 2 แห่ง ได้แก่ บริเวณกิ่วแม่ปานและบริเวณอ่างกา ได้ดำเนินการระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2551 ซึ่งสามารถรวบรวมตัวอย่างได้ทั้งสิ้น 810 หมายเลข จำแนกเป็นมอสส์ 101 ชนิด ใน 59 สกุล 27 วงศ์ มอสส์วงศ์ที่พบจำนวนชนิดมากที่สุด คือ Sematophyllaceae พบ 16 ชนิด มอสส์วงศ์ที่พบจำนวนชนิดรองลงมาคือ Fissidentacea และ Meteoriaceae พบวงศ์ละ 10 ชนิด มอสที่พบส่วนใหญ่เป็นมอสส์ที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ในเขตอินโดจีน ส่วนที่เหลือเป็นมอสส์ที่ขึ้นทั่วไปในทวีปเอเชีย และมี 2 ชนิดที่มีการกระจายทั่วโลก มอสส์ที่อยู่ในบัญชีรายชื่อมอสส์ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของ ICUN และพบในพื้นที่ศึกษามี 1 ชนิด คือ *Distichophyllum carinatum* Dixon & W. E. Nicholson นอกจากนี้ ยังพบว่ามีมอสส์ 16 ชนิด เป็นมอสส์ที่ไม่เคยมีรายงานว่าพบในประเทศไทยมาก่อน ได้แก่ *Clastobryopsis brevinervis* M. Fleisch., *Clastobryopsis planula* (Mitt.) M. Fleisch. var. *planula*, *Clastobryopsis planula* var. *delicata* (M. Fleisch.) B. C. Tan & Y. Jia, *Clastobryopsis robusta* (Broth.) M. Fleisch., *Didymodon maschalogena* (Renauld & Car-dot) Broth., *Distichophyllum carinatum* Dixon & W. E. Nicholson, *Distichophyllum collenchymatosum* Cardot., *Distichophyllum maibarae* Besch., *Distichophyllum wanianum* B. C. Tan & P. J. Lin, *Fissidens obscurus* Mitt., *Glossadelphus prostratus* (Dozy & Molk.) M. Flesich., *Meteorium subpolytrichum* (Besch.) Broth., *Oligotrichum aligerum/obtusatum* Mitt., *Rhizomnium striatulum* (Mitt.) T. J. Kop., และ *Warburgiella bistrumosa* (Müll. Hal.) M. Fleisch. สำหรับมอสส์ชนิด *Warburgiella bistrumosa* นั้น น่าจะมีการกระจายพันธุ์กว้างกว่าที่เคยมีรายงานไว้ และอาจจะไม่ใช่พืชเฉพาะถิ่นของฟิลิปปินส์อีกต่อไป

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต โยษิตา นะที

สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2552

4872599323 : MAJOR BOTANY
KEYWORDS : Mosses / Doi Inthanon National Park

YOSITA NATHI: DIVERSITY OF MOSSES IN KHEW MAE PAN AND ANG KA AREAS, DOI INTHANON NATIONAL PARK, CHIANG MAI PROVINCE. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. TOSAK SEELANAN, Ph. D., 274 pp.

The investigation of diversity of mosses in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai province, was carried out in two representative areas, namely Khew Mae Pan and Ang Ka, during July 2007-July 2008. In total, 810 specimens of mosses were collected, comprising of 101 species in 59 genera 27 families. The moss families with the highest species was Sematophyllaceae (16 species), followed by Fissidentaceae and Meteoriaceae (10 species). Most taxa found belong to Indochines flora elements while the rest are of common Asian flora with two are worldwide distributed. One species enlisted in the ICUN red list was also found, namely *Distichophyllum carinatum* Dixon & W. E. Nicholson. It had been found that as many as 16 species of mosses were new records to Thailand, namely *Clastobryopsis brevinervis* M. Fleisch.,*Clastobryopsis planula* (Mitt.) M. Fleisch. var. *planula*, *Clastobryopsis planula* var. *delicata* (M. Fleisch.) B. C. Tan & Y. Jia, *Clastobryopsis robusta* (Broth.) M. Fleisch., *Didymodon maschalogena* (Renauld & Car-dot) Broth., *Distichophyllum carinatum* Dixon & W. E. Nicholson, *Distichophyllum collenchymatosum* Cardot., *Distichophyllum maibarae* Besch., *Distichophyllum wanianum* B. C. Tan & P. J. Lin, *Fissidens obscurus* Mitt., *Glossadelphus prostratus* (Dozy & Molk.) M. Flesich., *Meteorium subpolytrichum* (Besch.) Broth., *Oligotrichum obtusatum* Mitt., *Oligotrichum semilamellatum* (Hook. F.) Mitt, *Rhizomnium striatulum* (Mitt.) T. J. Kop., and *Warburgiella bistrumosa* (Müll. Hal.) M. Fleisch. In addition, it is suggested that *Warburgiella bistrumosa* may have wilder geographic distribution, and may no longer be an endemic to the Philippines.

Department : Botany
Field of Study : Botany
Academic Year : 2009

Student's Signature Yosita Nathi
Advisor's Signature

โครงการ CEB_M_36_2007

การเลือกสร้างรังและระยะการเจริญของผึ้งมิ้ม *Apis florea* และผึ้งม้าน *Apis andreniformis* ในจังหวัดกาญจนบุรี

นายสิทธิพงษ์ วงศ์วิลาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NEST SITE SELECTION AND DEVELOPMENT TIME OF RED DWARF HONEY BEE *Apis florea* AND BLACK DWARF HONEY BEE *Apis andreniformis* IN KANCHANABURI PROVINCE

Mr. Sitthipong Wongvilas

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเลือกสร้างรังและระยะการเจริญของผึ้งมิ้ม *Apis florea* และผึ้งม้าน *Apis andreniformis* ในจังหวัดกาญจนบุรี
โดย	นายสิทธิพงษ์ วงศ์วิลาศ
สาขาวิชา	สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรีรัตน์ เดี่ยววาณิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กำธร ธีรคุปต์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีรัตน์ เดี่ยววาณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชัชวาล ใจซื่อกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. ปิยมาศ นานอก)

สิทธิพงษ์ วงศ์วิลาศ : การเลือกสร้างรังและวัฏจักรชีวิตของผึ้งมิ้ม *Apis florea* และผึ้งม้าน *Apis andreniformis* ในจังหวัดกาญจนบุรี (NEST SITE SELECTION AND DEVELOPMENT TIME OF RED DWARF HONEY BEE *Apis florea* AND BLACK DWARF HONEY BEE *Apis andreniformis* IN KANCHANABURI PROVINCE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีรัตน์ เดี่ยววาณิชย์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, 102 หน้า.

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยการสร้างรังของผึ้งมิ้ม *Apis florea* และผึ้งม้าน *Apis andreniformis* ในจังหวัดกาญจนบุรี โดยทำการศึกษาตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2550 - เมษายน 2551 พบว่าในฤดูฝน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางกิ่งไม้ที่สร้างรังคือ 1.23 ± 0.55 ซม. (n=51) ในผึ้งมิ้มและ 0.89 ± 0.31 ซม. (n=9) ในผึ้งม้าน โดยกิ่งไม้ที่สร้างรังในผึ้งมิ้มมีขนาดใหญ่กว่าในผึ้งม้าน อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.035) ค่าระดับของสิ่งบดบังรังผึ้งมิ้ม คือ 3.91 ± 1.85 (n=57) ด้าน ในฤดูฝน และ 4.42 ± 1.5 (n=105) ด้าน ในฤดูแล้ง ส่วนระดับของสิ่งบดบังรังผึ้งม้านพบว่า มีค่า 5.1 ± 0.87 ด้าน (n=10) ในฤดูฝน และ 3.81 ± 1.6 ด้าน (n=11) ในฤดูแล้ง โดยสิ่งบดบังดังกล่าวในผึ้งม้านมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างฤดูฝนและฤดูแล้ง (p=0.035) ในขณะที่ระดับสิ่งบดบังในผึ้งมิ้มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.074) ในทั้งสองฤดู

ในฤดูแล้ง ระยะทางเฉลี่ยระหว่างรังกับแหล่งน้ำในผึ้งมิ้ม คือ 48.24 ± 41.79 ม. (n=105) ซึ่งสั้นกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับในระยะทางระหว่างรังและแหล่งน้ำในผึ้งม้านซึ่งมีระยะทางเฉลี่ย 81.81 ± 65.45 ม. (n=11) (p=0.019) การวิเคราะห์ลักษณะที่เกี่ยวข้องอื่นๆ คือ พื้นที่ปกคลุมทรงพุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลางและความสูงของต้นไม้ที่สร้างรัง ในผึ้งทั้งสองชนิดพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ในทั้งสองฤดู การศึกษาถิ่นอาศัยนี้บ่งชี้ว่าผึ้งมิ้มและผึ้งม้านมีความซ้อนทับกันของปัจจัยในการสร้างรังบางประการ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการแก่งแย่งแข่งขันกันในพื้นที่ที่มีทรัพยากรการสร้างรังอย่างจำกัด

จากการศึกษาระยะการเจริญของผึ้งมิ้มและผึ้งม้านในจังหวัดกาญจนบุรี ช่วงเดือนมีนาคม 2552 - เดือนกรกฎาคม 2552 โดยศึกษาตั้งแต่ระยะไข่ หนอน และดักแด้ ของผึ้งงาน ผึ้งนางพญา และผึ้งตัวผู้พบว่าระยะไข่ หนอน และดักแด้ของผึ้งงานของผึ้งมิ้มมีระยะเวลาเท่ากับ 3.02 ± 0.57, 4.07 ± 0.64 และ9.57 ± 0.5 วัน (n=100) ตามลำดับ และผึ้งม้านมีระยะเวลาเท่ากับ 2.82 ± 0.38, 3.9 ± 0.3 และ7.27 ± 0.83 วัน (n=100) ตามลำดับ สำหรับผึ้งนางพญาผึ้งมิ้มมีระยะไข่ หนอน และดักแด้ เท่ากับ 3.06 ± 0.76, 5 ± 0.67 และ7.19 ± 0.59 วัน (n=32) ตามลำดับ และผึ้งม้านเท่ากับ 2.85 ± 0.54, 4.61 ± 0.5 และ 7.38 ± 0.5 วัน (n=21) ตามลำดับ ส่วนระยะการเจริญตั้งแต่ระยะไข่ หนอน และดักแด้ของผึ้งมิ้มและผึ้งม้าน มีค่าเท่ากับ 2.99 ± 0.39,6.72 ± 0.45 และ12.73 ± 1.03 วัน (n=100) และ2.99 ± 0.5, 6.63 ± 0.49 และ12.13 ± 0.97 วัน (n=100) ตามลำดับ และพบว่าผลรวมระยะการเจริญของผึ้งตั้งแต่ระยะไข่จนถึงดักแด้ของผึ้งงานและผึ้งตัวผู้ ของผึ้งมิ้มมากกว่าผึ้งม้าน โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกในประเทศไทย

ภาควิชา ชีววิทยา ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา สัตววิทยา ..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2552 ..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

4972524323 : MAJOR ZOOLOGY

KEYWORDS : NEST SITE SELLECTION / *Apis florea* / *Apis andreniformis* / DEVELOPMENT TIME / HONEY BEE

SITTHIPONG WONGVILAS : NEST SITE SELECTION AND DEVELOPMENT TIME OF RED DWARF HONEY BEE *Apis florea* AND BLACK DWARF HONEY BEE *Apis andreniformis* IN KANCHANABURI PROVINCE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREERAT DEOWANISH, D. Agr. THESIS CO-ADVISOR : PROF. SIRIWAT WONGSIRI, Ph. D. 102 pp.

The research aims to investigate the nesting factors of the red dwarf honeybees, Apis florea and the black dwarf honeybees, Apis andreniformis in Kanchanaburi province from May 2007 to April 2008. In rainy season, the mean of diameter of nesting branch were 1.23 ± 0.55 cm (n=51) and 0.89 ± 0.31 cm (n=9) in A. florea and A. andreniformis respectively which was significantly differences (p=0.035) between both species. The degree of nest shelter of A. florea was 3.91 ± 1.85 in rainy season and 4.42 ± 1.5 (n=105) in dry season. The degree of nest shelter of A. andreniformis was 5.1 ± 0.87 (n=10) in rainy season and 3.81 ± 1.6 (n=11) in dry season. The comparison of degree of nest shelter in rainy and dry season showed the significantly different in A. andreniformis (p=0.035) whereas in A. florea was not significantly different (p=0.074).

In dry season, the mean of distance from nest to water sources from *A. florea* (48.24 ± 41.79 m, n=105) was significant shorter than *A. andreniformis* (81.81 ± 65.45 m, n=11) (p=0.019). The related characteristics, canopy area, diameter of host tree and the height of the host tree, were not significant difference between rainy and dry season in both bees species (p>0.05). The results indicate that *A. florea* and *A. andreniformis* have some overlap of nesting factors. These reflect that the competition of both species possibly occur when the resources of nesting are limited.

The development time of two dwarf honeybees, *A. florea* and *A. andreniformis* were studied in Kanchanaburi province during March 2008 to July 2008. *A. florea* and *A. andreniformis* were used to observed development time of egg, larval and pupal stages of worker, queen and drone. The egg, larval and pupal stages of worker were 3.02 ± 0.57, 4.07 ± 0.64 and 9.57 ± 0.5 day (n=100), respectively in *A. florea* and 2.82 ± 0.38, 3.9 ± 0.3 and 7.27 ± 0.83 day (n=100), respectively in *A. andreniformis*. Queen developmental stages of egg, lava and pupa of *A. florea* were 3.06 ± 0.76, 5 ± 0.67 and 7.19 ± 0.59 day (n=32), respectively and in *A. andreniformis* were 2.85 ± 0.54, 4.61 ± 0.5 and 7.38 ± 0.5 days (n=21), respectively. The development time of egg, laval and pupal stage of *A. florea* and *A. andreniformis* drones were 2.99 ± 0.39,6.72 ± 0.45 and 12.73 ± 1.03 day (100) and 2.99 ± 0.5, 6.63 ± 0.49 and 12.13 ± 0.97 days (n=100), respectively. The total development period from egg to adult of worker, queen, and drone of *A. florea* were longer than *A. andreniformis*. The development time of *A. andreniformis* from this study is the first report in Thailand.

Department : BIOLOGY ..... Student's Signature .....

Field of Study : ZOOLOGY ..... Advisor's Signature .....

Academic Year : 2009 ..... Co-Advisor's Signature .....

โครงการ CEB_M_41_2008

การแพร่กระจายตามฤดูกาลและโครงสร้างประชากรของนกยูงเขียว *Pavo muticus* Linnaeus,1766 ที่ ต.ป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่

นายจิรวัฒน์ ดำแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SEASONAL DISTRIBUTION AND POPULATION STRUCTURE OF GREEN PEAFOWL *Pavo muticus* LINNAEUS, 1766 IN PA MIANG SUBDISTRICT, DOI SAKET DISTRICT, CHIANG MAI PROVINCE

Mr. Jirawat Dumkeaw

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแพร่กระจายตามฤดูกาลและโครงสร้างประชากรของนกยูงเขียว *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ที่ ต.ป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่
โดย	นายจิรวัฒน์ คำแก้ว
สาขาวิชา	สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ วีณา เมฆวิชัย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กำธร ธีรคุปต์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ วีณา เมฆวิชัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อาจอง ประทัตสุนทรสาร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. นริทธิ์ สีตะสุวรรณ)

จิรวัฒน์ ดำแก้ว: การแพร่กระจายตามฤดูกาลและโครงสร้างประชากรนกยูงเขียว *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ที่ ต. ป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ (SEASONAL DISTRIBUTION AND POPULATION STRUCTURE OF GREEN PEAFOWL *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 IN PA MIANG SUBDISTRICT, DOI SAKET DISTRICT, CHIANGMAI PROVINCE). อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. วีณา เมฆวิชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ผุสตี ปริยานนท์, 126 หน้า.

การศึกษาการแพร่กระจายของนกยูงเขียว (*Pavo muticus* Linnaeus, 1766) ในพื้นที่ตำบลป่าเมี่ยง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2550 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2551 ได้แบ่งการศึกษาการแพร่กระจายออกเป็น 2 ฤดู คือ ฤดูแล้ง (เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม) พบว่าในช่วงฤดูแล้ง เป็นช่วงเวลาเดียวกับฤดูสืบพันธุ์ของนกยูงเขียว การแพร่กระจายในฤดูแล้งจะเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ โดยนกยูงเพศผู้จะออกมาจับจองอาณาเขตสำหรับสืบพันธุ์ พื้นที่ที่นกยูงเพศผู้เลือกสำหรับสร้างอาณาเขตครอบครองเป็นพื้นที่เนินดินโล่งๆ และที่ราบโล่งข้างชายป่า ตั้งอยู่บริเวณโดยรอบพื้นที่งานเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าในพื้นที่ต้นน้ำทำการเกี้ยวพาราสีนกยูงเพศเมียโดยการรำแพนภายในอาณาเขตครอบครอง หลังจากได้รับการผสมพันธุ์นกยูงเพศเมียจะแยกตัวออกฝูงไปวางไข่และฟักแต่เพียงลำพังอยู่ด้านหลังงานเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าในพื้นที่ต้นน้ำ ในเดือนมีนาคมลูกนกยูงจะฟักออกจากไข่ เมื่อเข้าสู่ฤดูฝนนกยูงเพศเมียจะพาลูกนกยูงออกมาหากินบริเวณพื้นที่แปลงเกษตรซึ่งมีแหล่งอาหารจำนวนมาก ขนาดของพื้นที่หากินของแม่นกยูงจะมีความสัมพันธ์กับช่วงอายุของลูกนกยูงและระยะห่างจากชายป่า

โครงสร้างประชากรของนกยูงประกอบด้วย นกยูงเพศผู้ตัวเต็มวัย นกยูงเพศเมียตัวเต็มวัย นกยูงในระยะ subadult เพศผู้และเพศเมีย และลูกนกยูงในระยะ juvenile กลุ่มประชากรนกยูงมีการเปลี่ยนแปลง 3 ช่วง ดังนี้ ช่วงแรก การเปลี่ยนจากนกยูงในระยะ subadult ทั้งเพศผู้และเพศเมียช่วงมีช่วงเวลาในการเจริญเป็นตัวเต็มวัยไปเท่ากัน เพศผู้ต้องมีอายุ 3 ปี เพศเมียมีอายุ 2 ปี ช่วงที่สอง การวางไข่ของนกยูงเพศเมียในช่วงฤดูสืบพันธุ์ ในช่วงนี้จะให้ประชากรใหม่ที่เพิ่มขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้พบการเพิ่มขึ้นของลูกนกยูงเมื่อเปรียบเทียบกับนกยูงเพศผู้และเพศเมียในเดือนธันวาคมซึ่งเป็นเดือนที่พบนกยูงเพศผู้และเพศเมียมากที่สุดมีค่า 62 % ช่วงที่สาม การเปลี่ยนจากนกยูงในระยะ juvenile เป็นนกยูงในระยะ subadult ลูกนกยูงในระยะ juvenile เมื่อมีอายุ 6 เดือน หรือ 24 สัปดาห์จะมีลักษณะเป็นนกยูงในระยะ subadult สามารถระบุเพศได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบนกยูงเขียวทั้งหมด 119 ตัว จากการศึกษาในครั้งนี้ อัตราส่วนของนกยูงเพศผู้ต่อนกยูงเพศเมียต่อนกยูงระยะ subadult มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:4:1 ขณะที่อัตราส่วนของนกยูงเพศผู้ต่อนกยูงเพศเมียต่อลูกนกยูงระยะ juvwnile ของช่วงนอกฤดูสืบพันธุ์มีค่าเท่ากับ 1:2:4 ดังนั้นในปีต่อไปจะมีนกยูงเพิ่มขึ้น 40%

การศึกษารูปแบบของเสียงร้องของนกยูงเขียว ได้ศึกษาตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2551 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552 ภายในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ พบเสียงทั้งหมด 6 รูปแบบ เป็นเสียงที่นกยูงร้องที่ร้องทั้งในฤดูสืบพันธุ์และนอกฤดูสืบพันธุ์มี2 รูปแบบ และเสียงร้องที่ร้องในช่วงฤดูสืบพันธุ์มี 4 รูปแบบ เสียงร้องที่มีการร้องมากที่สุด คือ กระโต้งโยง ซึ่งจะร้องถี่มากที่สุดในเดือนกุมภาพันธุ์ ในรอบวัน นกยูงเขียวจะร้องเป็น 2 ช่วง คือช่วงเวลาเช้าและช่วงเย็น ในช่วงเวลาเช้า นกยูงเขียวจะร้องถี่มากที่สุดในช่วงเวลา 20 นาทีหลังจากพระอาทิตย์ขึ้น และในช่วงเย็นนกยูงเขียวจะร้องถี่มากที่สุดในช่วงเวลา 20 นาทีหลังจากพระอาทิตย์ตก

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

497 25942 23: MAJOR ZOOLOGY

KEYWORD: SEASONAL DISTRIBUTION / POPULATION STRUCTURE / CALLING PATTERN / GREEN PEAFOWL

JIRAWAT DUNKEAW: SEASONAL DISTRIBUTION AND POPULATION STRUCTURE OF GREEN PEAFOWL *PAVO MUTICUS* LINNAEUS, 1766 IN PA MIANG SUBDISTRICT, DOI SAKET DISTRICT, CHIANG MAI PROVINCE. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. WINA MECKVICHAI, THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PUTSATEE PARIYANONTH, 126 pp.

Seasonal distribution of green peafowl (*Pavo muticus* Linnaeus, 1766) in Pha Miang Sub District, Doi Sa Ket District, Chiang Mai Province was studied during October 2007 to September 2008.The distribution in this study was separated into dry and wet season, Dry season was started from November to April and rainy season was began during May to October. In dry season was the same period of breeding season of green peafowl, male peafowl will establish their territory on the hill or open field near the forest. Almost all of their breeding territories are located in wildlife breeding center and boundary area. Male peafowl often display by fan their trains and shacking their ocelli in order to attractive female in their territory. After copulated, female lay and incubate their eggs alone in the forest behind wildlife breeding center. In March, eggs become hatching. When becoming rainy season, all female are leading her chicks to feed in agricultural area where foods are abundance. The distributions of feeding area of peahens are correlated with age of their chick and the distance from the forest.

Population structure of green peafowl consists of male peafowl, female peafowl, subadult male and female and juvenile. From this studied in a whole year round, they contained 3 populations changing period; first period, subadult peafowl grow up and become to adult, 3 years for male and 2 years for female. Second period, green peafowl have their brooding lead to population increase accord to new born chick. In this study, it is found that the percentage of adult in December that got peak population which has a highest at 62%. Third period, when the chick that have 6 months old or 24 weeks old juveniles are grown up to be subadult, at this age sex can be distinguished. In this study, total populations of green peafowl are found 119 individuals. The ratio of male peafowl per female peafowl per subadult in breeding season is 1:4:1 and ratio of male peafowl per female peafowl per juvenile in non breeding season is 1:2:4. So in next year, the population of green peafowl will increase at 40%.

The vocalizations of green peafowl were studied from November 2008 to May 2009 in Huai Hong Khrai Royal Development Study Centre. There are 6 different types of calling consist of 2 self alert calls and 4 breeding calls. The highest number of calling frequency in breeding season is "Kra Tong Hong" which was called in the morning 20 minute after sunrise and 20 minute after sunset.

Department : Biology
Field of Study : Zoology
Academic Year: 2009

Student's Signature.....
Advisor's Signature.....
Co-advisor's Signature.....

โครงการ CEB_M_42_2008

ความหลากหลายของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในพื้นที่เตรียมจัดตั้งอุทยานแห่งชาติเขาสิบห้าชั้น จังหวัดจันทบุรี

นางสาวพัชร ดนัยสวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SPECIES DIVERSITY OF AMPHIBIAN IN KHAO SIP HA CHAN PROPOSED NATIONAL PARK , CHANTHABURI PROVINCE

Miss. Patchara Danaisawat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในพื้นที่เตรียมจัดตั้งอุทยานแห่งชาติเขาสิบห้าชั้น จังหวัดจันทบุรี
โดย	นางสาวพัชร คนัยสวัสดิ์
สาขาวิชา	สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฎฐ์ คนซื่อ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาจอง ประทัดสุนทรสาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาธร ธีรคุปต์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฎฐ์ คนซื่อ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อาจอง ประทัดสุนทรสาร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ผุสตี ปริยานนท์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายธัญญา จั่นอาจ)

พัชร ดนัยสวัสดิ์: ความหลากหลายของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในพื้นที่เตรียมจัดตั้งอุทยานแห่งชาติเขาสิบห้าชั้น จังหวัดจันทบุรี (SPECIES DIVERSITY OF AMPHIBIAN IN KHAO SIP HA CHAN PROPOSED NATIONAL PARK, CHANTHABURI PROVINCE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร. วิเชฎฐ์ คนซื่อ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ.ดร.อาจอง ประทัดสุนทรสาร, 156 หน้า.

การศึกษาความหลากหลายของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในพื้นที่เตรียมจัดตั้งอุทยานแห่งชาติเขาสิบห้าชั้น จังหวัดจันทบุรี มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายของชนิด จัดทำรูปวิธาน ศึกษาถิ่นที่อยู่อาศัยและความสัมพันธ์ระหว่างการปรากฏของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในรอบปีกับสภาพภูมิอากาศ โดยเก็บตัวอย่างด้วยวิธีสำรวจแบบพบเห็นตัว (visual encounter survey) ตรวจสอบชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเก็บข้อมูลภูมิอากาศได้แก่ อุณหภูมิอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝนจากสถานีอุตุนิยมวิทยาในพื้นที่ (รหัสสถานี 480007) ตั้งแต่เดือนมกราคม 2551 ถึงเดือนธันวาคม 2551

ผลการศึกษาพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้งหมด 2 อันดับ 7 วงศ์ 18 สกุล 34 ชนิด ในถิ่นที่อยู่อาศัยย่อย 14 ลักษณะ โดยมีค่าดัชนีความหลากหลายทางชีวภาพ (Shannon-Weiner Index) เท่ากับ 3.565 สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบในพื้นที่ มีชนิดที่พบในภาคตะวันออกเป็นครั้งแรก 2 ชนิดคือ คางคกหัวราบ (*Bufo macrotis*) และกบได้หวัน (*Rana taipehensis*) และที่คาดว่าน่าจะเป็นชนิดใหม่ (new species) จำนวน 1 ชนิดคือ เขียดงู (*Ichthyophis* sp.)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและจำนวนของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกับปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศด้วย Pearson and Spearman's correlation test พบว่าจำนวนตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้งหมดที่พบมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝนในเชิงลบ ($p = 0.037$) แต่จำนวนชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกไม่มีความสัมพันธ์กับสภาพภูมิอากาศ ส่วนจำนวนชนิดของลูกอ๊อดในพื้นที่ราบมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝนในเชิงบวก ($p = 0.041$) ในขณะที่จำนวนชนิดของลูกอ๊อดตามลำห้วยมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิในเชิงบวก ($p = 0.033$)

ภาควิชา ชีววิทยา
สาขาวิชา สัตววิทยา
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

497 24060 23: MAJOR ZOOLOGY

KEYWORDS: Amphibian, Diversity, Climatic factors, Khao Sip Ha Chan Preserve forest

PATCHARA DANAISAWAT: SPECIES DIVERSITY OF AMPHIBIAN IN KHAO SIP HA CHAN PROPOSED NATIONAL PARK, CHANTHABURI PROVINCE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. WICHASE KHONSUE, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. ATR-ONG PRADATSUNDARASAN, Ph.D., 156 pp.

The current study of amphibian diversity in Khao Sip Ha Chan Proposed National Park, Chanthaburi Province aimed to examine diversity of amphibian fauna, construct pictorial key, identify habitat preference and study relationship between the occurrence of amphibian fauna and climatic factors. In this study, species diversity and habitat information was obtained by visual encounter survey during January – December 2008. Species of amphibians were identified based on morphological characters. Climatic factors, such as air temperature, relative humidity and total rainfall were collected from the nearest meteorological station (station code 480007) in each month.

The result of this study revealed 2 orders, 7 families, 18 genus and 34 species of amphibian in 14 microhabitats of the study area with a diversity index (Shannon-Weiner Index) of 3.565. Among the amphibians found in this study, *Bufo macrotis* and *Rana taipehensis* are new records for eastern part of Thailand. It is also possible that a new morphotype of caecilian (*Icthyophis* sp.) in juvenile and adult stage is presented in the area.

The relationship between climatic factors and occurrence of amphibian as determined by Pearson and Spearman's correlation test showed that the number of individual was negatively correlated with rainfall ($p = 0.037$). However, the number of amphibian species showed no correlation with any climatic factors. The number of tadpole species in lowland was positively correlated with rainfall ($p = 0.041$), while the number of tadpole species in the stream was positively correlated with temperature ($p = 0.033$).

Department : Biology
Field of Study : Zoology
Academic Year : 2009

Student's Patchara Danaisawat
Advisor's Wich. K.
Co-Advisor's Atr-ong Pradat.

โครงการ CEB_M_43_2008

ความสัมพันธ์ระหว่างพลวัตประชากรปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) กับปัจจัยทางกายภาพของแหล่งหญ้าทะเล อ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

นายกุศล เรืองประเทืองสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RELATIONSHIPS BETWEEN POPULATION DYNAMICS OF BLUE SWIMMING CRAB, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758), AND PHYSICAL FACTORS OF SEAGRASS BED, KHUNG KRABAEN BAY, CHANTHABURI PROVINCE

Mr. Kusol Raungprataungsuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างพลวัตประชากรปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) กับปัจจัยทางกายภาพของแหล่งหญ้าทะเล อ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี
โดย	นายกุศล เรืองประเทืองสุข
สาขาวิชา	สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนา คชเสนี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กำธร ธีรคุปต์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนา คชเสนี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ สัตยาลัย)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญรัตน์ ประทุมชาติ)

กุศล เรืองประเทืองสุข: ความสัมพันธ์ระหว่างพลวัตประชากรปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) กับปัจจัยทางกายภาพของแหล่งหญ้าทะเล อ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี (RELATIONSHIPS BETWEEN POPULATION DYNAMICS OF BLUE SWIMMING CRAB, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758), AND PHYSICAL FACTORS OF SEAGRASS BED, KHUNG KRABAEN BAY, CHANTHABURI PROVINCE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. นันทนา คชเสนี, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์, 133 หน้า

ความสัมพันธ์ระหว่างพลวัตประชากรปูม้ากับปัจจัยทางกายภาพ ในแหล่งหญ้าทะเล อ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี ได้ดำเนินการโดยการศึกษาพลวัตของประชากรปูม้าในระยะที่เป็นแพลงก์ตอน ลูกปูม้าระยะหลังการลงเกาะ และตัวเต็มวัยในบริเวณแหล่งหญ้าทะเล 2 ชนิด คือ หญ้าทะเลขะเงาใบยาว *Enhalus acoroides* และหญ้าทะเลผมนาง *Halodule pinifolia* ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2551 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 พบว่าความหนาแน่นของประชากรปูม้าในระยะที่เป็นแพลงก์ตอน ลูกปูม้าระยะหลังการลงเกาะ และตัวเต็มวัยมีความแตกต่างกันระหว่างช่วงเวลากลางวันและช่วงเวลากลางคืน และมีความแตกต่างกันตามฤดูกาล ประชากรปูม้าในระยะที่เป็นแพลงก์ตอนพบในฤดูแล้งมากกว่าในฤดูฝน ปูม้าในระยะแพลงก์ตอนพบมากในบริเวณหญ้าขะเงาใบยาวมากกว่าบริเวณที่เป็นหญ้าผมนางและบริเวณที่ไม่มีแหล่งหญ้าทะเล ผลการศึกษาการกระจายและความหนาแน่นของประชากรในแหล่งหญ้าทะเลในช่วงที่มีการปล่อยไข่เป็นจำนวนมาก 2 ช่วง คือ ระหว่างต้นเดือนธันวาคม 2551 ถึงกลางเดือนมกราคม 2552 และระหว่างต้นเดือนเมษายน 2552 ถึงกลางเดือนพฤษภาคม 2552 พบความหนาแน่นของลูกปูม้าแตกต่างกันในช่วงการเก็บตัวอย่างทั้งสองช่วงที่ทำการศึกษา ในช่วงการศึกษาสามารถประมาณความสำเร็จในการพัฒนาการของปูม้าในระยะที่เป็นแพลงก์ตอนจนถึงระยะที่ลงเกาะเป็นระยะ Megalopa พบว่าความสำเร็จในการพัฒนาของลูกปูม้าจนถึงการลงเกาะมีค่าสูงสุด ในแหล่งหญ้าขะเงาใบยาว รองลงมาคือในแหล่งหญ้าผมนาง ส่วนประชากรปูม้าวัยอ่อนพบหนาแน่นในแหล่งหญ้าผมนาง ส่วนปูม้าตัวเต็มวัยพบมากที่สุดในบริเวณที่ไม่มีแหล่งหญ้าทะเล เมื่อเทียบขนาดของปูม้าที่พบในอ่าวคุ้งกระเบนจะเห็นได้ว่าในสถานีที่เป็นแหล่งหญ้าทะเลจะพบปูม้าที่มีขนาดความกว้างกระดองที่เล็กกว่าในบริเวณที่ไม่มีแหล่งหญ้าทะเล ในส่วนของพลวัตประชากรปูม้าวัยอ่อน และในระยะปูม้าโตเต็มวัย พบว่าอัตราส่วนระหว่างเพศผู้ต่อเพศเมียมีค่าเป็น 1 : 0.5 ความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างกระดอง (CW) และน้ำหนัก (W) ของปูม้าเพศผู้ คือ $W = 0.0963CW^{2.8264}$ และปูม้าเพศเมีย คือ $W = 0.1005CW^{2.7859}$ จากการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ FiSAT โดยใช้ข้อมูลการกระจายความถี่ความกว้างกระดอง พบว่าค่าพารามิเตอร์การเติบโตของปูม้าเพศผู้ มีค่า L_∞ เท่ากับ 12.23 เซนติเมตร ค่า K เท่ากับ 0.56 ต่อปี ส่วนปูม้าเพศเมียมีค่า L_∞ เท่ากับ 11.23 เซนติเมตร ค่า K เท่ากับ 1.10 ต่อปี ค่าสัมประสิทธิ์การตายรวมของปูม้าเพศผู้และเพศเมียมีค่าเท่ากับ 1.43 และ 0.83 ต่อปี ตามลำดับ ขนาดความยาวแรกจับมีค่า 1.46 เซนติเมตร และมีรูปแบบการทดแทนที่ตลอดทั้งปี โดยมีการทดแทนที่สูง 2 ช่วง คือ ในช่วงเดือนมิถุนายน ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2551 และช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 ปัจจัยทางนิเวศวิทยาที่มีผลต่อการกระจายและความหนาแน่นของประชากรปูม้าระยะแพลงก์ตอนคือ ระดับความลึกที่แสงส่องถึง อุณหภูมิและปริมาณความเค็ม ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าแหล่งหญ้าทะเลในอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี มีบทบาทในการทดแทนกลุ่มประชากรปูม้าโดยเป็นแหล่งอนุบาลลูกปูม้าในระยะที่เป็นแพลงก์ตอนและลูกปูม้าระยะหลังการลงเกาะ

ภาควิชา.....ชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2552.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

497 22286 23: MAJOR ZOOLOGY

KEYWORDS: KUNG KRABAEN BAY, POPULATION DYNAMICS, SEAGRASS BED

KUSOL RAUNGPRATAUNGSUK: RELATIONSHIPS BETWEEN POPULATION DYNAMICS OF BLUE SWIMMING CRAB, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758), AND PHYSICAL FACTORS OF SEAGRASS BED, KHUNG KRABAEN BAY, CHANTHABURI PROVINCE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. NANTANA GAJASENI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. NITTHARATANA PAPHAVASIT, 133 pp.

Relationships between population dynamics of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758), and physical factors of seagrass bed, Khung Krabaen Bay, Chanthaburi Province was determined by the study of population dynamics of blue swimming crab in planktonic stage, post – settlement and adult in two different seagrass beds, *Enhalus acoroides* and *Halodule pinifolia* from April 2008 to March 2009. Different densities of planktonic stage, post – settlement and adult were recorded during daytime and nighttime. High densities of planktonic stage were found in dry season. These planktonic stages were found highest in *E. acoroides* seagrass beds. In respective ranking were the densities in *H. pinifolia* seagrass beds and bare ground. Results From the distribution and density of crab population in two peaks of spawning season during December 2008 – January 2009 and April 2009 – May 2009, showed the different densities of crab population in planktonic stage during day and night sampling and the two spawning periods. The estimation on the success of planktonic development to settlement was higher in the *E. acoroides* seagrass beds than *H. pinifolia* seagrass beds and bare ground. Juvenile blue swimming crab preferred the *H. pinifolia* beds while the adult crab preferred the bare ground. Carapace width of crabs in seagrass beds were smaller than crabs in bare ground. The sex ratio of male to female was 1 : 0.5. The relationships between carapace width and weight were $W = 0.0963CW^{2.8264}$ and $W = 0.1005CW^{2.7859}$ in male and female crabs, respectively. The data on crab population dynamics have been calculated by the FiSAT program based on carapace width and frequency distribution. The growth parameter of male crab were $L_{\infty} = 12.23$ cm.; $K = 0.56$ per year while the growth parameter of the female crab were $L_{\infty} = 11.23$ cm.; $K = 1.10$ per year while total mortality of male and female crabs were indicated by 1.43 and 0.83 per year, respectively The probability of capture ($L_{50\%}$) was 1.46 cm. The recruitment period occurred all year but with two peaks. The first peak was during June to August 2008 and the second peak was during December 2008 to February 2009. The physical factors of seagrass bed that influenced the distribution and density of planktonic stage are transparency, temperature and salinity. This study revealed the importance of seagrass beds in Khung Krabaen Bay, Chanthaburi Province in the recruitment of blue swimming crab populations as nursery ground for planktonic and post – settlement stages.

Department : .....Biology.....Student's Signature Kusol Raungprataungsuk

Field of Study : .....Zoology.....Advisor's Signature .....

Academic Year : .....2009.....Co-Advisor's Signature Nittharatana Paphavasit

โครงการ CEB_M_44_2008

ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมและการใช้พื้นที่ของมนุษย์ต่อความชุกชุมของประชากรนกยูง *Pavo muticus* บริเวณห้วยทับเสลาและห้วยสองทาง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี.

นางสาวธัญวรัตน์ ปิ่นทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF ENVIRONMENTAL AND HUMAN USE FACTORS TO ABUNDANCE OF GREEN PEAFOWL *Pavo muticus* AT HUAI TAB SALOA AND HUAI SONGTANG, HUAI KHA KHAENG WILDLIFE SANCTUARY, UTHAI THANI PROVINCE

Miss Tanwarat Pinthong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	EFFECT OF ENVIRONMENTAL AND HUMAN USE FACTORS TO ABUNDANCE OF GREEN PEAFOWL *Pavo muticus* AT HUAI TAB SALOA AND HUAI SONGTANG, HUAI KHA KHAENG WILDLIFE SANCTUARY, UTHAI THANI PROVINCE
By	Miss Tanwarat Pinthong
Field of Study	Environmental Science
Thesis Advisor	Associate Professor Wina Meckvichai

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Graduate School
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon,Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Assistant Professor Charnwit Kositanont, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Wina Meckvichai)

..... Examiner
(Associate Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

..... External Examiner
(Assistant Professor Philip D. Round)

..... External Examiner
(Anak Pattanavibool, Ph.D.)

ธัญวรัตน์ ปิ่นทอง: ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมและการใช้พื้นที่ของมนุษย์ต่อความชุกชุมของประชากรนกยูง *Pavo muticus* บริเวณห้วยทับเสลาและห้วยสองทาง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี. (EFFECT OF ENVIRONMENTAL AND HUMAN USE FACTORS TO ABUNDANCE OF GREEN PEAFOWL *Pavo muticus* AT HUAI TAB SLOA AND HUAI SONGTANG, HUAI KHA KHAENG WILDLIFE SANCTUARY, UTHAI THANI PROVINCE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. วีณา เมฆวิชัย, 148 หน้า.

ในประเทศไทย นกยูงเขียวหรือนกยูงไทย (*Pavo muticus*) ถูกจัดอยู่ในสถานะภาพสัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากจำนวนประชากรได้ลดลงมากจากในอดีต สาเหตุจากการสูญเสียถิ่นที่อยู่อาศัย การขาดความต่อเนื่องของถิ่นที่อยู่อาศัย และการรบกวนของมนุษย์ การศึกษาเรื่องการเปลี่ยนแปลงพลวัตรประชากรในรอบปีและการใช้พื้นที่ของนกยูง บริเวณห้วยทับเสลาและห้วยสองทาง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี เริ่มตั้งเดือนมกราคม ถึงเดือนธันวาคม 2552 โดยได้ศึกษาความชุกชุมของนกยูง ในพื้นที่ 3 รูปแบบ คือป่าอนุรักษ์ ป่ากันชน และป่าชุมชน และเก็บข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะของถิ่นที่อยู่อาศัยที่เหมาะแก่การดำรงชีวิตของนกยูงได้แก่ พื้นที่หากิน พื้นที่อาบฝุ่น พื้นที่สืบพันธุ์ พื้นที่วางไข่ และต้นไม้ที่นกยูงใช้นอน ผลการศึกษาพบว่า นกยูงมีความชุกชุมมากที่สุดที่ป่าอนุรักษ์ บริเวณลำห้วยทับเสลาและห้วยสองทาง (1.70 ตัวต่อกิโลเมตร) ลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัยมีหลายรูปแบบ คือ ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าไผ่ ใกล้แหล่งน้ำถาวรที่มีหาดทราย นกยูงออกหากินตั้งแต่เวลา 07.00น. ในฤดูฝนและ 08.15น. ในฤดูแล้ง ลักษณะของพื้นที่อาบฝุ่นมีความหนาแน่นของไม้ยืนต้นและไม้พื้นล่างต่ำ (0.167 และ 1.515 ต้น/ตร.ม.) ความหนาแน่นเรือนยอดป่านกลาง (44.4%) ความเข้มแสงสูง ชนิดดินที่ใช้ในการอาบฝุ่นเป็นดินร่วนปนทราย ลักษณะต้นไม้ที่ใช้เกาะคอนนอนเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ความสูงตั้งแต่ 19 – 30 เมตร อยู่ริมน้ำ ความหนาแน่นเรือนยอดป่านกลาง ลักษระของลานสืบพันธุ์มีความหนาแน่นของไม้ยืนต้น ไม้พื้นล่าง และความหนาแน่นเรือนยอดต่ำ (0.091 และ 1.863 ต้น/ตร.ม. และ 18.75% ตามลำดับ)สำหรับพื้นที่ทำรังวางไข่มีความหนาแน่นไม้พื้นล่าง และความหนาแน่นไม้เรือนยอดสูง (63.438% และ 65.0% ตามลำดับ)

แนวทางในการอนุรักษ์และฟื้นฟูถิ่นที่อยู่อาศัย อันดับแรก แยกพื้นที่เพื่อใช้ในการอนุรักษ์และพื้นที่สำหรับการทำกิจกรรมออกจากกันให้ชัดเจน, สอง จัดการพัฒนาพื้นที่บริเวณป่ากันชนเพื่อใช้สำหรับสันทนาการและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ, สาม สำรวจความชุกชุมของประชากรนกยูงในพื้นที่อย่างสม่ำเสมอ และขยายพื้นที่อนุรักษ์ให้ครอบคลุมบริเวณที่พบนกยูง, สี่ พัฒนาแหล่งน้ำถาวรให้มากขึ้น โดยการจัดทำบ่อน้ำในบริเวณที่นกยูงใช้พื้นที่, ห้า ให้ความรู้และจัดกิจกรรมเพื่อให้เยาวชนในพื้นที่ตระหนักถึงความสำคัญของการอนุรักษ์ และสุดท้าย ผลักดันให้ใช้กฎหมายอย่างมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

โครงการ CEB_M_46_2008

การฟอกสีน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษโดยเชื้อราฟอกขาวสายพันธุ์ที่คัดแยกจากเขตร้อน

นางสาวทิฆัมพร ระย้า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DECOLORIZATION OF WASTEWATER FROM PULP AND PAPER INDUSTRY BY TROPICAL ISOLATES OF WHITE ROT FUNGI

Miss Thikhumporn Raya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การฟอกสีน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษโดยเชื้อราฟอกขาวสายพันธุ์ที่คัดแยกจากเขตร้อน
โดย	นางสาวทิฆัมพร ระย้า
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ- หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ อนิวรรต เฉลิมพงษ์)

ทิฆัมพร ระย้า : การฟอกสีน้ำเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษโดยเชื้อราฟอกขาวสายพันธุ์ที่คัดแยกจากเขตร้อน. (DECOLORIZATION OF WASTEWATER FROM PULP AND PAPER INDUSTRY BY TROPICAL ISOLATES OF WHITE ROT FUNGI) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร. สีหนาท ประสงค์สุข, 130 หน้า.

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดราในกลุ่มราฟอกขาวจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยทั้งหมด 13 จังหวัด พบว่าสามารถแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์และจัดจำแนกได้ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ จากนั้นจึงทำการทดสอบการผลิตแลคเคสพบว่าสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตแลคเคสดีที่สุดคือ *Pycnoporus sanguineus* CM1 จากนั้นจึงนำสายพันธุ์นี้มาหาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตแลคเคสโดยพบว่าแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลกลูโคส (2 เปอร์เซ็นต์) ให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงสุด (0.67±0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ส่วนแหล่งไนโตรเจนคือเปปโตน (0.25 เปอร์เซ็นต์) ให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงสุด (0.752±0.01ยูนิตต่อมิลลิลิตร) แหล่งอาหารเสริมคือยีสต์สกัด (0.25 เปอร์เซ็นต์) ให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงสุด (0.85±0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และทำการศึกษาผลของคอปเปอร์ซัลเฟตโดยพบว่าที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ให้ค่ากิจกรรมแลคเคสสูงสุดเท่ากับ (1.60±0.06 ยูนิตต่อมิลลิตร) แลคเคสที่ผลิตได้นำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือที่อิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมของแลคเคสเพิ่มขึ้น 3.95 เท่า จากนั้นจึงนำเชื้อรา *Pycnoporus sanguineus* CM1 และแลคเคสไปทำการลดสีน้ำเสียจากโรงงานเยื่อและกระดาษ โดยทำการใช้เชื้อราอิสระเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถลดสีน้ำเสียได้ 76 เปอร์เซ็นต์ ลดค่าบีโอดีและซีโอดีได้ 13 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ชั่วโมง 21 ของการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อใช้เชื้อรา *Pycnoporus sanguineus* CM1 ตรึงรูป พบว่าสามารถใช้เม็ดเชื้อราตรึงลดสีน้ำเสียได้ 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 สามารถลดสีน้ำเสีย ลดค่าบีโอดีและซีโอดีได้ 74 เปอร์เซ็นต์ 44.2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 24 และครั้งที่ 2 สามารถลดสีน้ำเสียได้ 73 เปอร์เซ็นต์ ลดค่าบีโอดีได้ 33 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 15 แต่ไม่สามารถลดค่าซีโอดีได้ เมื่อใช้แลคเคสตรึงรูป 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถนำแลคเคสตรึงรูปมาใช้ซ้ำได้ 6 ครั้ง โดยค่าการลดลงของสีน้ำเสียคือ 74.0 เปอร์เซ็นต์ ครั้งแรก และ13.28 เปอร์เซ็นต์ ครั้งสุดท้าย ตามลำดับ และลดค่าบีโอดีได้ครั้งแรก 50 และ ครั้งสุดท้าย 46 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าซีโอดีสามารถลดได้ 5 เปอร์เซ็นต์ ในครั้งแรก และหลังจากนั้นไม่สามารถลดค่าซีโอดีได้อีก

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2552..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4972307523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS : WHITE ROT FUNGI / LACCASE / DECOLORIZATION

THIKHUMPORN RAYA : DECOLORIZATION OF WASTEWATER FROM PULP AND PAPER INDUSTRY BY TROPICAL ISOLATES OF WHITE ROT FUNGI. THESIS ADVISOR : HUNSA PUNNAPAYAK, ASSOC. PROF. DR., THESIS CO-ADVISOR : SEHANAT PRASONGSUK, DR. 130 pp.

White rot fungi were collected from natural habitats of 13 provinces in Thailand. Pure mycelia were from 35 fungal samples isolated which were successfully identified. All strains were assessed for laccase production and the highest laccase activity was obtained from *Pycnoporus sanguineus* CM1. This strain was further optimized for laccase production conditions. It was found that the highest laccase activity was obtained from 2.0% of glucose as carbon source (0.67±0.125 U/ml), 0.25% of peptone as nitrogen source (0.752±0.01 U/ml), 0.25% of yeast extract as nutrient supplement (0.85±0.04 U/ml) and 0.6 mM copper sulphate (Cu_2SO_4) as inducer (1.60±0.06 U/ml). Laccase was then partially purified using ammonium sulphate precipitation. At 80% of $(NH_4)_2SO_4$, the laccase activity increased 3.95 folds. The enzyme was used to decolorized wastewater from paper and pulp industry. By using 20% of free fungal cells, the color, BOD and COD of wastewater reduced by 76%, 13% and 16%, respectively at 21 hours of incubation. Using immobilized *Pycnoporus sanguineus* CM1 cell to decolorize wastewater, the immobilized cell could be used 2 cycles. During the first cycles, they reduced color of wastewater up to 74% while its BOD and COD reduced by 44.2% and 5% respectively after 24 hours. During the second cycles, they reduced color of wastewater up to 73% while its BOD reduced by 33% but COD did not reduce. By using immobilized laccase (100 U/ml) to decolorized wastewater, the immobilized laccase could be used 6 cycles. The color of wastewater was reduced during 74% for the first cycles and by 13.2% during the last cycles. Its BOD was reduced by 50% during the first cycles and 46% during the last cycles while its COD was reduced by 5% in the first cycles and it was not reduced after that.

Field of Study : Biotechnology ..... Student's Signature .....

Academic Year : 2009 ..... Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

ความหลากหลายของชนิดนกในพื้นที่ภูเขาทอง อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี

นายเลอสรรค์ วศิโนภาส

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา (ภาควิชาชีววิทยา)
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIRD SPECIES DIVERSITY IN PHU KHAO TONG AREA, KANG KHOI DISTRICT, SARABURI PROVINCE

Mr. Lerson Vasinopas

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	BIRD SPECIES DIVERSITY IN PHU KHAO TONG AREA, KANG KHOI DISTRICT, SARABURI PROVINCE
By	Mr. Lerson Vasinopas
Field of Study	Zoology
Thesis Advisor	Associate Professor Wina Meckvichai
Thesis Co-advisor	Chatchawan Chaisukul, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Supot Hannongbua, Dr. rer. nat.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Wina Meckvichai)

..... Thesis Co-advisor

(Chatchawan Chaisukul, Ph.D.)

..... Examiner

(Assistant Professor Art-ong Pradatsundarasar, Ph.D.)

..... External Examiner

(Assistant Professor Philip D. Round)

เลอสรรค์ วศิโนภาส : ความหลากหลายของชนิดนกในพื้นที่ภูเขาทอง อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี. (BIRD SPECIES DIVERSITY IN PHU KHAO TONG AREA, KANG KHOI DISTRICT, SARABURI PROVINCE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. วีณา เมฆวิชัย, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ. ดร. ชัชวาล ไจชื่อกุล, 91 หน้า.

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้คือ ศึกษาความหลากหลายของชนิดนกใน 5 ลักษณะพื้นที่ที่เป็นถิ่นที่อยู่อาศัย ได้แก่ พื้นที่ป่า อ่างเก็บน้ำ ทุ่งหญ้า แปลงเกษตร และหมู่บ้าน รวมไปถึงปัจจัยบางประการที่อาจมีผลกระทบต่อความหลากหลายของชนิดนกในพื้นที่เหล่านั้น ความหลากหลายของชนิดนกในพื้นที่ภูเขาทอง อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี ได้เก็บข้อมูลทุกเดือน โดยวิธี point count method ตั้งแต่ มกราคม ปี พ.ศ. 2551 ถึง ธันวาคม ปี พ.ศ. 2551

ความหลากหลายของชนิดนกทั้งหมดในพื้นที่ศึกษาพบ 103 ชนิด และ จำนวนของชนิดนกในพื้นที่ทุ่งหญ้า แปลงเกษตร หมู่บ้าน อ่างเก็บน้ำ และ ป่า รอบพื้นที่ ภูเขาทอง มีค่าเท่ากับ 73, 64, 55, 46 และ 39 ชนิด ตามลำดับ และค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Weiner คือ 3.39, 3.37, 3.14, 3.06 และ 3.01 ตามลำดับ ความคล้ายคลึงของชนิดนกระหว่างสองพื้นที่ที่มีความคล้ายคลึงของชนิดนกมากที่สุดคือ แปลงเกษตรและหมู่บ้าน โดยมีดัชนีความคล้ายคลึงของ Sorensen เท่ากับ 0.78 ขณะที่ป่า และหมู่บ้าน มีความคล้ายคลึงของชนิดนกต่ำที่สุด ที่ค่าดัชนี เท่ากับ 0.47 นอกจากนั้น ปัจจัยทางชีวภาพเกี่ยวกับการรบกวนจากมนุษย์ แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของชนิดนก และความชุกชุมของนก (Pearson Correlation = - 0.725 (p = 0.00) และ -0.528 (p = 0.01) ตามลำดับ ในขณะเดียวกัน ปัจจัยทางกายภาพทั้งหมดที่ศึกษาในครั้งนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับความหลากหลายของชนิด และ ความหนาแน่นของนก ที่ค่า Pearson correlation $p \geq 0.05$

เนื่องจากพื้นที่ทุ่งหญ้ามีความหลากหลายของชนิดนกสูงสุด ดังนั้นพื้นที่ทุ่งหญ้าระหว่างภูเขาจึงควรเก็บรักษาไว้ เพื่อเป็นพื้นที่เชื่อมต่อของนกในพื้นที่ ขณะเดียวกัน พื้นที่ที่ใกล้กับถนนใหญ่นั้น อาจนำมาใช้เป็นพื้นที่ก่อสร้างโครงสร้างพื้นฐานต่างๆ ปัจจุบันนี้ พื้นที่ป่าในบริเวณภูเขาทอง กำลังอยู่ในระหว่างการฟื้นฟู ดังนั้นควรรักษาสภาพให้ถูกรบกวนน้อยที่สุด

ภาควิชา: ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา: สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา: 2552 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

4972463723 : MAJOR ZOOLOGY
KEYWORDS : BIRD / DIVERSITY / DISTURBANCE

LERSON VASINOPAS : BIRD SPECIES DIVERSITY IN PHU KHAO TONG AREA KANG KHOI DISTRICT, SARABURI PROVINCE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WINA MECKVICHAI, THESIS CO-ADVISOR : CHATCHAWAN CHAISUKUL., Ph.D., 91 pp.

The main objectives of this study were to examine bird species diversity in 5 different types which were forest, reservoir, grassland, agricultural field and residential area as well as to investigate biological and physical factors that many affect bird species in those habitats. Species diversity of birds in Phu Khao Tong area Kang Khoi District, Saraburi Province were monthly assessed by point count method from January 2008 to December 2008.

The total number of bird species in the study area is 103 species. The number of bird species for a grassland, an agricultural field, a residential area, a reservoir, and a forest around Phu Khao Tong area were 73, 64, 55, 46, and 38 species respectively, and Shonnon-Weiner diversity index were 3.39, 3.37, 3.14, 3.06, and 3.01 respectively. The most similar in bird species between two habitat types was that between the agricultural field and the residential area with a Sorensen's similarity index (S) of 0.78 while bird species in the forest and the residential are was least similar with the similarity index of 0.47. Moreover, a biological factor that showed correlations with the bird diversity and bird abundance was human disturbance (Pearson correlation = -0.725 (p = 0.00) and 0.528 (p = 0.01) respectively) while all physical factors investigated in this study did not correlate with bird diversity ($p \geq 0.05$).

Since in this study the grassland contained the highest bird diversity, the habitat type found between mountains should be preserved for bird corridor, however, those located near main road may be used for the constructions of infrastructure. At the present time forests in Phu Khao Tong area were on the process of restoration, so disturbance by human on these forests should be minimized.

Department :	Biology	Student's Signature	
Field of Study :	Zoology	Advisor's Signature	
Academic Year :	2009	Co-advisor's Signature	

โครงการ CEB_M_48_2008

การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับการเติบโตของไก่ป่าตุ้มหูแดง *Gallus gallus spadiceus* ในกรงเลี้ยงที่สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าห้วยขาแข้ง

นายฐาปนา จ้อยเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MORPHOLOGICAL CHANGES RELATED TO THE GROWTH OF RED JUNGLEFOWL *Gallus gallus spadiceus* IN CAPTIVITY AT HUAI KHA KHAENG WILDLIFE BREEDING STATION

Mr. Thapana Choicharoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Zoology
Department of Biology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009
Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	MORPHOLOGICAL CHANGES RELATED TO THE GROWTH OF RED JUNGLEFOWL *Gallus gallus spadiceus* IN CAPTIVITY AT HUAI KHA KHAENG WILDLIFE BREEDING STATION
By	Mr.Thapana Choicharoen
Field of Study	Zoology
Thesis Advisor	Associate Professor Wina Meckvichai

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

S. Hannongbua
..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

K. Thirakhupt
..... Chairman
(Associate Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

Wina Meckvichai
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Wina Meckvichai)

Wich. Kh
..... Examiner
(Assistant Professor Wichase Khonsue, Ph.D.)

..... External Examiner
(Boripat Siriaroonrat, Ph.D.)

นายฐาปนา จ้อยเจริญ : การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับการเติบโตของไก่ป่าตุ้มหูแดง *Gallus gallus spadiceus* ในกรงเลี้ยงที่สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. (MORPHOLOGICAL CHANGES RELATED TO THE GROWTH OF RED JUNGLEFOWL *Gallus gallus spadiceus* IN CAPTIVITY AT HUAI KHA KHEANG WILDLIFE BREEDING STATION) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.วีณา เมฆวิชัย, 101 หน้า.

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของไก่ป่าตุ้มหูแดง *Gallus gallus spadiceus* จากลักษณะและตำแหน่งของขน สีจะงอยปาก และสีแข้ง รวม 19 ลักษณะ และจากการวัดสัดส่วนของลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งหมด 13 ลักษณะ ผลการศึกษาพบว่าในระยะแรกตั้งแต่ฟักออกจากไข่จนถึง 7 วันแรก ลูกไก่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว ระยะที่ 2 ตั้งแต่ 2-20 สัปดาห์ จะมีการผลัดขนจากขนครั้งแรก จาก ชุดขนแรกเกิด (natal plumage) ไปเป็น ชุดขนวัยเด็ก (juvenal plumage) ระยะนี้สามารถแยกเพศลูกไก่ได้จากลักษณะสัณฐานวิทยาของขนและการเปลี่ยนแปลงของสีแข้ง และเมื่อไก่ป่าอายุ 20 สัปดาห์จะมีการผลัดขนครั้งที่สองเปลี่ยนจากขน ชุดขนวัยเด็ก (juvenal plumage) ไปเป็น ชุดขนก่อนฤดูผสมพันธุ์ (prenuptial plumage) ระยะที่ 3 ตั้งแต่ 21-48 สัปดาห์ พบว่าไก่ป่ามีการผลัดขนครั้งที่สามทั้งในเพศผู้และเพศเมียจาก ชุดขนก่อนฤดูผสมพันธุ์ (prenupital plumage) เป็น ชุดขนฤดูผสมพันธุ์ (nupital plumage) มีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง และสีขนเข้มขึ้น มันวาวขึ้นในเพศผู้ โดยเฉพาะขนคอ ขนคลุมปีก ขนหลังและขนหาง ตลอดจนหงอนมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีสีแดงสด ส่วนในเพศเมียพบว่ามีขนสีเหลืองน้ำตาล มีลายแถบสีน้ำตาลหรือดำตลอดทั้งตัว

ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาจากการวัดสัดส่วนทั้งหมด 13 ลักษณะ เมื่อทดสอบด้วยสถิติพบว่าในไก่ป่าเพศผู้และเพศเมียมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในทั้ง 13 ลักษณะ และทดสอบด้วยสมการถดถอยเพื่อหาสมการทำนายอายุของไก่ป่าตุ้มหูแดงทั้งในเพศผู้และเพศเมีย พบว่าอัตราการเติบโตของลักษณะทั้ง 5 ลักษณะ สามารถใช้หาสมการทำนายอายุของไก่ป่าตุ้มหูแดงได้ดี

การเติบโตของแข้งมีความสัมพันธ์กับการเติบโตของไก่ป่า โดยสามารถแบ่งการเติบโตจากลักษณะความยาวของแข้งได้เป็น 3 ระยะ โดยระยะที่ 1 (1-10 สัปดาห์) พบว่าไก่ป่ามีการเติบโตอย่างรวดเร็วมาก ในระยะที่ 2 (11-24 สัปดาห์) อัตราการเติบโตไม่สม่ำเสมอมีการเพิ่มขึ้นและลดลงเป็นช่วง และในระยะที่ 3 (25-40 สัปดาห์) เป็นช่วงที่อัตราการเติบโตของแข้งลดลงจนเกือบคงที่

ภาควิชา ชีววิทยา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2552

497 2629623: MAJOR ZOOLOGY
KEYWORDS: MORPHOMETRIC / DESCRIPTIVE MORPHOLOGY / RED JUNGLEFOWL

THAPANA CHOICHAROEN: MORPHOLOGICAL CHANGES RELATED TO THE GROWTH OF RED JUNGLEFOWLS, *Gallus gallus spadiceus*, IN CAPTIVITY AT HUAI KHA KHAENG WILDLIFE BREEDING STATION. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. WINA MECKVICHAI, 101 pp.

Morphological changes related to the growth of the Red Junglefowl, *Gallus gallus spadiceus*, were studied using 19 descriptive and 13 morphometrical characteristics on a captive bred population during their first year of development. The results showed that the descriptive characteristics can be used for age classification, especially at the first (0 - 7 days old) and second (2 - 20 weeks old) growth periods, whilst the morphometrical characteristics were valid for age estimation in all three growth periods over the first year of life, but were more accurate in the second and the third (6 - 12 months old) periods. During the first growth period, the morphological characteristics changed rapidly. At the first molting the natal plumages changed to juvenile plumage during the second growth period and the sexes could be differentiated by the color pattern of the feathers and the comb. The second molting occurred when the chicks were twenty weeks old, when their juvenile plumage changed to that of the prenuptial plumage. In the third growth period, chicks began their third molting, changing from the prenuptial plumage to that of the nuptial plumage, and at this stage males become more colorful with a brighter color and more glossy plumage feathers at the neck, wing covert, back and tail. In addition, the male's red fleshy comb becomes enlarged in size, whilst in females, most of the plumage changed into a yellowish brown with mottled brown color, except for the neck feathers that have a dark-brown or black strip.

The 13 morphometrical characteristics were all significantly different ($p<0.05$) between age cohorts in both males and females, and were found to be positively correlated to the growth by nonlinear regression. This method can predict the age cohort in Red Junglefowls with 95 – 98% accuracy. Analysis of the tarsal growth rate revealed three distinct growth periods over the year. In first period (1 - 10 weeks old) the tarsal growth rate increased rapidly, but it fluctuated in the second period (11 - 24 weeks old), and became stable in the last period (24 - 40 weeks old).

Department : Biology Student's Signature Thapana Choicharoen

Field of Study : Zoology Advisor's Signature Wina Meckvichai

Academic Year : 2009

โครงการ CEB_D_12_2006

การแพร่กระจายของเต่าปูลู *Platysternon megacephalum* Gray, 1831 ในประเทศไทย และกรณีศึกษาสถานภาพประชากรและการจัดการด้านการอนุรักษ์ ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

นางเครือวัลย์ พิพัฒน์สวัสดิกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DISTRIBUTION OF THE BIG-HEADED TURTLE *Platysternon megacephalum* Gray, 1831 IN THAILAND AND A CASE STUDY ON POPULATION STATUS AND CONSERVATION MANAGEMENT AT CHIANG DAO WILDLIFE SANCTUARY, CHIANG MAI PROVINCE

Ms. Kruewan Pipatsawasdikul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Environmental Science
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2009
Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	DISTRIBUTION OF THE BIG-HEADED TURTLE *Platysternon megacephalum* Gray, 1831 IN THAILAND AND A CASE STUDY ON POPULATION STATUS AND CONSERVATION MANAGEMENT AT CHIANG DAO WILDLIFE SANCTUARY, CHIANG MAI PROVINCE
By	Ms Kruewan Pipatsawasdikul
Field of Study	Environmental Science
Thesis Advisor	Associate Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Harold K. Voris, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University
in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Graduate School
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Assistant Professor Charnwit Kositanont, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Harold K. Voris, Ph.D.)

..... Examiner
(Assistant Professor Art-ong Pradatsundarasar, Ph.D.)

..... External Examiner
(Anak Pattanavibool, Ph.D.)

เครือวัลย์ พิพัฒน์สวัสดิกุล: การแพร่กระจายของเต่าปูลู *Platysternon megacephalum* Gray, 1831 ในประเทศไทย และกรณีศึกษาสถานภาพประชากรและการจัดการด้านการอนุรักษ์ ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ (DISTRIBUTION OF THE BIG-HEADED TURTLE *Platysternon megacephalum* Gray, 1831 IN THAILAND AND A CASE STUDY ON POPULATION STATUS AND CONSERVATION MANAGEMENT AT CHIANG DAO WILDLIFE SANCTUARY, CHIANG MAI PROVINCE)
อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ. ดร. กำธร ธีรคุปต์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: Harold K. Voris, Ph.D., 99 หน้า.

การศึกษาการแพร่กระจายของเต่าปูลูในประเทศไทย ได้ดำเนินการตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2549 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2552 โดยทำการสำรวจตามลำห้วยบนภูเขาทั้งในและนอกพื้นที่ป่าอนุรักษ์ทั่วประเทศ ยกเว้นภาคใต้ พบว่าเต่าปูลูมีการแพร่กระจายอยู่ใน 10 ลุ่มน้ำหลักของประเทศไทย ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันตก ผลการศึกษาได้รายงานการพบเต่าปูลูในเขตลุ่มน้ำน่านซึ่งเป็นลุ่มน้ำใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานการพบเต่าปูลูมาก่อน และภายในจำนวน 10 ลุ่มน้ำข้างต้นนี้เป็นพื้นที่ใหม่ที่สำรวจพบเต่าปูลูจำนวน 22 พื้นที่ โดยพบที่ระดับความสูง 430-1,350 เมตรจากระดับน้ำทะเล ตามลำห้วยเล็กๆ ที่มีน้ำไหลแรงในป่าดิบแล้งและป่าดิบเขา ส่วนการศึกษาด้านสถานภาพประชากร การเคลื่อนที่ อาณาเขตที่อยู่อาศัยของเต่าปูลู และผลกระทบจากมนุษย์นั้น ได้ทำการศึกษาที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2549 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2552 โดยใช้วิทยุติดตามและการสัมภาษณ์ ผลการศึกษา พบว่าเต่าปูลูกระจายตัวอยู่ใกล้เคียงกัน มีเขตอาศัยซ้อนทับกันบ้าง มีรูปแบบการเคลื่อนที่ไม่แน่นอนภายในเขตอาศัย ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับ ขนาดที่อยู่อาศัย และรูปแบบการเคลื่อนที่ แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างความถี่ในการเคลื่อนที่ ของตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย (χ^2=18.96, p<0.001) และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างระยะทางที่เคลื่อนที่กับปริมาณน้ำฝนและอุณหภูมิ ส่วนการศึกษาผลกระทบของมนุษย์ต่อเต่าปูลู พบว่าความแตกต่างระหว่าง เพศ อายุ และระดับการศึกษา ของชุมชน มีผลต่อการคุกคามเต่าปูลูในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว อย่างมีนัยสำคัญ (χ^2=20.44, p<0.001; χ^2=96.58, p<0.001; χ^2=21.56, p=0.006) เช่นเดียวกับความร่วมมือด้านการอนุรักษ์ (χ^2= 6.58, p= 0.037; χ^2= 35.07, p<0.001; χ^2=47.19, p<0.001) การศึกษาครั้งนี้ได้เสนอแนะการจัดการด้านการอนุรักษ์ที่เหมาะสม และควรดำเนินการอย่างเร่งด่วน

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

497 24060 23: MAJOR ZOOLOGY

KEYWORDS: Amphibian, Diversity, Climatic factors, Khao Sip Ha Chan Preserve forest

PATCHARA DANAISAWAT: SPECIES DIVERSITY OF AMPHIBIAN IN KHAO SIP HA CHAN PROPOSED NATIONAL PARK, CHANTHABURI PROVINCE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. WICHASE KHONSUE, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. ATR-ONG PRADATSUNDARASAN, Ph.D., 156 pp.

The current study of amphibian diversity in Khao Sip Ha Chan Proposed National Park, Chanthaburi Province aimed to examine diversity of amphibian fauna, construct pictorial key, identify habitat preference and study relationship between the occurrence of amphibian fauna and climatic factors. In this study, species diversity and habitat information was obtained by visual encounter survey during January – December 2008. Species of amphibians were identified based on morphological characters. Climatic factors, such as air temperature, relative humidity and total rainfall were collected from the nearest meteorological station (station code 480007) in each month.

The result of this study revealed 2 orders, 7 families, 18 genus and 34 species of amphibian in 14 microhabitats of the study area with a diversity index (Shannon-Weiner Index) of 3.565. Among the amphibians found in this study, *Bufo macrotis* and *Rana taipehensis* are new records for eastern part of Thailand. It is also possible that a new morphotype of caecilian (*Icthyophis* sp.) in juvenile and adult stage is presented in the area.

The relationship between climatic factors and occurrence of amphibian as determined by Pearson and Spearman's correlation test showed that the number of individual was negatively correlated with rainfall ($p = 0.037$). However, the number of amphibian species showed no correlation with any climatic factors. The number of tadpole species in lowland was positively correlated with rainfall ($p = 0.041$), while the number of tadpole species in the stream was positively correlated with temperature ($p = 0.033$).

Department : Biology
Field of Study : Zoology
Academic Year : 2009

Student's Patchara Danaisawat
Advisor's Wich . K
Co-Advisor's Atr-ong Pradat

โครงการ CEB_D_14_2008

ความสัมพันธ์ระหว่างกรดแอบไซซิกและการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินภายใต้ความเครียดจากความเค็มในข้าว *Oryza sativa* L.

นางสาวสุชุมาภรณ์ แสงงาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	RELATIONSHIP BETWEEN ABSCISIC ACID AND CALMODULIN GENE EXPRESSION UNDER SALT STRESS IN RICE *Oryza sativa* L.
By	Miss Sukhumaporn Saeng-ngam
Field of Study	Biological Sciences
Thesis Advisor	Associate Professor Supachitra Chadchawan, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Teerapong Buaboocha, Ph.D.
	Professor Paisarn Sithigorngul, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Preeda Boon-Long, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Supachitra Chadchawan, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Teerapong Buaboocha, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Professor Paisarn Sithigorngul, Ph.D.)

..... Examiner
(Associate Professor Alisa Vangnai, Ph.D.)

..... External Examiner
(Associate Professor Jarunya Narangajavana, Ph.D.)

สุขุมาภรณ์ แสงงาม: ความสัมพันธ์ระหว่างกรดแอบไซซิกและการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินภายใต้ความเครียดจากความเค็มในข้าว *Oryza sativa* L. (RELATIONSHIP BETWEEN ABSCISIC ACID AND CALMODULIN GENE EXPRESSION UNDER SALT STRESS IN RICE *Oryza sativa* L.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.สุภจิตรา ชัชวาลย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ.ดร.ธีรพงษ์ บัวบูชา, ศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล, 170 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อความเครียดจากความเค็มผ่านกรดแอบไซซิกและยีนแคลมอดูลินในข้าว (*Oryza sativa* L.) (*OsCam1-1*) ในการศึกษานี้ใช้ข้าวสองคู่สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนเค็มต่างกันได้แก่ข้าวสายพันธุ์ไม่ทนเค็ม LPT123 และข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 และข้าวสายพันธุ์ไม่ทนเค็มขาวดอกมะลิ105 และข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม FL530-IL การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อกรดแอบไซซิกเพื่อตรวจวัดปริมาณกรดแอบไซซิกในข้าวในสภาวะเครียดจากความเค็มใช้แอนติเจนสองชนิดได้แก่กรดแอบไซซิกที่เชื่อมกับโปรตีน BSA ด้านคาร์บอนิลและกรดแอบไซซิกที่เชื่อมกับโปรตีน BSA ด้านคาร์บอกซิล พบว่าได้เซลล์ลูกผสมจำนวน 2 โคลนผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อกรดแอบไซซิกด้านคาร์บอกซิลและ 9 โคลนผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อกรดแอบไซซิกด้านคาร์บอนิล เซลล์ลูกผสมที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความไวสูงสุดกับกรดแอบไซซิกนำมาใช้พัฒนาการตรวจวัดกรดแอบไซซิกด้วยวิธี competitive ELISA โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถตรวจวัดปริมาณกรดแอบไซซิกในพืชได้ในช่วง 0.024–0.756 พิโคโมลต่อมิลลิลิตร ข้าวสายพันธุ์ LPT123 และสายพันธุ์ LPT123-TC171 มีการสะสมปริมาณกรดแอบไซซิกในระดับที่คล้ายกันซึ่งมีการสะสมกรดแอบไซซิกที่เห็นได้ชัดเจนหลังจากได้รับความเครียดจากความเค็มเป็นเวลา 6 ถึง 9 วัน โดยพบการสะสมกรดแอบไซซิกในปริมาณสูงสุดในวันที่ 9 นอกจากนี้ในข้าวสายพันธุ์ FL530-IL มีปริมาณกรดแอบไซซิกสูงกว่าข้าวขาวดอกมะลิ105 อย่างมีนัยสำคัญซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับของกรดแอบไซซิกไม่ได้เป็นปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการทนเค็มของข้าว การแสดงออกของยีนแคลมอดูลินในข้าวขาวดอกมะลิ105 เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์ FL530-IL พบว่าข้าวพันธุ์ FL530-IL มีการแสดงออกของยีน แคลมอดูลินในระดับที่เร็วกว่าและสูงกว่าข้าวขาวดอกมะลิ105 เมื่อได้รับภาวะเค็ม ซึ่งพบการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินสูงกว่าภาวะปกติ 24 เท่าในขณะที่การแสดงออกของยีนแคลมอดูลินในข้าวขาวดอกมะลิ 105 สูงขึ้นประมาณ 7 เท่าหลังจากได้รับความเค็ม 30 นาที ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินสูงตลอดเวลาภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *35SCaMV* มีผลต่อการแสดงออกของยีน 9-cis-*epoxycarotenoid dehydrogenase* (*NCED*) และยีน *ABA aldehyde oxidase* (*AAO*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแอบไซซิกในพืช ข้าวขาวดอกมะลิ105 ที่มีการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินสูงตลอดเวลามีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแอบไซซิก เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวในชุดควบคุมที่เป็นข้าวขาวดอกมะลิ105และข้าวทรานจีนิกส์ที่ไม่มีโครงสร้างของยีนที่มีการแสดงออกของยีน แคลมอดูลินเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ข้าวขาวดอกมะลิ105 ที่มีการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินสูงตลอดเวลาสามารถรักษาน้ำหนักแห้งของต้นได้ดีในภาวะเค็ม การศึกษาการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินโดยเชื่อมต่อกับยีนบีตา-กลูคูรอนิเดสซึ่งเป็นยีนรายงานผลภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีนแคลมอดูลินในข้าวขาวดอกมะลิ105 พบว่าการให้กรดแอบไซซิกจากภายนอกมีผลทำให้การแสดงออกของยีนแคลมอดูลินมากขึ้นและการให้สารยับยั้งการสังเคราะห์กรดแอบไซซิก (อบามีนเอสจี) มีผลยับยั้งการแสดงออกของยีนแคลมอดูลิน ในภาวะเค็มการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินถูกควบคุมโดยกรดแอบไซซิกในขณะเดียวกันการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินยังมีบทบาทในการควบคุมปริมาณกรดแอบไซซิกในข้าว ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากรดแอบไซซิกมีผลในการควบคุมการแสดงออกของยีนแคลมอดูลินและการส่งผ่านสัญญาณโดยแคลมอดูลินมีบทบาทต่อขบวนการสังเคราะห์กรดแอบไซซิกโดยแคลมอดูลินและกรดแอบไซซิกมีบทบาทควบคุมซึ่งกันและกัน ในการตอบสนองต่อภาวะเค็ม ระดับของแคลมอดูลินและกรดแอบไซซิกภายในเซลล์มีส่วนช่วยทำให้ข้าวมีความสามารถในการทนเค็มได้ดีขึ้น

สาขาวิชา....วิทยาศาสตร์ชีวภาพ.... ลายมือชื่อนิสิต..... สุขุมาภรณ์ แสงงาม

ปีการศึกษา..2552..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... สุภจิตรา ชัชวาลย์

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4773872723 : MAJOR OF BIOLOGICAL SCIENCES
KEYWORDS: ABA / calmodulin / calcium signaling / salt stress / *Oryza sativa* L.

SUKHUMAPORN SAENG-NGAM: RELATIONSHIP BETWEEN ABSCISIC ACID AND CALMODULIN GENE EXPRESSION UNDER SALT STRESS IN RICE *Oryza sativa* L. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPACHITRA CHADCHAWAN, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSIST. PROF. TEERAPONG BUABOOCHA, Ph.D., PROF. PAISARN SITHIGORNGUL, Ph.D., 170 pp.

This research aims to characterize the relationships of salt responses to salt stress via abscisic acid (ABA) accumulation and the expression of salt-responsive *calmodulin* gene (*OsCam1-1*) in rice (*Oryza sativa* L.). Two pairs of rice cultivars/lines, which are different in salt-tolerant ability were used in these studies. Leung Pra Tew (LPT123) and Khao Dok Mali 105 (KDML105) rice cultivars are considered salt-sensitive ones while their isogenic lines, LPT123-TC171 and FL530-IL, are salt tolerant. In order to determine the level of ABA accumulation due to salt stress, monoclonal antibody (MAb) against (+)-ABA was produced. Two types of (±)-ABA-BSA conjugate, one with free carboxyl and the other with free carbonyl terminal, were used as the antigens in the antibody production. Hybridoma lines were then selected for specificity against (+)-ABA which is the natural form of ABA in plants. There were 2 clones producing MAb against the carboxyl terminal and 9 clones producing MAb recognizing the carbonyl end. The clone with the highest sensitivity of MAb for (+)-ABA detection was chosen to develop the competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for ABA measurement. With this MAb, the endogenous ABA in the range of 0.024–0.756 pmol/ml could be detected. The ABA accumulation in rice leaves was clearly detected after 6–9 days after salt stress. The highest level of ABA content after salt stress in LPT123 and LPT123-TC171 was similar. The highest ABA was accumulated after 9 days of salt stress. On the other hand, FL530-IL rice showed the significant higher level of ABA accumulation than KDML105. These results suggest that the level of ABA accumulation may not the only factor that contributes to salt resistant ability in rice. *OsCam1-1* expression was studied in KDML105 and FL530-IL to investigate if it plays any roles in salt resistance. The faster and the higher response in *OsCam1-1* expression after salt stress were found in FL530-IL rice. A twenty-four-time higher level of *OsCam1-1* transcript was detected in the FL530-IL rice leaves after 30 minutes of salt stress, while only about seven times higher of the *OsCam1-1* transcript at the non-stress level was found in salt stress treated KDML105 cultivar at the same period of time. The transgenic KDML105 rice lines with over-expression of *OsCam1-1* was found to up-regulate the gene involving the ABA biosynthesis, *9-cis-epoxycarotenoid dehydrogenase* (*NCED*) and *ABA aldehyde oxidase* (*AAO*) genes, resulting in the higher level of ABA content in the transgenic lines, when compared to the wild type and the control transgenic lines without the over-expression construct. In addition, the over-expressing *OsCam1-1* transgenic plants were more tolerant to salt stress than the control plants as they exhibited better ability in maintaining shoot and root dry weights during salt stress. ABA actions on *OsCam1-1* promoter activity were investigated using the transgenic KDML105 rice containing β-*glucuronidase* gene regulated by *OsCam1-1* promoter. It was found that *OsCam1-1* promoter was activated by salt stress and exogenous ABA application. The ABA inhibitor, abamine SG, was found to inhibit *OsCam1-1* expression. These suggest that *OsCam1-1* expression was controlled by ABA during salt stress and at the same time ABA also played a role in *OsCam1-1* gene expression. These indicate that ABA is required for *OsCam1-1* expression and *OsCam1-1* signaling has an important role in the ABA biosynthesis. These two signal molecules regulate bidirectionally under salt stress response. The cellular level of both *OsCam1-1* gene expression and ABA accumulation contribute to salt resistance in rice.

Field of study...Biological sciences....
Academic year...2009.....

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature .....
Co-advisor's signature.....

ภาคผนวก ฉ

กลุ่มทางด้านพื้นฐาน
องค์ความรู้

CEB_M_50_2009

ชื่อ-นามสกุล นางสาวอาภาพรรณ ประกอบการ **เลขประจำตัว** 5072574123
หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** สัตววิทยา

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ความแปรผันทางสัณฐานของกิ้งก่ารั้ว *Calotes versicolor* (Daudin, 1802) ในประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Morphological variation of garden fence lizard *Calotes versicolor* (Daudin, 1802) in Thailand

(พิมพ์ด้วยอักษรตัวเล็ก ยกเว้นอักษรตัวแรกที่ขึ้นต้นประโยคและคำที่เป็นชื่อเฉพาะหรือตัวย่อ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. กำธร ธีรคุปต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. ธงชัย งามประเสริฐวงศ์

คำนำ

กิ้งก่ารั้ว *Calotes versicolor (Daudin, 1802)* เป็นกิ้งก่าชนิดที่มีการกระจายกว้างมาก พบได้ทั้งในเอเชียใต้ ไปจนถึงคาบสมุทรอินจีน โดยมักพบในบริเวณที่ที่มีคนอาศัยอยู่ Auffenberg และ Rehman (1993) ได้พบว่ากิ้งก่าชนิดนี้มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาในแต่ละพื้นที่ของประเทศปากีสถาน อัฟกานิสถาน และอินเดีย ทำให้การจัดจำแนกกิ้งก่าชนิดนี้ ได้แยกออกเป็น 2 ชนิดย่อย คือ *C. v. farooqi* และ *C. v. versicolor* นอกจากนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และชีววิทยาระดับโมเลกุล (Zug *et al.*, 2006) ของ *C. versicolor* ที่พบในประเทศพม่า ทำให้พบชนิดใหม่ 2 species คือ *C. htunwini* และ *C. irawadi* ส่วนในประเทศไทย พบว่ากิ้งก่ารั้วมีการกระจายอยู่เกือบทั่วทั้งประเทศ (Taylor, 1963) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของ *C. versicolor* ในประเทศไทยมีน้อยมาก พบเพียงข้อมูลจากรายงานการสำรวจและจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในตัวอย่างทางภาคเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย โดย Auffenberg และ Rehman ในปี 1993 แต่ตัวอย่างที่ศึกษามีจำนวนน้อยมากไม่สามารถนำมาสรุปผลได้ ทำให้การจัดจำแนกกิ้งก่ากลุ่มนี้ยังเป็นชนิดเดียวกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความแปรผันทางสัณฐาน จากลักษณะที่ได้จากการวัดขนาด (Mensural characters) การนับเกล็ด (Meristic characters) และรูปแบบของลวดลาย (Stripe patterns) ในกิ้งก่ารั้ว
2. เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างเพศ ในตัวเต็มวัยตัวผู้ และตัวเต็มวัยตัวเมีย ในกิ้งก่ารั้ว

วิธีการศึกษา

1) การเก็บตัวอย่าง

1.1 เก็บตัวอย่างกิ้งก่ารั้วในภาคเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย โดยเก็บภาคละ 60 ตัว ซึ่งแต่ละภาคแยกเก็บเป็น 3 กลุ่มประชากร กลุ่มประชากรละ 20 ตัว (เป็นตัวเต็มวัยตัวผู้ 10 ตัว และตัวเต็มวัยตัวเมีย 10 ตัว)

1.2 ในแต่ละตัว เก็บข้อมูลโดยการถ่ายภาพ ชั่งน้ำหนัก และทำการุณยฆาตโดยใช้ Thiopental Sodium (Close *et al.*, 1997) แล้วเก็บรักษาใน แอลกอฮอร์ 70% ตัวอย่างทั้งหมดจะเก็บในพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้ ส่วนของขนาดหัว พบเพียง 8 ลักษณะ จาก 14 ลักษณะที่ มีความแตกต่างกัน ทั้งภาคเหนือและภาคใต้ และต่างพบว่า ตัวผู้มีขนาดของหัวใหญ่กว่าในตัวเมีย นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของรยางค์และลำตัว ซึ่งพบ 8 ลักษณะที่แตกต่างกัน โดยพบว่า ในตัวผู้จะมีขนาดยาวกว่าในตัวเมีย
นอกจากนี้ ลักษณะ TailTh และ VentW ในตัวผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าในตัวเมีย ทั้ง 2 ประชากร นอกจากนี้ ขนาด TailL และ TL ในตัวผู้ พบว่ามีขนาดใหญ่กว่าในตัวเมีย โดยจะพบในภาคใต้เท่านั้น ขณะที่ขนาดของ TailW ได้พบว่าในตัวผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าในตัวเมีย เฉพาะภาคใต้ .แต่อย่างร็ตามขนาดของความยาวลำตัวในตัวเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าในตัวผู้

ผลจากการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่า มีความแตกต่างกัน ระหว่างตัวผู้และตัวเมีย ทั้งภาคเหนือและภาคใต้ อย่างชัดเจน

2.2 Meristic characters.—ความแตกต่างของจำนวนเกล็ดในตัวผู้ และตัวเมีย เห็นได้ไม่ชัดเจนเหมือน mensural characters แต่อย่างไรก็ตามยังแสดงให้เห็นว่า ตัวผู้จะมีจำนวนเกล็ดมากกว่าในตัวเมีย

ผลจากการวิเคราะห์ PCA แสดงให้เห็นว่า ทั้งประชากรทาง ภาคเหนือและภาคใต้ มีการซ้อนทับกันของลักษณะที่เกิดขึ้น

2.3 Stripe patterns.—ในตัวเมียทางเหนือจะมีสี DorsSt ForearSt NucSpot และ TrnkBand ที่ชัดเจนกว่าในตัวผู้ ส่วนในทางภาคใต้ จะมีลักษณะ DorsSt, ForearSt และ NucSpot ซึ่งพบมากในตัวเมีย ขณะที่ ThroatPa พบในตัวผู้มากกว่า

3. Geographic variation:

3.1 Mensural characters.—ค่าเฉลี่ยของ SVL ในตัวผู้ทางเหนือจะมีขนาดเล็กกว่าในตัวผู้ทางใต้ (ตัวผู้ภาคเหนือ = 84.11±0.96 mm และตัวผู้ทางภาคใต้ = 87.08±0.86 mm, t=2.296, p=0.025) แต่ในตัวเมียทางภาคเหนือจะมีขนาดใหญ่กว่าทางภาคใต้ (ตัวเมียภาคเหนือ = 78.67±0.99 มิลลิเมตร และตัวเมียทางภาคใต้ = 75.74±0.89 มิลลิเมตร t=-2.200, p=0.032).

ความแตกต่างของขนาดหัว พบเพียง 4 ลักษณะจาก 14 ลักษณะ ซึ่งจะพบทั้งในภาคเหนือและภาคใต้ ส่วนความแตกต่างของรยางค์ พบเพียง 2 ลักษณะ จาก 8 ลักษณะ ซึ่งจะพบในทั้ง 2 ประชากร โดยพบว่าในตัวผู้พบถึง 7 ลักษณะ แต่ในตัวเมีย พบเพียง 2 ลักษณะ

ส่วนขนาดลำตัวและหาง ไม่มีความแตกต่างกันทั้งในตัวผู้ และตัวเมีย แต่ TailL และ TL ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันใน 2 ประชากร

ผลจากการวิเคราะห์ PCA ได้แสดงให้เห็น ว่าไม่มีความแตกต่างของประชากร ทั้งในตัวผู้ และในตัวเมีย

3.2 Meristic characters.—จำนวนของเกล็ด พบว่าความแตกต่าง ไม่มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน บางลักษณะมีจำนวนมากในทางภาคเหนือ แต่บางลักษณะมีจำนวนมากในทางใต้

ผลจากการวิเคราห์โดยใช้ PCA แสดงให้เห็นว่าประชากรไม่มีความแตกต่างระหว่างภาคเหนือกับภาคใต้ เพราะกราฟไม่มีการแยกกลุ่มกัน

3.3 Stripe patterns.—ในตัวเมียจะไม่พบความแตกต่างของสี แต่ในตัวผู้พบเพียงความแตกต่างของ TrnkBand ($\square^2$=6.405, p=0.011) และลักษณะของ ThroatPa ($\square^2$=15.864, p<0.001) มักพบบ่อยทางภาคใต้

4. **สรุปผลและวิจารณ์**

4.1) ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาภายในภาค

4.1.1 ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของ *C. versicolor* ภายในภาคเหนือ

จากข้อมูลของ PCA แสดงให้เห็นว่าประชากรย่อยในภาคเหนือ ได้แก่ แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ และน่าน ไม่มีความแตกต่างกัน เพราะกราฟ PCA ได้แสดงข้อมูลของแต่ละตัวในประชากรนั้น แล้วพบว่าประชากรไม่แยกออกเป็นกลุ่ม จึงสรุปว่าเป็นประชากรเดียวกัน

จากผลการศึกษา พบว่าประชากรไม่มีความแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจาก ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างตั้งอยู่ในเส้นรุ้งที่ใกล้เคียงกัน คือ แม่ฮ่องสอน เส้นรุ้งที่ 2079323mN เชียงใหม่ เส้นรุ้งที่ 2084247mN และ น่าน เส้นรุ้งที่ 2078573mN เป็นสาเหตุทำให้ อุณหภูมิทั้ง 3 บริเวณมีค่าใกล้เคียงกัน คือ แม่ฮ่องสอน 26.18 °C เชียงใหม่ 26.21 °C และน่าน 26.45 °C การที่อุณหภูมิไม่แตกต่างกัน ทำให้ไม่มีผลให้อัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน เพราะถ้ามีความแตกต่างของอุณหภูมิ จะส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของกิ้งก่าชนิดนี้ โดย Radder (2006) ได้ศึกษาพบว่าประชากรกิ้งก่าชนิดนี้ ตัวเต็มวัยจากประเทศจีน มีขนาดเล็กกว่าตัวเต็มวัยจากอินเดีย เพราะประเทศจีนมีอุณหภูมิเฉลี่ยต่ำกว่าในประเทศอินเดีย (อุณหภูมิเฉลี่ยของจีนและอินเดียเป็น 23 องศาเซลเซียส และ 29 องศาเซลเซียส ตามลำดับ)

4.1.2 ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของ *C. versicolor* ภายในภาคใต้

จากข้อมูลของ PCA แสดงให้เห็นว่าประชากรย่อยในภาคใต้ ได้แก่ สงขลา ระนอง และ กระบี่ ไม่มีความแตกต่างกัน เพราะกราฟ PCA ได้แสดงข้อมูลของแต่ละตัวในประชากรนั้น แล้วพบว่าประชากรไม่แยกออกเป็นกลุ่ม จึงสรุปว่าเป็นประชากรเดียวกัน

การที่พบว่ามีความแตกต่างของอุณหภูมิเล็กน้อย น่าจะเป็นผลเนื่องมาจาก อิทธิพลของลมทะเล และลมมรสุม ตลอดทั้งปี

4.2) ศึกษาความแตกต่างระหว่างเพศ (Sexual dimorphism)

4.2.1 Mensural character

จากผลการศึกษาพบว่าขนาด SVL เฉลี่ย ขนาดหัว ขนาดลำตัว และลักษณะอื่นๆ โดยส่วนใหญ่ ในตัวผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าในตัวเมีย ทั้งประชากรในภาคเหนือ และในภาคใต้

ความแตกต่างระหว่างเพศ ของขนาดหัว และลำตัว ของ *C. versicolor* เคยมีรายงานการศึกษามาแล้ว โดย Ji *et al.* 2002; Radder *et al.* 2001; Radder 2006; Zug *et al.* 2006 ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ก็เช่นเดียวกัน ขนาดของหัวในตัวผู้จะใหญ่กว่าตัวเมีย แต่ขนาดลำตัวในตัวเมียจะใหญ่กว่าในตัวผู้ ซึ่งพบทั้งในภาคเหนือและภาคใต้ ของประเทศไทย

ขนาดของหัวที่ใหญ่กว่าในตัวผู้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการจับเหยื่อได้ดีกว่า และมีโอกาสประสบความสำเร็จในการแข่งขันเพื่อป้องกันอาณาเขต และมีโอกาสถูกเลือกโดยตัวเมียมากกว่า (Cooper & Vitt 1989; Hews 1996; Radder *et al.* 2001; Vitt & Cooper 1985).

ขนาดของลำตัวที่ยาวกว่าในตัวเมีย จะเพิ่มความสามารถในการบรรจุจำนวนไข่ได้มากกว่าตัวที่มีขนาดของลำตัวเล็ก (Vitt & Congdon 1978; Arak 1988; Shine 1992; Olsson *et al.* 2002).

ขนาดความหนาของหางในตัวผู้ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าในตัวเมีย เนื่องจากที่โคนหางตัวผู้จะเป็นตำแหน่งของ hemipenis ส่งผลให้ ในตัวผู้โคนหางจะหนากว่าในตัวเมีย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Radder *et al.*

(2001) แต่ การศึกษาของ Radder *et al.* (2001) ยังไม่ได้กล่าวถึงความแตกต่างของความยาวของหาง แต่จากการศึกษาในประเทศไทยพบความแตกต่างของความยาวหาง โดยตัวผู้หางจะยาวกว่าในตัวเมีย แต่พบเฉพาะในประชากรภาคใต้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Ji *et al.* (2002) ซึ่งได้ศึกษาที่ เมืองไหนาน ทางตอนใต้ของประเทศจีน การที่หางมีขนาดที่ยาวกว่าในตัวผู้ Ji *et al.* (2002) รายงานว่าจะเป็นการช่วยรักษาสมดุลของร่างกายขณะเคลื่อนที่ (Ji *et al.* 2002). Moreover, this result also showed larger VentW in males which may be related to TailTh size because VentW located on base of tail and available to hemipenis of males.

นอกจากนี้ ยังพบว่าตัวผู้มีระยางค์ที่มีขนาดยาวกว่าในตัวเมีย ซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการป้องกันอาณาเขตได้ดีขึ้น (Olsson *et al*, 2002) และยังพบว่า การมีโครงสร้างขาที่แข็งแรง ยังเป็นตัวช่วยเพิ่มความสามารถในการแข่งขันระหว่างตัวผู้ด้วยกันอีกด้วย

ความสัมพันธ์ของ SVL กับลักษณะอื่น จะแสดงออกมาในรูปแบบของ linear regression เพราะการเพิ่มของขนาดตัว จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับลักษณะอื่นๆ ยกเว้น HeadW และ SN.

4.2.2 Meristic character

ความแตกต่างระหว่างเพศของลักษณะ meristic นั้นพบค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับ mensural แต่ก็พบอยู่บางลักษณะที่เป็น sexual dimorphism ได้แก่

ความแตกต่างของจำนวนเกล็ดบริเวณหัว ระหว่างตัวผู้และตัวเมีย ยังไม่สามารถระบุได้ชัดว่าเพื่ออะไร แต่สามรถพบความแตกต่างได้ในส่วนของ HeadSTr and GuS on northern population and CanthR, and HeadSLn on southern population. โดยพบว่าตัวผู้จะมีจำนวนเกล็ดมากกว่าที่พบในตัวเมียทั้ง 2 ประชากร การที่พบเกล็ดมากกว่าในตัวผู้อาจเป็นเพราะตัวผู้มีขนาดใหญ่กว่าตัวเมีย แต่ไม่ทราบแน่ชัดว่าการที่มีเกล็ดมากกว่ามีประโยชน์อะไร

นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของจำนวนเกล็ด 4FingLm ของกิ้งก่าชนิดนี้ ความแตกต่างนี้น่าจะสัมพันธ์กับความสามารถในการเกาะยึดที่แตกต่างกัน ซึ่งจำนวนเกล็ด 4FingLm ที่มากกว่าในตัวผู้น่าจะมีความสามารถในการเกาะได้ดีกว่าในตัวเมีย โดยสอดคล้องกับ กิ้งก่าในตระกูล Anoles ที่ตัวผู้มีจำนวนเกล็ด 4FingLm มากกว่าตัวเมีย (Glossip & Losos 1997)

นอกจากนี้ ยังพบความแตกต่างของเกล็ดบริเวณท้อง (VentS) ระหว่างเพศ ในภาคเหนือ ความแตกต่างของเกล็ดบริเวณท้อง ก็ไม่ทราบชัดเจนเช่นกัน แต่อาจจะเป็นเพราะขนาดของตัวผู้ที่ใหญ่กว่าตัวเมียเช่นกัน

4.2.3 Stripe pattern

ความแตกต่างระหว่างเพศของ Coloration ใน *C. versicolor* ในช่วง breeding season มักพบว่าตัวผู้จะมีสีแดงที่คอสดกว่าในตัวเมีย ซึ่ง Holliday and Adler กล่าวว่าเพื่อ the bright red head of the male for it is a conspicuous social cue used to signal other merbers of its species

แต่การศึกษาครั้งนี้ได้พบว่ายังมีลักษณะอื่นอีกที่แตกต่าง ได้แก่ DorsSt, ForearSt and NucSpot ซึ่งพบทั้งภาคเหนือและภาคใต้ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นในกิ้งก่าชนิดอื่นที่เคยพบ โดยทั่วไปสามารถมาจากหลายสาเหตุ เช่น ต่างชนิด, ต่าง habitat, reproductive strategies เป็นต้น (Vercken et al, 2007; Stuart-fox and Ord, 2004; LeBes and Marshall, 2000)

Vercken *et al.* 2007 ได้กล่าวถึงในกิ้งก่า *Lacerta vivipara* ว่ามี Color variation เนื่องมาจากเพื่อ reproductive strategy ในตัวเมีย ส่วน coloration ใน *Ctenophorus ornatus* มีบทบาทเพื่อเป็น signaling and male choice (LeBes and Marshall, 2000).

แต่อย่างไรก็ตาม ความถี่ที่เกิดขึ้นบน DorsSt, ForearSt and NucSpot ระหว่างตัวผู้และตัวเมีย จากทางภาคเหนือและภาคใต้ *C. versicolor* น่าจะเป็นเพราะความผันทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวต่างกัน

4.3) ศึกษาความแตกต่างภายในเพศเดียวกัน ระหว่างภาคเหนือกับภาคใต้

4.3.1 Mensural character

จากการศึกษาความแตกต่างกันทางภูมิศาสตร์ ของลักษณะ mensural ในตัวผู้และตัวเมีย ระหว่างภาคเหนือกับภาคใต้ของประเทศไทย พบว่า ขนาดของหัว ระยางค์และหาง ในประชากรของตัวผู้ทางภาคใต้ จะมีขนาดใหญ่กว่าประชากรของตัวผู้ทางภาคเหนือ

Yamasaki *et al.* (2001) ได้ศึกษาความแตกต่างของจิ้งเหลน ซึ่งเป็นสัตว์เลื้อยคลานชนิดหนึ่ง โดยศึกษาความแตกต่างของประชากรที่เกิดขึ้นในพื้นที่ 2 บริเวณใหญ่ๆ คือ ระหว่างทางด้านตะวันออกของอินเดียทางใต้ของจีนและทางเหนือของไทย กับทางใต้ของพม่า และทางใต้ของไทย แล้วพบว่าขนาดของตัวผู้ทางใต้ของไทย มีขนาดของหัว และระยางค์ที่ใหญ่กว่าและยาวกว่าในกลุ่มประชากรทางเหนือ จากผลการศึกษาของ Yamasaki *et al.* จึงสอดคล้องกันกับในประชากรของกิ้งก่ารั้ว ซึ่งขนาดของประชากรตัวผู้ทางภาคใต้ที่จะมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ในทางภาคเหนือ

ความแตกต่างของตัวผู้ระว่างภาคเหนือและภาคใต้ของ *C. versicolor* สอดคล้องกับการศึกษาของ Radder (2006) ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิต่ำขนาดตัวเต็มวัยจะเล็กกว่า ตัวเต็มวัยที่อยู่ในอุณหภูมิสูงกว่า เพราะการเข้าสู่ระยะ mature เร็วจะเพิ่มโอกาสในการเพิ่มจำนวนประชากรในมากกว่า

แต่ผลที่เกิดขึ้นเหล่านี้ขัดแย้งกับโมเดลของ Adolph และPorter (1996) ซึ่งได้กล่าวว่ากลุ่มกิ้งก่าที่อายุเท่ากัน ตัวที่พบในที่อุณหภูมิต่ำกว่าขนาดตัวที่เข้าสู่ช่วงที่สืบพันธุ์ได้จะมีขนาดใหญ่กว่าตัวที่อยู่ในอุณหภูมิสูง เนื่องจากมันเจริญเติบโตช้ากว่า ทำให้การเข้าสู่ช่วงการเจริญพันธุ์ช้าด้วย

นอกจากนี้ความแตกต่างของขนาดหัวที่เกิดขึ้น จะส่งผลต่อความสามารถในการจับเหยื่อ ขนาดหัวที่ใหญ่กว่าย่อมสามารถจับเหยื่อที่มีขนาดใหญกว่าได้ ซึ่งจะส่งผลต่อขนาดของร่างกายให้มีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย (Karn *et al.* 2005) และความแตกต่างที่เกิดขึ้นยังพบในตัวเมียเช่นเดียวกัน ผลของความแตกต่างของขนาดหัวและระยางค์นี้ ยังมีประโยชน์เมื่อเกิดการแข่งขันระหว่างตัวผู้ (Olsson *et al.* 2002) โดยตัวผู้ที่ใหญ่กว่าและแข็งแรงกว่าจะสามารถได้ครอบครองอาณาเขตที่กว้างกว่า และจะถูกเลือกเข้าคู่ผสมพันธ์กับตัวเมียได้ดีกว่า จากผลการศึกษาพอจะสรุปได้ว่า ตัวอย่างทางใต้น่าจะเกิดการแข็งกันกันสูงกว่าทางเหนือ จนทำให้ได้ผลจากการถูกคัดเลือกจนได้ตัวที่มีขนาดใหญ่ไว้

4.3.2 Meristic character

ความแตกต่างของลักษณะ meristic ไม่สามารถเห็นได้ชัดเจนเหมือนลักษณะ mensural นอกจากนี้ความแตกต่างของเกล็ดใน *C. versicolor* สอดคล้องกันกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ค่อนข้างน้อย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Thorpe และ Baez (1993) ที่กล่าวถึงว่าความแปรผันของแต่ละลักษณะของเกล็ดใน *Gallotia stehlini* มีความสอดคล้องกันน้อยกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ เพราะว่าบางลักษณะเพิ่มขึ้นตามระดับความสูงน้ำทะเล แต่บางลักษณะจะเป็นในทางตรงกันข้าม

ความแตกต่างของเกล็ดบนบริเวณหัวระหว่างประชากรทางภาคเหนือกับทางภาคใต้ ในตัวผู้และตัวเมีย ได้แสดงให้เห็นว่า พบเพียงบางลักษณะที่แตกต่างกัน ในตัวผู้มีเพียง 3 ลักษณะจาก 8 ลักษณะ ที่แตกต่างกัน ส่วนในตัวเมียมีเพียง 4 ลักษณะจาก 8 ลักษณะที่แตกต่างกัน ความแตกต่างที่เหมือนกันทั้ง 2 เพศคือ SnS ซึ่งพบว่าจะมีจำนวนเกล็ดทางภาคใต้ มากกว่า แต่ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด แม้ว่าแต่ละลักษณะยังไม่ทราบแน่ชัดถึงสาเหตุของความแตกต่างของเกล็ดที่เกิดขึ้น แต่มันอาจจะเป็นไปได้ว่าเพราะว่าลักษณะทางนิเวศวิทยาที่ต่างกัน หรือเพราะลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน เนื่องจากต่างชนิดกัน

แม้ว่า Zug et al (2006) ได้ชี้ให้เห็นว่ารูปแบบการจัดเรียงตัวของเกล็ดบริเวณหัว ใน *Calotes versicolor* เดิม มีความแตกต่างกัน และเป็นลักษณะหนึ่งที่ชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างของ Clotes 2 ชนิดที่พบใหม่ ได้แก่ *C. htunwini* และ *C. irawadi* แต่การศึกษา *C. versicolor* ในประเทศไทยครั้งนี้ ยังไม่พบความแตกต่างของเกล็ดลักษณะนี้ระหว่างเหนือกับใต้ ทั้งตัวผู้และตัวเมีย ดังนั้นตัวอย่างจากประเทศไทยไม่น่าจะใช่ทั้ง 2 ชนิดในพม่า

ไม่พบความแตกต่างของเกล็ดบริเวณลำตัว (VentS) ซึ่งต่างกับ *G. stehlini* ที่พบความแตกต่างของเกล็ด VentS โดยความแตกต่างนี้สัมพันธ์กับ Habitate type (Thorpe และ Baez, 1993) แต่จากลักษณะของ Microhabitate ระหว่างภาคเหนือกับภาคใต้ ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ VentS ไม่แตกต่างกัน

ความแตกต่างของจำนวนเกล็ดบริเวณระยางค์ ยังพบว่าจำนวนเกล็ดของ 4ToeLm มีความแตกต่างระหว่างเหนือกับใต้ ทั้งในตัวผู้และตัวเมีย แต่พบความแตกต่างของเกล็ด 4FingLm เฉพาะในตัวเมีย ความแตกต่างของจำนวนเกล็ดอันนี้น่าจะสอดคล้องกับ Habitat type ที่มันอยู่เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับใน *G. stehlini* เช่นเดียวกันด้วย (Thorpe และ Baez, 1993)

ดังนั้นแล้ว Both habitat type and altitude have been suggested as the cause of morphological variations (Thorpe & Baez 1993). Additionally, climate is thought to influence both the number and the size of scales (Soule & Kerfoot 1972). In dry environments, many small scales are preferred because the higher surface area of large scales in will increase the desiccation potential.

4.2.3 Stripe pattern

ความแตกต่างของลักษณะที่เป็น Stripe pattern นี้จะพบเฉพาะในตัวผู้ระหว่างภาคเหนือกับภาคใต้ แต่ไม่พบความแตกต่างในตัวเมีย ความแตกต่างที่เกิดขึ้นในตัวผู้นี้ พบเพียงลายบริเวณหัว (Thrp) และลายบนลำตัว (Trb)

แม้ว่าความแตกต่างของลาย สามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ ไม่ว่าจะเป็น Habitat type หรือ Climate แต่อย่างไรก็ ตามการศึกษาครั้งนี้ *C. versicolor* ยังไม่สามารถระบุสาเหตุได้แน่ชัด

Stuart-Fox และ Ord (2004) ได้กล่าวถึง ความแตกต่างของ colorlation และ ornamentation ว่า มักได้รับอิทธิพลจาก sexual selection และ natural selection โดยมีลักษณะของ habitat type เป็นตัวทำให้เกิดความแตกต่างของ colorlation และ ornamentation พบว่าในกรณีที่กิ้งก่าอยู่ใน close habitat มักจะทำสีตัวให้เด่น เพื่อสามารถมี efficient commumication ซึ่งมักเห็นชัดในตัวผู้ หรือบางครั้งพบว่า ใน open habitat สีตัวไม่ควรเด่น เพื่อป้องกันตัวจากผู้ล่า ทำให้สีตัวระหว่างตัวผู้และตัวเมียไม่แตกต่างกันมากนัก

The climate may influence the balance between selection for signaling coloration for sexual/territorial purposes and natural selection for crypsis (Thorpe & Brown 1989a).

In summary, although, these populations are not strongly differentiated, there are differences between the two (northern and southern) regions within Thailand. Thus, detailed studies on population genetics should be conducted in the future.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จะเป็นพื้นฐานในการศึกษา เพื่อจัดจำแนกสถานะภาพของ *Calotes versicolor* ในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

Angsirijinda, W. (1999) *Ecology and morphology of garden water dragon* Physignathus cocincinus *in Thailand*. Chulalongkorn University, Bangkok, 123 pp.

Arak, A. (1988) Sexual dimorphism in body size: a model and a test. *Evolution*, 42(4), 820–825.

Auffenberg, W. & Rehman, H. (1993) Studies on Pakistan reptiles. pt. 3. *Calotes versicolor*. *Asiatic Herpetological Research*, 5, 14–30.

Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E-M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D. & Warwick, C. (1997) Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 2. *Laboratory Animals*, 31, 1–32.

Cooper, W.E., Jr. & Vitt, L.J. (1989) Sexual dimorphism of head and body size in an iguanid lizard: paradoxical results. *The American Naturalist*, 133, 729–735.

Cox, M.J., van Dijk, P.P., Nabhitabhata, J. & Thirakhupt, K. (1998) *A photographic guide to snakes and other reptiles of Peninsular Malaysia*. Singapore and Thailand, New Holland, London, 144 pp.

Karn, D.R., Murphy, J.C., Voris, H.K. & Suddeth, J.S. (2005) Comparison of semi-aquatic snake communities associated with the Khorat Basin, Thailand. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*, 5(2), 73–90.

Erdelen, W. (1984) The genus *Calotes* (Sauria, Agamidae) in Sri Lanka: distribution patterns. *Journal of Biogeography*, 11, 515–525.

Glossip, D. & Losos, J.B. (1997) Ecological correlations of number of subdigital lamellae in Anoles. *Herpetologica*, 53(2), 192–199.

Hews, D.K. (1996) Size and scaling of sexually-selected traits in the lizard, *Uta palmeri*. *Journal of Zoology*, 238(4), 743–757.

Ji, X., Qiu, Q-B. & Diong, C.H. (2002) Sexual dimorphism and female reproductive characteristics in the oriental garden lizard, *Calotes versicolor*, from Hainan, southern China. *Journal of Herpetology*, 36(1), 1–8.

Olsson, M., Shine, R., Wapstra, E., Ujvari, B. & Madsen, T. (2002) Sexual dimorphism in lizard body shape: The roles of sexual selection and fecundity selection. *Evolution*, 56(7), 1538–154.

โครงการ CEB_M_51_2009

CEB_M_51_2009

ชื่อ-นามสกุล นาย ชัยสุภา อินทรประพงศ์ **เลขประจำตัว** 50726066
หลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต **สาขาวิชา** สัตววิทยา

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ความสามารถด้านการสืบพันธุ์ของเต่าแก้มแดง *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1839) ในบ่อเลี้ยง ณ จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Reproductive capability of red-eared slider turtles Trachemys scripta elegans (Wied-Neuwied, 1839) *in captivity at Pathum Thani Province, Thailand*

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. กำธร ธีรคุปต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. วรัญญา อรัญวาลัย

คำนำ

ข้อมูลของเต่าแก้มแดง *Trachemys scripta elegans* (Schoepff, 1792) ในถิ่นกำเนิดในประเทศสหรัฐอเมริการะบุว่า เต่าชนิดนี้เป็นเต่าน้ำจืดขนาดกลางเมื่อโตเต็มที่มีความยาวกระดองหลังประมาณ 12–30 เซนติเมตร โดยเต่าเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเต่าเพศผู้ และเข้าสู่ช่วงโตเต็มวัยเมื่ออายุราว 3–5 ปี

เต่าแก้มแดงสามารถปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมใหม่ได้เป็นอย่างดี ทำให้สามารถอยู่รอดและสืบพันธุ์ได้ในระบบนิเวศแหล่งน้ำหลายประเภท เช่น บ่อ คลอง และแม่น้ำ เป็นต้น จนก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศในแหล่งน้ำตามมาในภายหลังได้ ดังที่พบรายงานว่าเต่าแก้มแดงทำให้อัตราการอยู่รอดของเต่ายุโรป (*Emys orbicularis*) ลดลงเนื่องจากเต่าแก้มแดงไปแก่งแย่งแข่งขันในการหาอาหาร และการใช้พื้นที่[1] นอกจากนี้ได้มีรายงานการรุกรานของเต่าแก้มแดงในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศต่างๆ ได้แก่ ประเทศฝรั่งเศส[2] ประเทศไต้หวัน[3] ประเทศโคลัมเบีย[4] ประเทศออสเตรเลีย[5] และประเทศลัตเวีย[6] เป็นต้น ด้วยเหตุนี้เต่าแก้มแดงจึงถูกจัดให้เป็นเต่าที่มีรายงานว่าเป็นชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานมากที่สุดในปัจจุบัน[7]

ประเทศไทยเคยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีการนำเข้าเต่าแก้มแดงจากประเทศญี่ปุ่นเพื่อเป็นสัตว์เลี้ยงมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2517 จนกระทั่งปัจจุบันคาดกันว่ามีประชากรเต่าแก้มแดงอยู่อาศัยแทนที่เต่าพื้นเมืองของไทยเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะในแหล่งน้ำตามที่สาธารณะในเมืองใหญ่ ซึ่งหากมีการแพร่กระจายออกไปสู่แหล่งน้ำธรรมชาติภายนอก อาจทำให้สถานภาพของเต่าพื้นเมืองน่าเป็นห่วงในอนาคต[8] ด้วยเหตุนี้สำนักความหลากหลายทางชีวภาพ (2551) จึงพิจารณาให้เต่าแก้มแดงถูกจัดอยู่ในทะเบียนชนิดพันธุ์สัตว์ต่างถิ่นที่ควรป้องกัน ควบคุม และกำจัดของประเทศไทย[9] แม้ว่ายังไม่มีรายงานทางวิชาการเกี่ยวกับความสามารถด้านการสืบพันธุ์ในประเทศไทยก็ตาม

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสามารถด้านการสืบพันธุ์ของเต่าแก้มแดงในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

การเตรียมสถานที่ทดลองและวัสดุฟัก

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้พื้นที่เกษตรกรรม รังสิต บริเวณคลอง 7 อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี พิกัดภูมิศาสตร์ที่ 0690000 mE 1553900 mN และสูงจากระดับน้ำทะเล 17 เมตร สภาพดินโดยทั่วไปเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย (sandy clay loam) โดยบริเวณดังกล่าวเป็นพื้นที่ที่เต่านา *Malayemys macrocephala* (Gray, 1859) ซึ่งเป็นเต่าน้ำจืดพื้นเมืองของไทยใช้ในการสืบพันธุ์และวางไข่

สร้างบ่อเลี้ยงจำนวน 2 บ่อ ขนาดบ่อละ 4.5 x 4.0 ตารางเมตร ซึ่งแต่ละบ่อจะมีสัดส่วนพื้นที่ของน้ำและดินเป็น 1:1 ในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น นอกจากนี้ได้เตรียมกล่องพลาสติก ขนาด 10 x 15 x 20 ลูกบาศก์เมตร ผสมดินและทราย อัตราส่วน 1:1 และความชื้น 30 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นวัสดุฟัก[10] สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบความสำเร็จในการฟักในบ่อเลี้ยงกับในวัสดุฟักต่อไป

การศึกษาความสามารถด้านการสืบพันธุ์

เตรียมเต่าแก้มแดงเพศผู้และเพศเมีย วัยเจริญพันธุ์ (รูปที่ 2) อย่างละ 12 ตัว รวมทั้งหมด 24 ตัว จากฟาร์มเพาะเลี้ยง ในจังหวัดราชบุรี จากนั้นทำการแบ่งเต่าทั้งหมดออกเป็น 2 ชุดการทดลอง อย่างละเท่าๆ กัน โดยเป็นเต่าเพศผู้ 6 ตัว และเต่าเพศเมีย 6 ตัว รวม 12 ตัว ต่อ 1 ชุดการทดลอง ทั้งนี้การแบ่งเต่าออกเป็น 2 ชุดการทดลองเพื่อความสะดวกในการเก็บข้อมูล และไม่เป็นการรบกวนสัตว์ทดลอง

นำเต่าจากชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ไปเลี้ยงในบ่อที่ 1 และบ่อที่ 2 ที่เตรียมไว้ตามลำดับ โดยขนาดของเพศผู้และเพศเมียของทั้ง 2 ชุด ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) โดยเต่าในบ่อที่ 1 จะใช้สำหรับศึกษาการฟักตามสภาพธรรมชาติ และบ่อที่ 2 จะใช้สำหรับศึกษาการฟักไข่โดยใช้วัสดุฟักต่อไป

ตารางที่ 1 ขนาดของเต่าเพศเมีย และเพศผู้ที่ใช้ในการทดลอง

เพศเมีย	**บ่อที่ 1 (n = 6)**	**บ่อที่ 2 (n = 6)**	**p value**
ความกว้างกระดองหลัง (ซม.)	21.0 ± 1.9	21.4 ± 0.9	0.2
ความยาวกระดองหลัง (ซม)	23.3 ± 2.5	22.4 ± 1.2	0.1
น้ำหนักตัว (กิโลกรัม)	1.5 ± 0.3	1.6 ± 0.2	0.5
เพศผู้	**บ่อที่ 1 (n = 6)**	**บ่อที่ 2 (n = 6)**	**p value**
ความกว้างกระดองหลัง (ซม.)	15.5 ± 0.8	16.1 ± 1.4	0.4
ความยาวกระดองหลัง (ซม)	17.9 ± 1.6	18.6 ± 1.6	0.4
น้ำหนักตัว (กิโลกรัม)	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.4

จากนั้นทำการบันทึกข้อมูลความสามารถด้านการสืบพันธุ์ของเต่าแก้มแดง คือ ช่วงเวลาตั้งแต่มีการเกี้ยวพาราสีจนถึงวางไข่ ความลึกของรัง จำนวนของไข่ภายในรัง ขนาดของไข่แต่ละฟอง อัตราและระยะเวลาในการฟักของไข่ในรัง และในวัสดุฟัก ควบคู่ไปกับการ บันทึกข้อมูล ปัจจัยทางกายภาพ คือ pH อุณหภูมิ และความชื้นของดินในรัง และในวัสดุฟัก ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา 1 ปี

การเปรียบเทียบความสำเร็จในการฟักในบ่อเลี้ยง กับในวัสดุฟัก

เมื่อทำการศึกษาอัตราการฟักเป็นตัวของเต่าแก้มแดง พบว่าในรังที่มีค่า pH เท่ากับ 7 อุณหภูมิเฉลี่ย 28.4 ± 2.1 องศาเซลเซียส ความชื้นเฉลี่ย 62.8 ± 20.8 % มีอัตราการฟักเป็นตัวเฉลี่ย 13.5 % และระยะเวลาในการฟักเป็นตัวเฉลี่ย คือ 97 วัน โดยไข่ที่ฟักในรังส่วนใหญ่จะเน่าเสีย มีเชื้อรา และมีบางส่วนที่สามารถพัฒนาเป็นตัวได้บ้าง แต่ไม่สามารถขุดดินขึ้นมาภายนอกรังได้ ทำให้ตัวอ่อนตายภายในรัง จึงมีเพียงรังเดียวที่ลูกเต่าสามารถฟัก และออกมาภายนอกรังได้ ส่วนอัตราการฟักเป็นตัวในวัสดุฟักที่มีค่า pH เท่ากับ 7 อุณหภูมิเฉลี่ย 28.7 ± 1.4 องศาเซลเซียส ความชื้นเฉลี่ย 30.0 ± 0.0 % มีอัตราการฟักเป็นตัวเฉลี่ย 92.1 % และระยะเวลาในการฟักเฉลี่ยเป็น 57 วัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบ pH ความชื้น จำนวนไข่ในรัง และอัตราการฟักเป็นตัวของเต่าแก้มแดงระหว่างชุดที่ฟักเองตามธรรมชาติ และในวัสดุฟัก

ชุดการทดลอง	pH	ความชื้น	อุณหภูมิ	อัตราการฟักเป็นตัว (%)
ฟักเองตามธรรมชาติ (n = 37)	7.0 ± 0.3	62.8 ± 20.8	28.4 ± 2.1	13.5
ฟักในวัสดุฟัก (n = 43)	7.0 ± 0.0	30.0 ± 0.0	28.7 ± 1.4	92.1

นอกจากนี้ขนาดของไข่มีความกว้างเฉลี่ย 2.3 ± 0.1 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ย 3.5 ± 0.2 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 10.7 ± 1.0 กรัม และมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแรกเกิดของลูกเต่าต่อน้ำหนักไข่ที่ฟักเองตามธรรมชาติ และในวัสดุฟัก เท่ากับ 83.2 % และ 69.9 % ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ขนาดตัวของลูกเต่า กับขนาดของไข่ที่ฟักเองตามธรรมชาติ และในวัสดุฟัก

ชุดการทดลอง	น้ำหนักไข่ (กรัม)	น้ำหนักลูกเต่าแรกเกิด (กรัม)	% น้ำหนักแรกเกิด/น้ำหนักไข่
ฟักในธรรมชาติ (n = 37)	9.5 ± 0.6	7.9 ± 0.7	83.2
ฟักในวัสดุฟัก (n = 43)	11.3 ± 2.1	7.9 ± 1.5	69.9

สรุปผลและวิจารณ์

จากข้อมูลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า ขนาดของเต่าที่ใกล้เคียงกัน เต่าแก้มแดงในประเทศไทยมีช่วงฤดูสืบพันธุ์ที่ยาวนานกว่าในถิ่นกำเนิดถึง 3 เดือน มีขนาดความกว้าง ความยาว และน้ำหนักของไข่ใกล้เคียงกับในถิ่นกำเนิด แต่จำนวนไข่ต่อรัง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวแรกเกิดของลูกเต่าที่ฟักเองตามธรรมชาติสูงกว่าในถิ่นกำเนิด นอกจากนี้อัตราการฟักเป็นตัวของไข่เต่าแก้มแดงในธรรมชาติมีค่าต่ำกว่าอัตราการฟักเป็นตัวของถิ่นกำเนิด และใช้ระยะเวลาในการฟักเป็นตัวมากกว่าในถิ่นกำเนิด ซึ่งสาเหตุอาจมาจากสถาพแวดล้อมของประเทศไทยแตกต่างจากถิ่นกำเนิด โดยมีอุณหภูมิ และความชื้นเฉลี่ยที่สูงกว่าในถิ่นกำเนิดทำให้ไข่ที่ฟักในธรรมชาติมีความชื้นสูงกว่า ส่งผลให้อัตราการฟักต่ำ ทั้งนี้การศึกษาด้านการสืบพันธุ์ของเต่าแก้มแดงในอนาคตนั้นควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างเต่าแก้มแดงที่ใช้ในการศึกษา และทำการศึกษาในบริเวณอื่นๆด้วย เพื่อที่จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ของเต่าแก้มแดงในประเทศไทยที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และใช้ประกอบประกอบในการจัดการเรื่องชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานอย่างมีประสิทธิภาพในประเทศไทยต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบข้อมูลเรื่องความสามารถด้านการสืบพันธุ์ของเต่าแก้มแดง เพื่อที่จะนำไปใช้ในการจัดการกับผลกระทบที่จะเกิดขึ้นจากการรุกรานของเต่าชนิดนี้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Cadi, A. and Joly, P. 2004. Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Biodiversity and Conservation*, 13: 2511–2518.
2. Cadi, A., Delmas, V., Julliard, A., Joly, P., Pieau, C., and Girondot, M. 2004. Successful reproduction of the introduced slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) in the South of France. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystem*, 14: 237-246.
3. Chen, T. H. 2005. Distribution and status of the introduced red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in Taiwan. *National Museum of Marine Science and Technology*.
4. Bunnel, C. G. 2005. Field survey of red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) in the Lower Fraser River Valley, British Columbia. *Wildlife Afield*, 54: 51 - 57.
5. Bergin, S. 2006. Confirmation of an established population of exotic turtles in urban Sydney. *Australian Zoologist*, 33: 379 - 384.
6. Pupins, M. 2007. First report on recording of invasive species *Trachemys scripta elegans*, a potential competitor of *Emys* orbicularis in Latvia. *Acta Universitatis Latviensis*, 723: 37–46.
7. Ovaska, K., Sopuck, L., Engelstoft, C., and Matthias, L. 2004. Best management practices for amphibians and reptiles in urban and rural environments in British Columbia. *WLAP BMP Series*, pp.62.
8. Nijman, V. and Shepherd, C. R. 2007. Trade in non-native, CITES-listed, wildlife in Asia, as exemplified by the trade in freshwater turtles and tortoises (Chelonidae) in Thailand. *Contributions to Zoology*, 76(3): 207-211.
9. สำนักความหลากหลายทางชีวภาพ. 2551. ทะเบียนชนิดพันธุ์สัตว์ต่างถิ่นที่ควรป้องกัน ควบคุม และกำจัดของประเทศไทย. *สำนักนโยบาย และแผนทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม*. (อัดสำเนา)
10. Janzen, F. J. and Morjan, L. 2002. Egg Size, Incubation Temperature, and Posthatching Growth in Painted Turtles (*Chrysemys picta*). *Journal of Herpetology*, 36: 308–311.
11. Ernst, C. H., Barbour, R. W., and Lovich, J. E. 1994. *Turtles of the United States and Canada*. Smithsonian Institution Press. pp. 298 – 316.

โครงการ CEB_M_53_2010

CEB_M_53_2010

ชื่อ-นามสกุล นางสาวดวงใจ ตั้งมั่นในธรรม **เลขประจำตัว** 5272309423
หลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต **สาขาวิชา** พฤกษศาสตร์

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

การศึกษาอนุกรมวิธานของ *Hoya siamica* ชนิดเชิงซ้อนในประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Taxonomic study of the *Hoya siamica* complex in Thailand

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. มานิต คิดอยู่
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี

คำนำ

Hoya siamica Craib เป็นพืชอิงอาศัยจำแนกอยู่ในวงศ์ Asclepidaceae เนื่องจากมีความแปรผัน (variation) ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาสูง ทั้งโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (reproductive structure) และโครงสร้างที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์ (vegetative structure) เช่น รูปร่างของใบ ลักษณะของกระบังรอบ (corona) สีดอก และขนาดของส่วนต่าง ๆ เป็นต้น นอกจากนี้คำบรรยายลักษณะดั้งเดิมยังไม่ครอบคลุมลักษณะของ *Hoya siamica* ที่พบในปัจจุบัน จึงทำให้มีสถานะทางอนุกรมวิธาน (taxonomic status) ที่ไม่ชัดเจน ทำให้เกิดความสับสนในการจำแนก (classification) และการระบุชื่อชนิด (species identification) จึงถูกจัดให้เป็นพืชชนิดเชิงซ้อน *Hoya siamica* complex อีกทั้งยังไม่มีรายงานที่สมบูรณ์เกี่ยวกับการกระจายพันธุ์ของพืชชนิดนี้ที่ครอบคลุมพื้นที่ในประเทศไทย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาค เรณูวิทยาและข้อมูลเชิงโมเลกุล ของ *Hoya siamica* ชนิดเชิงซ้อนในประเทศไทย เพื่อระบุขอบเขตของชนิดและสถานะทางอนุกรมวิธานที่ชัดเจนและคลอบคลุมความหลากหลายของ *Hoya siamica* ชนิดเชิงซ้อนในประเทศไทย รวมทั้งจัดทำรูปวิธานในระดับชนิด (Key to species) และเขียนคำบรรยายหน่วยอนุกรมวิธานระดับชนิดของ *Hoya siamica* ชนิดเชิงซ้อนในประเทศไทย

วัตถุประสงค์

เพื่อระบุขอบเขตของชนิดและสถานะทางอนุกรมวิธาน โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาค เรณูวิทยาและข้อมูลเชิงโมเลกุลของ *Hoya siamica* ชนิดเชิงซ้อนในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาเอกสารทางพฤกษอนุกรมวิธานและศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับ *Hoya siamica*
2. สำรวจและรวบรวมตัวอย่างพันธุ์ไม้ในภาคสนาม

โดยเก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้ให้ครอบคลุมพื้นที่การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยซึ่งมีความสูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,000 เมตรขึ้นไปได้แก่พื้นที่บริเวณน้ำตกห้วยยาง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภูหลวง จังหวัดเลย ดอยสุเทพและดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ เขาใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยถ่ายภาพตัวอย่างและถิ่นที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ รวมทั้งจดบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ที่พบในสภาพธรรมชาติ โดยแบ่งตัวอย่างพันธุ์ไม้ที่เก็บมาแต่ละต้นออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำมาทำตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพโดยการทำตัวอย่าง

แห้งและหรือตัวอย่างดองใน 70% แอลกอฮอล์ ส่วนที่สองนำมาปลูกเลี้ยงในเรือนต้นไม้ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยศึกษาทั้งโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ และโครงสร้างที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์ ทั้งในเชิงคุณภาพและในเชิงปริมาณด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

4. ระบุชนิดของตัวอย่างพันธุ์ไม้ที่เก็บมาจากภาคสนามโดยใช้รูปวิธาน

พร้อมทั้งนำไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพทั้งตัวอย่างแห้งและหรือตัวอย่างดองที่มีอยู่ในพิพิธภัณฑ์พืชและหรือหอพรรณไม้ต่างๆ ในประเทศไทย เช่น พิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์ กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (BCU) หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช (BKF) เป็นต้น

5. ศึกษาลักษณะทางกายวิภาค

โดยใช้วิธีของ Ruzin ในปี ค.ศ. 1999

5.1 ลักษณะทางกายวิภาคของลำต้นและใบ

คัดเลือกตัวอย่างลำต้นและใบที่สมบูรณ์และเจริญเต็มที่มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่ในน้ำยารักษาสภาพ (Formaline Acetic acid Alcohol: FAA) แล้วนำมาตัดตามภาคตัดขวาง ด้วยเครื่องไมโครโตม แล้วจัดเตรียมเป็นสไลด์ถาวรและนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกภาพ เขียนบรรยายและเปรียบเทียบลักษณะทางกายวิภาคของตัวอย่างพันธุ์ไม้

5.2 ลักษณะทางกายวิภาคของเนื้อเยื่อผิว (Epidermal characters)

คัดเลือกตัวอย่างใบที่สมบูรณ์และเจริญเต็มที่มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่ใน KOH 10% จากนั้นนำไปอุ่นบน water bath ประมาณ 30 นาที ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น ใช้พู่กันและเข็มเขี่ยลอกผิวใบออกมาย้อมด้วยสี safranin O จัดเตรียมเป็นสไลด์ถาวรและนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ศึกษาลักษณะของปากใบ จำนวนปากใบ เซลล์เนื้อเยื่อผิวอื่น ๆ และบันทึกภาพ

6. ศึกษาข้อมูลด้านเรณูวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชุดกลุ่มเรณู (pollinarium) ของตัวอย่างพันธุ์ไม้ที่เก็บมาจากพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย โดยเน้นไปที่ลักษณะของ corpusculum, translator และรูปร่างของกลุ่มเรณู (pollinia) ทั้งในเชิงคุณภาพและในเชิงปริมาณ โดยจัดทำสไลด์ถาวรและนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และบันทึกภาพ

7. จัดจำแนกตัวอย่างพันธุ์ไม้ออกเป็น Form

นำข้อมูลที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 1–6 มาใช้ในการจัดจำแนกตัวอย่างพันธุ์ไม้ออกเป็น Form (Morphological form)

8. ศึกษาข้อมูลเชิงโมเลกุล

คัดเลือกตัวอย่างใบที่สมบูรณ์และเจริญเต็มที่มาสกัดดีเอ็นเอ โดยคัดเลือกจากตัวอย่างพันธุ์ไม้ ให้ครอบคลุมพื้นที่การกระจายพันธุ์และ Form ที่จัดได้จากข้อ 7 โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Qiagen DNeasy Plant Mini kit ศึกษาความหลากหลายของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และ restriction fragment length polymorphism (RFLP) ตามวิธีของ Tsumura และคณะ(1996) โดย

ใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะกับคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเออย่างน้อย 5 ไพรเมอร์ (Grivet *et al.*, 2001) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) อย่างน้อย 5 เอนไซม์

9. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการศึกษา จัดทำรูปวิธานและเขียนคำบรรยายหน่วยอนุกรมวิธานในระดับชนิด อภิปรายและสรุปผลการศึกษารวมทั้งจัดทำรูปวิธานในระดับชนิด (Key to species) และเขียนคำบรรยายหน่วยอนุกรมวิธานระดับชนิดที่ครอบคลุมความหลากหลายของ *Hoya siamica* ในประเทศไทย

10. เขียนรูปเล่มวิทยานิพนธ์ จัดทำตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพ

นำตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพและสไลด์ถาวรทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษามาจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์ กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสูง ทั้งโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (reproductive structure) และโครงสร้างที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์ (vegetative structure)ของ *Hoya siamica* Craib ซึ่งมีความแปรผัน (variation) ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สูงมากนั้นพบว่าสามารถแบ่งออกเป็น Form ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาวิทยาได้ 5 Form โดยใช้ลักษณะของ leave shape, venation, corona shape, pollinium และ corpusculum shape โดยสามารถจัดทำรูปวิธานในระดับชนิดได้ดังนี้

Key to Forms of the *Hoya Siamica* Craib in Thailand

1A. Lateral vein obscure, corpusculum shape broadly ovate ..... Form I

1B. Lateral vein conspicuous, groove, corpusculum shape arrow head

2A. Corona shape ovate, outer angle obtuse

3A. Leaves shape oblong ..... Form II

3B. Leaves shape lanceolate or oblanceolate ..... Form III

2B. Corona shape elliptic-obovate, outer angle acute

4A. Leaves shape lanceolate ..... Form IV

4B. Leaves shape elliptic ..... Form V

คำบรรยายลักษณะประจำ Form

Form I

Leaves succulently and thickly coriaceous, glabrous, elliptic-narrowly lanceolate, apex narrowly acute, base cuneate, midrib groove on the upper surface, lateral vein obscure; petiole slender, 1.44-2.93 cm long. Umbel 4-9 flowered, peduncle 2.40-3.00 cm long; pedicel glabrous, 18.86-23.5 mm long. Sepal broadly ovate, 0.97-1.59 mm long, 0.77-1.32 mm wide. Corolla light pink, 5.19-8.27 mm diam., inner surface puberulent except the angle of corolla lobe, outer surface glabrous with dark violet spots on pink, Corona obovate, 1.62-2.86 mm long, 1.51-2.48 mm wide, outer angle broadly acute and white, inner angle acuminate and violet. Pollinium broadly oblong-obovate, 0.63-0.70 mm long, 0.21-0.39 mm wide; translator stout 0.11-0.15 mm long; corpusculum broadly ovate, 0.44-0.55 mm long, 0.28-0.39 mm wide. Fruit not seen. **Specimens examined:** Huai Yang Waterfall National Park, Prachuapkhirikhan Province, D. Tungmunnithum 66, 67, 68, 69 and 70; Khao Yai, Kanchanaburi Province, C. F. van Beusekom and C. Phengkhlai 199 (BKF)

Form II

Leaves coriaceous, glabrous, oblong, apex and base acute, venation; midrib groove on the upper surface, lateral vein conspicuous; petiole stout 1.00-2.03 cm long. Umbel 7-13 flowered, peduncle 5.00-7.30 cm long; pedicel glabrous, 20.68-22.22 mm long. Sepal ovate to narrowly ovate 1.43-1.87 mm long, 1.08-1.53 mm wide. Corolla white, 8.28-9.380 mm diam., inner surface puberulent except the angle of corolla lobe, outer surface glabrous with white, Corona ovate, 2.30-3.28 mm long, 1.42-2.46 mm wide, outer angle obtuse and white, inner angle acute and white or light red. Pollinium narrowly oblong-obovate, 0.42-0.75 mm long, 0.21-0.25 mm wide; translator 0.9-1.1 mm long; corpusculum arrow head, 0.31-0.45 mm long, 1.0-1.7 mm wide. Fruit not seen. **Specimens examined:** Khao Yai, Nakhon Ratchasima Province: D. Tungmunnithum 2, 3 and 7, B. Hansen, G. Seidenfaden and T. Smitinand 11366 (BKF); Phu Luang, Loei Province: D. Tungmunnithum10, 11 and 18, C. Chermsirivathana, 877 (BK), O. Thaithong 997 (BCU)

Form III

Leaves coriaceous, glabrous, oblanceolate, apex and base acute, venation; midrib groove on the upper surface, lateral vein conspicuous; petiole stout 1.00-2.00 cm long. Umbel 7-11

flowered, peduncle 3.40-7.30 cm long; pedicel glabrous, 13.44-24.00 mm long. Sepal ovate 1.05-2.40 mm long, 0.89-1.57 mm wide. Corolla white, 6.08-7.73 mm diam., inner surface puberulent except the angle of corolla lobe, outer surface glabrous with white, pink spots on white, pink spots on light pink, Corona broadly ovate, 1.86-3.04 mm long, 1.52-2.64 mm wide, outer angle obtuse and white, inner angle acute and red. Pollinium narrowly oblong-obovate, 0.64-0.75 mm long, 0.20-0.23 mm wide; translator 0.6-0.7 mm long; corpusculum narrowly arrow head, 0.31-0.40 mm long, 1.3-1.5 mm wide. Fruit not seen. **Specimens examined:** Phu Luang, Loei Province: D. Tungmunnithum 12 and 19; Doi Chiengdao, Chiang Mai Province: A. F. G. Kerr 5610 (BK)

Form IV

Leaves coriaceous, glabrous, narrowly lanceolate, apex and base acute, venation; midrib groove on the upper surface, lateral vein conspicuous; petiole stout 1.10-1.94 cm long. Umbel 8-14 flowered, peduncle 2.00-5.50 cm long; pedicel glabrous, 16.24-20.46 mm long. Sepal ovate 1.20-2.12 mm long, 0.66-1.32 mm wide. Corolla green, 7.18-8.90 mm diam., inner surface puberulent except the angle of corolla lobe, outer surface glabrous with light green, Corona elliptic-obovate 1.65-2.40 mm long, 1.32-2.24 mm wide, outer angle acute and white, inner angle acute-acuminate and light violet. Pollinium oblong-obovate, 0.42-0.75 mm long, 0.21-0.22 mm wide; translator 0.90-1.10 mm long; corpusculum narrowly arrow head, 0.31-0.45 mm long, 1.00-1.20 mm wide. Fruit not seen. **Specimens examined:** Kio Mae Pan, Chiang Mai Province: D. Tungmunnithum 46,47and 48

Form V

Leaves coriaceous, glabrous, elliptic, apex and base acute, venation; midrib groove on the upper surface, lateral vein conspicuous; petiole stout 1.00-1.22 cm long. Umbel 7-12 flowered, peduncle 1.20-5.30 cm long; pedicel glabrous, 14.02-25.24 mm long. Sepal ovate 1.10-2.10 mm long, 0.76-1.57 mm wide. Corolla white pearl, 6.29-9.54 mm diam., inner surface puberulent except the angle of corolla lobe, outer surface glabrous with pink spots on white, Corona elliptic-obovate 1.08-3.33 mm long, 1.42-2.52 mm wide, outer angle acute and white, inner angle acute and pink. Pollinium narrowly oblong-obovate, 0.24-0.74 mm long, 0.10-0.26 mm wide; translator 0.70-1.10 mm long; corpusculum narrowly arrow head, 0.32-0.44 mm long, 1.40-1.55 mm wide. Fruits a follicle, pod-like, brown spots on green, straight glabrous and numerous seeds. **Specimens examined:** Kio

Mae Pan, Chiang Mai Province: D. Tungmunnithum 41, 42, 43, 44, 45, 49, 50, 51, 55, 85, 86, 87, 88 and 89; Doi Sutep, Chiang Mai Province: T. Shimizu and M. Hutoh 10561 (BKF), A. F. G. Kerr 724 (holo K), J.F. Maxwell 1159 (BKF), D. Tungmunnithum 90, 91 and 92

สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษาจึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ทำให้ทราบขอบเขตของชนิดที่ชัดเจนและได้คำบรรยายหน่วยอนุกรมวิธานระดับชนิดที่คลอบคลุมความหลากหลายของ *Hoya siamica* ชนิดเชิงซ้อนในประเทศไทย ซึ่งจะช่วยให้การจำแนกและการระบุชื่อชนิดมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อศาสตร์แขนงอื่นๆ

2 สามารถนำเอาวิธีการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาพืชชนิดเชิงซ้อนกลุ่มอื่น

เอกสารอ้างอิง

มานิต คิดอยู่ 2547. *การศึกษาทบทวนอนุกรมวิธานของ Hoya parasitica complex ในประเทศไทย.* วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Besnard, G. and Berville, A. 2002. On chloroplast DNA variations in the olive (*Olea europaea* L.) complex: comparison of RFLP and PCR polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*. 104: 1157-1163.

Craib, W. G. 1911. *Hoya siamica* Craib. *Kew Bulletin*. 419.

Columbus, J. T. 1999. Morphology and leaf blade anatomy suggest a close relationship between *Bouteloua aristidoides* and *B.* (*Chondrosium*) *eriopoda* (Gramineae: Chloridoideae). *Systematic Botany*. 23: 467- 478.

Erdtman, G. 1952. *Pollen Morphology and Plant Taxonomy - Angiosperms*. Stockholm : Almqvist & Wiksells.

Forster, P. I. and Liddle, D. J. 1991. Variation in *Hoya australis* R. Br. ex Triall (Asclepiadaceae) *Austrobaileya*. 3: 502 - 521.

Geivet, D. , Heinze, B. , Vendramin, G. G. and Petit, R. J. 2001. TECHNICAL NOTE: Genome walking with consensus primer: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes*. 1: 345–349.

Kerr, A. E. F. 1951. *Hoya* R. Br. In W.G. Craib and A.F.G. Kerr (eds.), *Florae Siamensis Enumeratio* (vol. III, part 1). Bangkok: Siam Society.

Kleijn, D. and van Donkelaar, R. 2001. Notes on the taxonomy and ecology of the genus *Hoya* (Asclepiadaceae) in Central Sulawesi. *Blumea*. 46: 457 - 483.

Mabbery, D. J. 1997. *The Plant-Book*. Cambridge: Cambridge University Press.

Panda, S., Martin, J. P. and Aguinagalde, I. 2003. Chloroplast and nuclear DNA studies in a few members of the *Brassica oleracea* L. group using PCR-RFLP and ISSR-PCR markers: a population genetic analysis. *Theoreticaland Applied Genetics*.106: 1122 - 1128.

Ruzin, S. E. 1973. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford: Oxford University Press.

Saarela, J. and Ford, B. A. 2001. Taxonomy of the *Carex backii* complex (section Phyllostachyae, Cyperaceae). *Systematic Botany*. 26: 704 - 721.

Thaithong, O. 1995. The Genus *Hoya* in Thailand. In: R. Kiew (Ed.). *The Taxonomy and Phytochemistry of the Asclepiadaceae in Tropical Asia*, pp. 83-94. Universiti Pertanian, Malaysia.

Tsumura, Y., Kawahara, T. and Wickneswari , R. 1996. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theoreticaland Applied Genetics*. 93: 22 - 29.

Wanntorp, L., Kocyan, A. and Renner S. S. 2006. Wax plants disentangled: A phylogeny of *Hoya*(Marsdenieae, Apocynaceae) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 39: 722 - 733.

โครงการ CEB_M_54_2010

ชื่อ-นามสกุล นายนรวิชญ์ ชุมฉิม **เลขประจำตัว** 5172329923
หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** พฤกษศาสตร์

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

เรณูวิทยาของพืชชายเลนในประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Palynology of Mangrove Flora in Thailand

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คำนำ

เรณูวิทยา (Palynology) คือ การศึกษาเรณู (pollen) สปอร์ (spore) หรือชีววัตถุอื่น ๆ ที่สามารถศึกษาด้วยวิธีทางเรณูวิทยา รวมถึงการประยุกต์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง (Hyde and Williams, 1944) ลักษณะสัณฐานของเรณูมีประโยชน์ในการจำแนกกลุ่มพืช โดยแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในระดับวงศ์ (families) เผ่า (tribes) สกุล (genera) หรือแม้แต่ในระดับชนิด (species) (Erdtman, 1952) ซึ่งนอกจากจะเป็นประโยชน์ในงานทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) แล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านอื่น ๆ เช่น การศึกษาเรณูในอากาศ (aeropalynology) การศึกษาซากดึกดำบรรพ์เรณู (geopalynology) การศึกษาเรณูในน้ำผึ้ง (melissopalynology) และการศึกษาเรณูที่เกี่ยวเนื่องทางการแพทย์ (medical palynology) เป็นต้น (Erdtman, 1952, 1969)

ป่าชายเลนในประเทศไทยพบได้ตามบริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำลำคลอง และบริเวณรอบเกาะ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีน้ำทะเลท่วมถึงของภาคตะวันออกตอนล่าง ภาคกลางตอนล่าง ภาคใต้ฝั่งอ่าวไทยและภาคใต้ฝั่งอันดามัน (สนิท อักษรแก้ว และคณะ, 2535) พบพืชชายเลนในประเทศไทยที่เป็นไม้ต้นและไม้พุ่ม 35 วงศ์ 53 สกุล และ 74 ชนิด โดยเป็นพืชชายเลนแท้จริง 14 วงศ์ 17 สกุล และ 31 ชนิด (Santisuk, 1983)

เนื่องด้วยป่าชายเลนมีสภาพทางนิเวศวิทยาและพืชที่มีลักษณะเฉพาะ จึงเป็นระบบนิเวศหนึ่งที่เหมาะสมในการใช้เรณูวิทยาศึกษาประวัติและวิวัฒนาการ ด้วยการศึกษาและวิเคราะห์เรณู (Pollen analysis) จากตะกอนดิน แต่การศึกษางานทางนี้ต้องใช้ผู้ที่มีความรู้ความชำนาญในงานด้านสัณฐานวิทยาเรณู หรือควรมีตัวอย่างเรณูพืชปัจจุบันและฐานข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาเรณูพืชปัจจุบันมากเพียงพอ แต่การศึกษาสัณฐานวิทยาเรณูของพืชชายเลนปัจจุบันในประเทศไทยมีอยู่น้อยมาก เช่น การศึกษาเรณูของพรรณไม้วงศ์โกงกาง (Rhizophoraceae) ของไทย 7 สกุล และ 14 ชนิด (สมิต บุญเสริมสุข, 2530; พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2535) ซึ่งเป็นการศึกษาเรณูพืชชายเลนเพียงบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการรวบรวมข้อมูลด้านเรณูวิทยาของพืชชายเลนในประเทศไทย ซึ่งเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่จะเป็นประโยชน์ต่อศาสตร์แขนงอื่นต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานของเรณูและสปอร์พืชชายเลนที่พบในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาเอกสารเกี่ยวกับเรณูและพืชชายเลนในประเทศไทย

ศึกษาเรณูและชนิดพืชชายเลนที่พบในประเทศไทยจากหนังสือและเอกสารการวิจัยต่างๆ และนำมาตรวจสอบการแพร่กระจายของพืชและแหล่งที่สามารถพบได้ในประเทศไทยจากหนังสือพรรณพฤกษชาติแห่งประเทศไทย

2. สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเรณูพืชชายเลนจากตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชทั่วประเทศและตัวอย่างสดในป่าชายเลนแหล่งต่าง ๆ

2.1 เก็บรวบรวมตัวอย่างเรณูจากตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพของพืชชายเลนที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชในประเทศไทย ตามวิธีของ Erdtman (1960) และ Fægri และ Iversen (1964)

2.2 เก็บเรณูจากตัวอย่างสดในภาคสนามในกรณีที่ตัวอย่างแห้งสูญหาย ไม่มีดอกหรืออับเรณูให้ศึกษา หรือตัวอย่างถูกเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชภายนอกประเทศ โดยเก็บตามวิธีของ Erdtman (1960) และ Fægri และ Iversen (1964) และระบุชนิดของตัวอย่างพืชโดยใช้รูปวิธานจากหนังสือพรรณพฤกษชาติต่าง ๆ เช่น หนังสือพรรณพฤกษชาติแห่งประเทศไทย

2.3 เรณูของพืชที่ใช้ศึกษาจะศึกษาจากตัวอย่างที่เก็บในภาคสนามและ/หรือตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพ จำนวนชนิดอย่างน้อย 80 ชนิด แต่ละชนิดเก็บอย่างน้อยสามตัวอย่างเพื่อดูความแปรปรวน (variation) ของเรณูที่อาจเกิดขึ้น

3. ศึกษาสัณฐานเรณูในห้องปฏิบัติการ

3.1 เตรียมตัวอย่างเรณูโดยผ่านกระบวนการ acetolysis (Erdtman, 1960) จากนั้นเก็บรักษาเรณูไว้ในขวดเล็กด้วย silicone oil

3.2 นำตัวอย่างเรณูที่ผ่านกระบวนการ acetolysis มาจัดทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเรณูโดยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope: LM) โดยจำนวนของเรณูที่ใช้ศึกษาไม่ต่ำกว่า 20 เรณูต่อตัวอย่าง วัดขนาดเรณูและบันทึกภาพเรณู สไลด์ถาวรของเรณูจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ศ. กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 ศึกษาสัณฐานวิทยาของเรณูที่ผ่านกระบวนการ acetolysis ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) และบันทึกภาพเรณูในมุมมองต่างๆ

4. จัดทำคำบรรยายลักษณะสัณฐานของเรณูและสร้างรูปวิธานจำแนกชนิดของเรณู หรือรูปแบบเรณู (pollen type) ของพืชชายเลนในประเทศไทย

5. รวบรวมข้อมูลสำหรับอภิปรายผลและสรุปผล เพื่อจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์

ผลการศึกษา

แผนการวิจัย	ผลการวิจัย	ปัญหา/การแก้ไข(ถ้ามี)
1. ศึกษาเอกสารเกี่ยวกับเรณูและพืชชายเลนในประเทศไทย	- ได้รายชื่อวิทยาศาสตร์พืชชายเลนที่พบในประเทศไทย รวมทั้งข้อมูลเขตการกระจายพันธุ์ และช่วงเวลาที่พืชแต่ละชนิดออกดอก - ได้ข้อมูลการศึกษาสัณฐานเรณูพืชชายเลนในประเทศไทยบางกลุ่ม เช่น พืชวงศ์ Rhizophoraceae	- ชื่อวิทยาศาสตร์พืชชายเลนบางตัวมีการยกเลิก เปลี่ยนแปลง หรือย้ายหน่วยทางอนุกรมวิธาน จึงต้องทำการตรวจสอบและแก้ไขให้ถูกต้อง
2. สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเรณูพืชชายเลนจากตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชทั่วประเทศและตัวอย่างสดในป่าชายเลนแหล่งต่าง ๆ	- เก็บรวบรวมตัวอย่างเรณูจากพันธุ์ไม้รักษาสภาพในพิพิธภัณฑ์พืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (PSU) - สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชชายเลนจากป่าชายเลนในพื้นที่จังหวัดตราด สมุทรปราการ สงขลา พัทลุง และสตูล	- ตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพของพืชชายเลนมีไม่ครบทุกชนิด จึงต้องหาตัวอย่างสดจากป่าชายเลนทดแทน - การสำรวจป่าชายชายเลน ไม่พบพืชชายเลนที่ต้องการ หรือพืชชนิดนั้นไม่ออกดอก
3. ศึกษาสัณฐานเรณูในห้องปฏิบัติการ	- เตรียมตัวอย่างเรณูผ่านกระบวนการทางเคมี จากนั้นนำไปศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	- ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเรณูผ่านกระบวนการทางเคมี มีบางครั้งที่ได้ตัวอย่างเรณูน้อยมาก หรือไม่พบเลย จึงต้องมีความระมัดระวังมากยิ่งขึ้น

สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษา จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นฐานข้อมูลสำคัญด้านเรณูวิทยาของพืชชายเลนในประเทศไทยที่สามารถนำไปใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์เรณู (pollen analysis) จากตะกอนหรือวัตถุต่าง ๆ ที่เก็บจากป่าชายเลนในบริเวณต่าง ๆ ของประเทศไทย เป็นประโยชน์ต่อศาสตร์แขนงอื่น

เอกสารอ้างอิง

พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. 2535. ลักษณะของเรณูของพืชในวงศ์ไม้โกงกาง (Rhizophoraceae) ในประเทศไทย. รายงานการวิจัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สนิท อักษรแก้ว, กอร์ดอน เอส แมกซ์เวลล์, สนใจ หะวานนท์ และสมชาย พานิชสุโข. 2535. พันธุ์ไม้ป่าชายเลน. กรุงเทพฯ : บริษัท ฉลองรัตน จำกัด,

สมิต บุญเสริมสุข. 2530. การศึกษาเรณูของพรรณไม้วงศ์ Rhizophoraceae ของไทย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ชีววิทยาป่าไม้ วนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Erdtman, G. 1952. Pollen Morphology and Plant Taxonomy - Angiosperms. Stockholm : Almqvist & Wiksells,

Erdtman, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. Svensk Botanisk Tidskrift 54 : 561-564.

Erdtman, G. 1969. Handbook of Palynology - An Introduction to the Study of Pollen Grains and Spores. Copenhagen : Munksgaard,

Fægri, K. and Iversen, J. 1989. Textbook of Pollen Analysis. 4th Edition. London : Alden Press,

Hyde, H.A. and Williams, D.A. 1944. The Right Word. Pollen Analysis Circular 8 : 6.

Santisuk, T. 1983. Taxonomy and Distribution of Terrestrial Trees and Shrubs in the Mangrove Formations in Thailand. NAT. Hist. Bull. Siam. Soc. 31 : 63-91.

โครงการ CEB_M_55_2010

CEB_M_55_2010

ชื่อ-นามสกุล นายพุทธมน ผ่องกาย **เลขประจำตัว** 5172391723
หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** พฤกษศาสตร์

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

การทบทวนอนุกรมวิธานเฟิร์นสกุล *Diplazium* Sw.(WOODSIACEAE) ในประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Taxonomic revision of fern genus *Diplazium* Sw. (Woodsiaceae) in Thailand

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ทวีศักดิ์ บุญเกิด
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คำนำ

เฟิร์นสกุล *Diplazium* Sw. จัดอยู่ในวงศ์ Woodsiaceae เป็นเฟิร์นสกุลใหญ่มีจำนวนสมาชิกมากประมาณ 400 ชนิดทั่วโลก (Lellinger, 1985) โดยส่วนใหญ่จะกระจายพันธุ์ในเขตร้อน (Kramer and Kato, 1990) เป็นเฟิร์นที่มีขนาดใหญ่ถึงปานกลางมีต้น (rhizome) ซึ่งอาจตั้งตรงหรือคืบคลานไปกับพื้น มีเกล็ด (scale) สีน้ำตาลจนถึงดำมีขอบเรียบหรือหยักซี่ฟัน ก้านใบ (stipe) มีลักษณะเป็นร่องซึ่งเป็นลักษณะพิเศษ เมื่อตัดตามขวางจะเห็นเนื้อเยื่อลำเลียงเป็นรูปตัวยู (U shape) แผ่นใบ (lamina) ส่วนใหญ่เป็นใบประกอบแบบขนนกบางชนิดเป็นใบเดี่ยว มีกลุ่มอับสปอร์ (sorus) เป็นรูปยาวเรียงตัวตามแนวเส้นใบย่อยมีเยื่อคลุมกลุ่มอับสปอร์ปกคลุม (Shich, Devol and Kuo, 1944) ในประเทศไทยมีรายงานว่าพบเฟิร์นสกุล *Diplazium* จำนวน 29 ชนิดขึ้นกระจายทั่วทุกภาคของประเทศ (Boonkerd and Pollawatn, 2000; Tagawa and Iwatsuki, 1988) บางชนิดเช่น *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw. สามารถนำใบอ่อนมาบริโภคได้ (Boonkerd, 1996)

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของเฟิร์นสกุล *Diplazium* นี้ทำได้ยากและยังคงมีปัญหา (Kramer and Kato, 1990) เนื่องจากเฟิร์นสกุล *Diplazium* มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาสูง ประกอบกับรูปวิธานที่ใช้ระบุชื่อวิทยาศาสตร์นั้นยังไม่สมบูรณ์ไม่ครอบคลุมชนิดของเฟิร์นสกุล *Diplazium* ที่พบจริงในประเทศไทย เช่นมีการพบ *Diplazium* เพิ่มเติมอีกจากที่เคยรายงานไว้เช่น *Diplazium montanum* v.A.v.Ros., *D. incomptum* Tagawa (Tagawa and Iwatsuki, 1988), *D. doederleinii* (Luerss.) Makino, *D. okinawaense* Tagawa (Mitsuta, 1985) และ *D. procumbens* Holttum (Boonkerd, et al. 2004) ซึ่งใน Flora of Thailand นั้นยังไม่ได้แก้ไขเพิ่มเติมเข้าไป ดังนั้นรูปวิธาน (key) ที่มีอยู่ในปัจจุบันจึงยังไม่สมบูรณ์ อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาทบทวนอนุกรมวิธานของเฟิร์นสกุล *Diplazium* นี้ในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นข้อมูลที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านั้นอาจเกิดความผิดพลาดได้ จึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาทบทวนเฟิร์นสกุลนี้เพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความถูกต้องชัดเจน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาทบทวนอนุกรมวิธานเฟิร์นสกุล *Diplazium* Sw. (WOODSIACEAE) ในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

1.ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับเฟิร์นสกุล *Diplazium*

1.1.ศึกษาเอกสาร ตำรา และรวบรวมงานวิจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับเฟิร์นสกุล *Diplazium*

1.2.ศึกษาค้นคว้าข้อมูลของเฟิร์นสกุล *Diplazium* แต่ละชนิดที่พบในประเทศไทย

2.ศึกษาตัวอย่างเฟิร์นสกุล *Diplazium* จากพิพิธภัณฑ์พืชต่าง ๆ

ศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่าง *Diplazium* จากพิพิธภัณฑ์พืชต่างๆเช่น พิพิธภัณฑ์พืชศาสตราจารย์กสิน สุวตะ-พันธุ์ (BCU), พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK), หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช (BKF), พิพิธภัณฑ์พืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (CMU), พิพิธภัณฑ์พืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (KKU), พิพิธภัณฑ์พืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ (PSU), พิพิธภัณฑ์พืชสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ (QSBG), พิพิธภัณฑ์พืชในต่างประเทศ เช่น ประเทศมาเลเซียและสิงคโปร์

3.เก็บตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะสปอร์ และกายวิภาคของเฟิร์นสกุล *Diplazium*

3.1.เก็บตัวอย่างเฟิร์นสกุล *Diplazium* จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยอย่างน้อย 30 ชนิด ชนิดละ 5 ตัวอย่าง และนำมาทำเป็นตัวอย่างแห้งตามวิธีการของทวีศักดิ์ บุญเกิดและคณะ (ทวีศักดิ์, 2530)

3.2.ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของเฟิร์นที่เก็บตัวอย่างมาโดยใช้รูปวิธาน (key) พร้อมทั้งวาดภาพและเขียนบรรยายลักษณะโดยละเอียด

3.3.นำตัวอย่างเฟิร์นที่เก็บมาเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์พืช

3.4.ศึกษาลักษณะของสปอร์ *Diplazium* แต่ละชนิด

3.5.ศึกษาลักษณะกายวิภาคศาสตร์ของก้านใบ (stipe) *Diplazium* แต่ละชนิด

3.6.ศึกษาลักษณะของเกล็ด (scale)

3.7.ศึกษาลักษณะของผิวใบ

ผลการศึกษา

ได้เก็บตัวอย่างเฟิร์นสกุล *Diplazium* ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่อุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย ทำการตรวจสอบหาชื่อวิทยาศาสตร์พบว่าได้ตัวอย่างเฟิร์นสกุล *Diplazium* เพิ่มเติมอีก 3 ชนิด คือ

- *Diplazium mettenianum* (Miq.) C. Chr.
- *D. donianum* (Mett.)
- *D. silvaticum* (Bory) Sw.

และเก็บตัวอย่างในเขตภาคใต้ที่อุทยานแห่งชาติเขานัน จังหวัดนครศรีธรรมราช ทำการตรวจสอบหาชื่อวิทยาศาสตร์พบว่าได้ตัวอย่างเฟิร์นสกุล *Diplazium* เพิ่มเติมอีก 6 ชนิด คือ

- *Diplazium subintegrum* Holtt.
- *D. crenatoserratum* (Bl.) Moore
- *D. tomentosum* Bl.

- *D. bantamense* Bl.

- *D. cordifolium* Bl.

- *D. sorzogonense* (Presl) Presl

นำตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดมาศึกษากายวิภาคศาสตร์บริเวณก้านใบโดยใช้เครื่อง microtome ตัดตัวอย่างสด และบันทึกภาพ พร้อมทั้งศึกษาลักษณะของเกล็ด (scale) และศึกษาลักษณะของผิวใบ

สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษา จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เกิดความถูกต้องชัดเจนและสามารถแก้ไขปัญหาความคลุมเครือต่างๆในเฟิร์นสกุลนี้
2. ได้คู่มือที่จะใช้ในการศึกษาอนุกรมวิธานพืชของเฟิร์นสกุล *Diplazium* Sw. ในประเทศไทยที่สมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ บุญเกิด, มนทกานติ วัชราภัย, สุทธพรรณ ตรีรัตน์, เยาวลักษณ์ มณีรัตน์, อบฉันท์ ไทยทอง และนาฏ ฉลวย หลายชูไทย. 2530. การเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้. กรุงเทพมหานคร: อรุณอมรินทร์การพิมพ์.

Boonkerd, T. 1996. Noteworthy Ferns of Thailand. Chulalongkorn University press: The Chulalongkorn University Book Center.

Boonkerd, T. and Pollawatn, R. 2000. Pteridophytes in Thailand. Office of Environmental Policy and Planning, Bangkok, Thailand: Integrated Promotion Technology Co., Ltd.

Boonkerd, T., Lindsay, S., Middleton, D.J., and Suddee, S. 2004. Additions to the Pteridophyte flora of Thailand. Thai Forest Bulletin (Botany). 32: 6-11.

Kramer, K.U. and Kato, M. 1990. Dryopteridaceae subfamily Athyriaceae. In K. Kubitzki. (eds), The Families and Genera of Vascular Plants. I. Pteridophytes and Gymnosperms, 101-144. Berlin: Springer-Verlag.

Lellinger, D.B. 1985. A Field Manual of the ferns and fern-allies of the United States and Canada. United States: Smithsonian Institution.

Mitsuta, S. 1985. Nine new records of ferns to Thailand flora. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica. 36: 148.

Shich, W-C., Devol, C.E., and Kuo, C-M. 1944. Athyriaceae genus Diplazium Sw. In The Ediorial Committee of the Flora of Taiwan, Second Edition. (eds), Flora of Taiwan(vol.1) Pteridophyte and Gymnospermae, 434-445. Taipei: Sandos Chromagraph printing Company.

Tagawa, M. and Iwatsuki, K. 1988. Athyriaceae. In Smitinand,T., and Larsen, K. (eds), Flora of Thailand. 3(3), 436-466. Bangkok: Chutima Press.

โครงการ CEB_M_58_2010

ชื่อ-นามสกุล นางสาวเอื้องฟ้า บรรเทาวงษ์ **เลขประจำตัว** 5172567923
หลักสูตร ปริญญามหาบัณฑิต **สาขาวิชา** สัตววิทยา

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ความหลากชนิดของไส้เดือนดินในจังหวัดน่าน

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Species diversity of terrestrial earthworms in Nan province

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. ผ่องพรรณ ประสารกก

คำนำ

ไส้เดือนดินเป็นสัตว์ที่คลืบคลานหากินอยู่ตามผิวดินและชอนไชไปตามซอกหลืบของเม็ดดินกัดกินและย่อยสลายเศษซากอินทรียวัตถุในดินให้ผุกร่อนเล็กลงอยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์ในดินสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีกต่อหนึ่งการชอนไชของไส้เดือนดินทำคุณสมบัติทางกายภาพของดินดีขึ้นคือทำให้ดินโปร่งร่วนซุยสามารถปรับสภาพการถ่ายเทอากาศภายในดินดีขึ้นช่วยในการอุ้มน้ำของดินการไหลผ่านของน้ำในดินทำให้ดินมีความชุ่มชื้นอยู่เสมอจึงเหมาะแก่การแทงรากออกไปหาอาหารของพืชการเจริญเติบโตของพืชเบื้องบนที่เป็นผลมาจากการทำงานเบื้องล่างของไส้เดือนดินทุกอย่างจึงสอดคล้องกันไปตามบทบาทหน้าที่ไส้เดือนดินจำนวนมหาศาลใต้ผิวดินทั่วโลกทำประโยชน์ให้กับมวลมนุษย์อย่างประเมินค่ามิได้ ไส้เดือนอย่างอเนกอนันต์จากกิจกรรมในการดำรงชีวิตและผลจากกระบวนการกินอาหารของไส้เดือนดินจึงทำให้ดินเศษอาหาร หรืออินทรียวัตถุที่ไส้เดือนดินกินเข้าไปจะถูกย่อยสลายและถูกขับถ่ายออกมาเป็นมูล (cast) ซึ่งมีธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากและอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ดีจึงถือว่าไส้เดือนดินเป็นสัตว์ที่ช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์แก่ดินจากการถ่ายมูลที่เป็นปุ๋ยอินทรีย์ซึ่งมีความเป็นประโยชน์ต่อพืช

ไส้เดือนดินเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) จัดอยู่ใน Phylum Annelida, Class Oligochaeta ปัจจุบันไส้เดือนดินถูกจัดออกเป็นสองอันดับ ได้แก่ Moniligastridae และ Haplotaxidae โดยไส้เดือนดินในวงศ์ Lumbricidae และ Megascolecidae เป็นวงศ์ที่มีการกระจายกว้าง (peregrine) สมาชิกในวงศ์ Lumbricidae มีการกระจายอยู่บริเวณทวีปอเมริกาเหนือ ยุโรป มาจนกระทั่งเอเชียตอนเหนือ และวงศ์ Megescolecidae นั้น มีต้นกำเนิดอยู่บริเวณภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และออสเตรเลีย (Reynold and Cook, 1993) โดยสกุล *Pheretima* เป็นสกุลใหญ่ที่มีสมาชิกมากถึง 700 ชนิด ซึ่งได้มีจัดแบ่งใหม่ออกเป็น *Archipheretima*, *Pithermara*, *Ephemitra*, *Metapheretima*, *Planapheretima*, *Amynthas*, *Metaphire*, และ *Pheretima* (Sims and Easton, 1972)

ประเทศไทยมีการรายงานไส้เดือนดินครั้งแรกทั้งหมด 24 สปีชีส์ (Gates,1939) ซึ่งทั้งหมดอยู่ในสกุล *Pheretima* ต่อมามีรายงานการค้นพบไส้เดือนดินในประเทศพม่าไว้ในหนังสือ 'Burmese Earthworms' ซึ่งมีรายงานสปีชีส์ไส้เดือนดินในประเทศไทยว่ามีจำนวน 27 สปีชีส์ (Gates, 1972) หลังจากนั้นงานศึกษาความหลากหลายของไส้เดือนดินในประเทศไทยก็หยุดชะงักลงเป็นเวลา 70 ปี จนกระทั่ง Blakemore (2006) ได้รวบรวมและจัดทำบัญชีรายชื่อไส้เดือนดินที่พบในประเทศไทยซึ่งพบทั้งสิ้น 29 ชนิด โดยสกุลที่พบค่อนข้างกว้าง คือ *Amynthas* และ *Metaphire* และชนิดที่พบได้ทั่วไป (common species) ก็คือ *Metaphire peguana* ซึ่งเป็นชนิดที่น่าจะทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมเนื่องจากลักษณะสัณฐานมีความผันผวนตามสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจ

ทำให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนกจึงควรอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมด้วย อีกทั้งยังสามารถช่วยยืนยันความเป็น cryptic species ของไส้เดือนดินที่มีถิ่นอาศัยแตกต่างกัน และมีลักษณะต่างกันเพียงอย่างเดียว คือ ระยะระหว่างช่องเปิดเพศผู้ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ปรากฏว่า ไส้เดือนดินทั้งสองกลุ่มนี้เป็นคนละสปีชีส์กัน (Chang and Chen, 2005) ดังนั้น แสดงว่าความแตกต่างเล็กน้อยของไส้เดือนดินที่อาศัยอยู่คนละพื้นที่กัน อาจเกิดมาจากการถูกแยกกันโดยกระบวนการ vicariance ซึ่งเป็นกระบวนการเกิดสปีชีส์ใหม่ที่เป็นผลมาจากสิ่งกีดขวางทางภูมิประเทศ เช่น ภูเขา แม่น้ำ ถนน ทำให้สิ่งมีชีวิตไม่สามารถสืบพันธุ์กันได้ต่อไป

อย่างไรก็ตาม จากปัญหาในการจัดจำแนกไส้เดือนดินที่ยังมีความสับสนไม่ว่าจะเป็นในเรื่องชื่อพ้อง ลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใช้ยังไม่ครอบคลุม ตัวอย่างเก่า ปริมาณน้อยและไม่สมบูรณ์ อีกทั้งปัจจุบันมีรายงานไส้เดือนดินที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (alien species) เข้ามาปะปนด้วยทำให้ยิ่งเกิดความสับสนมากยิ่งขึ้น และที่ผ่านมาก็เป็นการสำรวจในบางพื้นที่เท่านั้น ยังมีพื้นที่อีกหลายแห่งที่น่าสนใจและยังไม่เคยมีการสำรวจไส้เดือนดินมาก่อน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากชนิดของไส้เดือนดินในจังหวัดน่าน
2. เพื่อศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของไส้เดือนดิน *Metaphire peguana* ในจังหวัดน่าน

วิธีการศึกษา

1) การศึกษาภาคสนาม

การสำรวจชนิดไส้เดือนดินบริเวณพื้นที่จังหวัดน่าน โดยทำการเก็บตัวอย่างไส้เดือนดินแบบ visual encounter survey โดยเลือกพื้นที่ตัวอย่างให้ครอบคลุมทั่วทั้งพื้นที่จังหวัดน่าน ทั้งพื้นที่ป่าดิบชื้น ป่าเต็งรัง ป่าผสมผลัดใบ พื้นที่เกษตร พื้นที่ชุมชน โดยแต่ละแห่งจะเก็บไส้เดือนดินตามถิ่นอาศัยย่อย ได้แก่ ขอนไม้ใบไม้ผุ ตามซอกก้อนหิน ในชั้นดิน โดยทำการขุดบริเวณที่พบขุยไส้เดือนหรือใช้สารเคมีพวกน้ำยาทำความสะอาดหรือสารละลายฟอร์มาลินเจือจาง (ฟอร์มาลิน 5% ละลายในน้ำ 20 ลิตร) ราดลงไปในดินประมาณ 3-5 นาที เพื่อเรียกไส้เดือนให้ขึ้นมาจากดิน จากนั้นเก็บตัวอย่างไส้เดือนดินไว้ในถุงพลาสติกหรือขวดพลาสติก บันทึกสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง บันทึกพิกัด และข้อมูลถิ่นที่อยู่อาศัย ตัวอย่างไส้เดือนดินจะถูกเก็บรักษาและคงสภาพในฟอร์มาลินเข้มข้น 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเก็บรักษาไว้ใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานภายนอกและลักษณะทางกายวิภาค (Stephenson, 1923; Gate, 1972; Sims and Easton, 1972) และไส้เดือนชนิด *Metaphire peguana* เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อนำไปศึกษาทางด้านพันธุกรรม

2) การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ไส้เดือนดินที่เก็บมาได้จากทุกพื้นที่ศึกษาจะถูกจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน โดยศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานภายนอกและลักษณะกายวิภาค ได้แก่ ความยาวลำตัว จำนวนปล้อง ลักษณะปาก (prostomium) ลักษณะและตำแหน่งของขนเดือย (setae) ตำแหน่งของช่องรับสเปิร์ม (spermathecal pore) ตำแหน่งและลักษณะของไคลเทลลัม (clitellum) ตำแหน่งและลักษณะของช่องเปิดเพศผู้ (male pore) และช่องเปิดเพศเมีย (female pore) ตำแหน่งและลักษณะของ genital markings (ถ้ามี) ตำแหน่งและลักษณะของถุงรับสเปิร์ม (spermatheca) จำนวนคู่ของ seminal vesicles ตำแหน่งของ pseudohearts การมี/ ไม่มี copulatory pouch ขนาดและลักษณะของต่อม prostate ลักษณะและขนาดของ intestinal caecum

ไส้เดือนดินชนิด *Metaphire peguana* จะถูกนำมาวิเคราะห์โปรตีนเพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรม โดยการศึกษา allozyme ด้วยวิธี starch gel electrophoresis ตามวิธีของ Clayton and Tretiak (1972), Boyer et al. (1963), Ridgway et al. (1970) และ Murphy et al. (1996) โดยสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อในส่วนผิวหนังบริเวณส่วนปากหรือไคลเทลลัม

ผลการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างไส้เดือนดินในพื้นที่จังหวัดน่านตั้งแต่เดือนตุลาคม 2552 – กันยายน 2553 โดยทำการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ อ.เมือง อ.เวียงสา อ.แม่จริม อ.บ่อเกลือ อ.เฉลิมพระเกียรติ อ.ทุ่งช้าง อ.ท่าวังผา อ.สองแคว อ.เชียงกลาง จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคเพื่อทำการจัดจำแนกพบไส้เดือนดินทั้งสิ้น 10 ชนิดใน 2 วงศ์ คือวงศ์ Glossoscolecidae (*Pontoscolex corethrurus*) และวงศ์ Megascolecidae (*Amynthas alexandri, A. longicauliculatus, Metaphire peguana, M. posthuma, M. houlleti, M. anomala, Amynthas* sp.1, *Amynthas* sp.2, *Amynthas* sp.3, *Metaphire* sp.1, *Matephire* sp.2, *Metaphire* sp.3) สำหรับไส้เดือน *M. peguana* ซึ่งเป็นไส้เดือนที่จะนำมาทำ allozyme นั้น เก็บตัวอย่างทั้งในจังหวัดน่านและพื้นที่ใกล้เคียงเพื่อเปรียบเทียบความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรไส้เดือนโดยทำการเก็บตัวอย่างไว้ในไนโตรเจนเหลว ที่มีอุณหภูมิ -196 องศา และจากการ preliminary พบว่าเอนไซม์ที่เหมาะสมได้แก่ Asparate aminotransepherase (AAT), Malic enzyme (ME), Peptidase (leucyl glycyl glycine) (LGG), Hydroxybuthyric acid dehydrogenase (HBDH), Peptidase-glycyl-L-luecine (GL), Peptidase LEU-ALA (LA), Glucose phosphate isomerase (GPI), Isocitrate dehydrogenase (IDH), Phosphoglucomutase (PGM) และ Malate dehydrogenase (MDH)

สรุปผลและวิจารณ์

พบไส้เดือนทั้งสิ้น 2 วงศ์ 3 สกุล ที่ทราบชนิดแล้ว 7 ชนิด คือ *Amynthas alexandri, A. longicauliculatus, Metaphire peguana, M. posthuma, M. houlleti, M. anomala, Pontoscolex corethrurus* โดยพบว่าพื้นที่ที่มีการเก็บตัวอย่างไส้เดือน พบว่า ที่วนอุทยานถ้ำผาตูบพบไส้เดือนมีความหลากหลายสูงกว่าพื้นที่อื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีถิ่นอาศัยย่อย (microhabitat) ค่อนข้างหลากหลาย มีทั้งก้อนหินขนาดน้อยใหญ่ มีขอนไม้ผุขนาดใหญ่ มีพื้นที่ราบ และมีต้นไม้ปกคลุมหนาแน่น และพบว่ามีไส้เดือนดินที่พบได้ตามพื้นที่ชุมชน คือ *Pontoscolex corethrurus* และ *M. posthuma* หรือที่ชาวบ้านเรียกว่า ขี้คู้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับอนุกรมวิธานของไส้เดือนดินในจังหวัดน่านซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรกรรมและด้านอื่นๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สมศักดิ์ ปัญหา, Henrik Enghoff และ Samuel James. 2550. ไส้เดือนและกิ้งกือ. จัดพิมพ์โดยโครงการ BRT. บริษัท จิรวัฒน์ เอ็กซ์เพรส จำกัด กรุงเทพฯ. 72 หน้า

Blakemore, R.J. 2006. Chapters In: *A Series of Searchable Texts on Earthworm Biodiversity, Ecology and Systematics from Various Regions of the World - Supplemental.* Eds. N.

Kaneko & M.T. Ito. COE Soil Ecology Research Group, Yokohama National University, Tokiwadai, Yokohama Japan. Publication online at YNU COE website http://bioeco.eis.ynu.ac.jp/eng/database/ earthworm/. [Supplemental Sept. 2006]

Boyer, S.H., Fainer D.C. and Watson E.J. 1963. Lactate dehydrognase variation from human blood: Evidence for molecular subunit. *Science*. 141: 642-643.

Chang, C.H. and Chen, J.H. 2005. Taxonomic status and intraspecific phylogeography of two sibling species of *Metaphire* (Oligochaeta: Megascolecidae) in Taiwan. *Pedobiologia*. 49: 591-600

Clayton, J.W. and Tretiak, D.N. 1972. Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 29: 1169–1172.

Edwards, C.A. 2004. Earthworm Ecology. New York : CRC press. 2-4.

Gates, G.E. 1939. Thai earthworms. *Journal Thailand Research Society*. 12: 65-114.

Gates, G.E. 1959. On a taxonomic puzzle and the classification of the earthworms. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*. 121: 229-261.

Gates, G.E. 1972. Burmese earthworms. An introduction to the systematics and biology of megadrile oligochaetes with special reference to the Southeast Asia. *Transactions of the American Plilosophical Society*. 62: 233-238.

Murphy, R.W., Sites Jr., J.W., Buth, D.G. and Haufler, C.H. 1996. Protein: isozyme electrophoresis. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (eds.), Molecular Systematics. Sinauer Association, Sunderland, Massachusetts, 120 pp.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample number of individuals. Genetics 89, 583–590.

Reynolds, J. W. and Cook, D.G. 1993. Nomenclatura oligochaetologica. Supplementum tertium. A catalogue of names, descriptions and type specimens of the Oligochaeta. New Brunswick Mus. Monogr. Ser. (Nat. Sci.) No. 9.

Ridgway, G.J., Sherbrune, S.W. and Lewis, R.D. 1970. Polymorphisms in the esterase of Atlantic herring. *Transactions of the American Fisheries Society*. 99: 147–151.

Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. Stud Genet Univ Texas Publ 7213:145–153.

Saitou, N. and Nai, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425

Sims, R.W. and Easton, E.G. 1972. A numerical revision of the earthworm genus *Pheretima* (Megascolecidae: Oligochaeta) with the recognition of new genera and an appendix on the earthworms collected by the royal society North Borneo Expedition. *Biological Journal of the Linnean Society*. 4: 169-268.

โครงการ CEB_D_15_2008

CEB_D_15_2008

ชื่อ-นามสกุล นางกัลยา ศรีประทีป **เลขประจำตัว** 4973803623
หลักสูตร ปริญญาดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

นิเวศวิทยาประชากรของ *Indotestudo elongata*, Blyth ที่บ้านกอก จังหวัดขอนแก่น

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Population ecology of the elongated tortoise *Indotestudo elongata*, Blyth at Ban Kok, Khon Kaen provine

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. กำธร ธีรคุปต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. วรัญญา อรัญวาลัย

คำนำ

เต่าเหลือง *(Indotestudo elongata)* เป็นสัตว์พื้นถิ่นที่สามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของประเทศไทย ยกเว้นกรุงเทพและจังหวัดที่อยู่ข้างเคียง ปัจจุบันมีจำนวนลดน้อยลงและถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากถูกรุกพื้นที่ป่าเพื่อใช้เป็นที่อยู่อาศัยของมนุษย์ ถูกล่าเพื่อใช้เป็นอาหาร และเพื่อการค้า แต่มีอยู่สถานที่หนึ่งซึ่งมีเต่าเหลืองอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก คือที่หมู่บ้านกอก ในจังหวัดขอนแก่น ในอดีตพื้นที่นี้เคยเป็นป่าไผ่ ซึ่งเป็นอาหารหลักของเต่าเหลือง แต่เมื่อประมาณ 20 ปีก่อน มนุษย์ได้เข้ามารุกรานพื้นที่ป่าเพื่อสร้างที่อยู่อาศัย ทำให้เต่ามีจำนวนลดลงเนื่องจากที่อยู่อาศัยถูกทำลาย อย่างไรก็ตามจากความเชื่อเกี่ยวกับผีบรรพบุรุษและวิถีชีวิตของคนในหมู่บ้านทำให้สามารถป้องกันการสูญพันธุ์ของเต่าเหลืองจากการล่าได้ในระดับหนึ่ง ปัจจุบันการอยู่ร่วมกันระหว่างคนกับเต่าของที่นี่เป็นเรื่องที่น่าสนใจต่อการท่องเที่ยว ดังนั้น การศึกษานิเวศวิทยาประชากรและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของเต่าชนิดนี้จึงเป็นเรื่องที่มีความจำเป็นอย่างมากเพื่อหาแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์เต่าเหลืองและวางแผนการจัดการการท่องเที่ยวของเต่าเหลืองที่บ้านกอก อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาขนาดและโครงสร้างประชากรของเต่าเหลือง อัตราการเจริญเติบโต ความแตกต่างระหว่างเพศ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเต่าเหลืองตั้งแต่วัยเด็กไปจนถึงตัวเต็มวัย ชีววิทยาการสืบพันธุ์ชนิดของ อาหารและปัจจัยทางชีววิทยาที่มีผลต่อการอยู่รอดของเต่าเหลืองที่บ้านกอก อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่น

2. เพื่อเสนอแนะแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์เต่าเหลืองและวางแผนการจัดการการท่องเที่ยวที่หมู่บ้านกอก ตำบลสวนหม่อน อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่น

วิธีการศึกษา

พื้นที่ศึกษา คือ ที่หมู่บ้านกอก ตำบลสวนหม่อน อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่น ซึ่งมีเต่าอาศัยอยู่ร่วมกับประชาชนในท้องถิ่นเป็นจำนวนมาก หมู่บ้านนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นหมู่บ้านและสวนเต่า ซึ่งถูกกั้นแบ่งไว้เพื่อให้นักท่องเที่ยวเข้ามาเต่าได้สะดวกและใช้เป็นสวนสาธารณะประจำหมู่บ้าน การศึกษาที่นี่ใช้ระยะเวลา 2 ปี โดยเก็บข้อมูลทุกหนึ่งเดือน และศึกษาเฉพาะในภาคสนาม วิธีการศึกษาโดยการจับแล้ว

ปล่อย และในการจับเต่าแต่ละครั้งไม่ต้องทำการสลบเต่าก่อน สามารถจับเต่าขึ้นชั่งน้ำหนัก และวัดขนาดได้เลย เพราะเต่าเชื่องและนิ่ง มันจะหดหัว แขน และขา เข้ากระดองทำให้ง่ายต่อการศึกษา ขั้นตอนการศึกษาต่าง ๆ มีดังนี้

1. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

โดยการติดตามเต่าที่ติดรหัสและบันทึกน้ำหนัก ความกว้าง ความยาว และความสูง ทุกเดือน เป็นระยะเวลา 2 ปี เมื่อทำการบันทึกเสร็จในแต่ละครั้งจะปล่อยกลับสู่ธรรมชาติ

2. ศึกษาความแตกต่างระหว่างเพศของเต่าเหลือง (Sexual dimorphism)

โดยใช้เต่าตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 30 ตัว วัดรูปร่าง วัดเกล็ดทั้งกระดองและกระดองล่าง รวมทั้งความยาวของหาง และวิเคราะห์โดยการใช้สถิติ t-test

3. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเต่าจากวัยเด็กจนถึงตัวเต็มวัย (Ontogeny)

โดยการวัดรูปร่าง วัดเกล็ด ทั้งกระดองบนและกระดองล่าง จำนวนของเต่าที่ใช้ศึกษาในแต่ละอายุใช้เพศละ 10 ตัว ผลของค่าเฉลี่ยของแต่ละลักษณะจะถูกทำการเปรียบเทียบในเต่าแต่ละกลุ่ม โดยการใช้ NOVA เพราะเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลตั้งแต่ 2 ชุดขึ้นไป

หมายเหตุ: การแยกระยะของเต่าจากระยะวัยเด็ก (ไม่แสดงลักษณะทางเพศ) ถึงระยะตัวเต็มวัย (เพศผู้และเพศเมีย) นั้น โดยใช้ขนาดร่างกายและลักษณะการแสดงออกทางเพศขั้นที่สอง (secondary sexual characteristics) เป็นเกณฑ์

4. การศึกษาประชากร (ซึ่งจะรวมทั้งขนาดและเพศ)

ทำโดยการนับจำนวนประชากรของเต่าเหลืองทั้งหมดที่มีอยู่ในหมู่บ้านรวมทั้งในสวนเต่า และเขียนรหัสติดโดยใช้ปากกา magic permanent เต่าแต่ละตัวจะถูกนำมาบันทึกเพศ อายุ น้ำหนัก ความกว้าง ความยาว และความสูง โดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ และเครื่องชั่ง

5. การศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์

โดยการสังเกตและบันทึกพฤติกรรมการสืบพันธุ์ทั้งก่อนและหลังการผสม ตรวจสอบจำนวนไข่ต่อรังรวมทั้งวัดขนาดและชั่งน้ำหนักไข่ และสังเกตการประสบความสำเร็จในการฟักไข่จนเป็นตัว ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาประมาณ 10-15 รัง และศึกษาอัตราการอยู่รอดของลูกเต่าในแต่ละสถานที่ คือ ภายในหมู่บ้านและภายในสวนเต่าที่ละ 100 ตัว ศึกษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยตรวจสอบนับจำนวนลูกเต่าที่เหลืออยู่ทุกสองสัปดาห์

6. การศึกษาชนิดของอาหาร และปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดและการเจริญของเต่าเหลือง

การศึกษาชนิดของอาหาร และปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดและการเจริญของเต่าเหลือง เช่น ผู้ล่า ปรสิต และโรคต่างๆ ซึ่งการศึกษานี้ทำได้โดยการสังเกตและบันทึกผลรวมทั้งเก็บตัวอย่างบางชนิดที่ไม่ทราบเพื่อมาวิเคราะห์ในห้องทดลองว่าเป็นชนิดไหน

7. การวางแผนอนุรักษ์และจัดการ

ผลของการศึกษาจากข้อ 1-6 จะถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อเสนอแนะแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์เต่าเหลือง และวางแผนการจัดการการท่องเที่ยวของเต่าเหลืองที่บ้านกอก จังหวัดขอนแก่น ต่อไป

ผลการศึกษา

1. **การศึกษาขนาดประชากรของเต่าเหลืองที่หมู่บ้านกอก** ตำบลสวนหม่อน อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่น

จากการศึกษาในครั้งที่ 1 ในเดือนพฤษภาคม -มิถุนายน 2550 พบว่า มีจำนวนทั้งหมด 794 ตัว เป็นตัวเต็มวัย 764 ตัว โดยจำแนกเป็นตัวผู้ทั้งหมด 397 ตัว ตัวเมีย 367 ตัว และที่ไม่สามารถจำแนกเพศได้ 30 ตัว แต่การศึกษานี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์เนื่องจากในช่วงปลายเดือนมิถุนายน ถึงเดือนกรกฎาคม จะเป็นช่วงที่เราจะพบเต่าเล็กมากที่สุด ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ผลการศึกษาเพิ่มเติมครั้งที่ 2 ในเดือนพฤษภาคม -สิงหาคม 2552 พบว่า มีจำนวนทั้งหมด 839 ตัว เป็นตัวเต็มวัย 753 ตัว โดยจำแนกเป็นตัวผู้ทั้งหมด 397 ตัว ตัวเมีย 356 ตัว และที่ไม่สามารถจำแนกเพศได้ 86 ตัว ตัวเมียที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีความยาว 340 มิลลิเมตร ตัวผู้ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีความยาว 320 มิลลิเมตร อัตราส่วนเพศ ตัวผู้ : ตัวเมีย = 1.12 : 1

2. **การศึกษาโครงสร้างประชากร**

ผลการศึกษาโครงสร้างประชากรพบว่า โครงสร้างทางอายุและขนาดรูปร่างของประชากร (age and size structure) มีลักษณะคล้ายคลึงกันคือ มีสัดส่วนของตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียมากกว่าวัยเด็ก ประมาณ 62.93% ของจำนวนประชากรทั้งหมดมีอายุมากกว่า 20 ปี และประมาณ 94.99% ของจำนวนประชากรทั้งหมดมีขนาดความยาวกระดองมากกว่า 100 มิลลิเมตร

3. **ศึกษาการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 2 ปี**

การศึกษาการเจริญเติบโตของเต่าเหลืองสำหรับระยะเวลา 2 ปี ขณะนี้เก็บข้อมูลเรียบร้อยแล้วและรอการวิเคราะห์

4. **ศึกษาความแตกต่างทางเพศของเต่าเหลืองเพศผู้และเพศเมีย**

จากการศึกษามอร์โฟเมตรีของเต่าเหลืองโดยวัดลักษณะต่างๆบนกระดอง 119 ลักษณะ และวิเคราะห์โดยใช้สถิติ t-test และ Discriminant Function Analysis

1. พบลักษณะที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งหมด 1 ลักษณะ (โดยใช้สถิติ t- test) และเมื่อใช้สถิติ Mann-Whitney test พบลักษณะที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งหมด 32 ลักษณะ
2. จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Simple Linear Regression Analysis) ระหว่างแต่ละลักษณะกับความยาวกระดองบน สามารถสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นตรงอย่างง่ายเพื่อใช้ในการทำนายขนาดของลักษณะต่างๆของกระดองเต่าเหลืองเพศผู้และเต่าเหลืองเพศเมีย ได้ทั้งหมด 77 ลักษณะ ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

5. **ศึกษาการเจริญเติบโตของเต่าเหลืองตั้งแต่วัยเด็กจนโตเต็มวัย** (Ontogeny)

ผลการศึกษา Ontogeny ขณะนี้เก็บข้อมูลเสร็จเรียบร้อยแล้ว และรอการวิเคราะห์

6. **ศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์**

- พฤติกรรมการผสมพันธุ์ เต่าเหลืองมักมีการจับคู่ผสมพันธุ์ในฤดูฝน ส่วนฤดูร้อนพบบ้างเล็กน้อย (ในกรณี

ที่มีอากาศเย็นสบาย หรือฝนตกนอกฤดู) ส่วนฤดูหนาวจะไม่พบ ในการจับคู่ผสมพันธุ์ และพบว่า เต่าตั้งแต่อายุ 6 ปี เริ่มสามารถผสมพันธุ์ได้

ส่วนการวางไข่ จากการสังเกตพบว่า เต่ามีการวางไข่มากช่วงเดือนตุลาคม ไปจนถึงมีนาคม ส่วนในเดือนอื่นๆมักมีบ้างประปราย เนื่องจากพบได้จากไข่ใหม่ที่พบบนพื้นดินซึ่งแม่เต่าไม่ได้กลบ)

- <u>การศึกษาจำนวนไข่ต่อรัง</u>

พบว่าแม่เต่า 1 ตัว สามารถไข่ได้ 1- 9 ใบต่อรัง

* ส่วนระยะเวลาในการฟักไข่ยังต้องรอผลการศึกษา

- <u>การศึกษาอัตราการอยู่รอดของลูกเต่าเหลือง</u> ใน 2 พื้นที่ คือ ภายในสวนเต่า และสวนในหมู่บ้านเป็นระยะเวลา 3 เดือน

ผลจากการศึกษาพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป ลูกเต่าที่เกิดใหม่จำนวน 100 ตัวที่ปล่อยภายในสวนเต่า มีจำนวนลดลง และไม่พบอีกเลยเมื่อครบ 3 เดือน ส่วนลูกเต่าที่ปล่อยภายในสวนหมู่บ้านก็เช่นเดียวกันคือ เมื่อครบ 3 เดือน ก็หาไม่พบอีกเลย

7. **ศึกษาลักษณะอาหารของเต่าเหลือง**

<u>ผลการศึกษาอาหารของเต่าเหลือง</u>

พบว่าเต่าเหลืองเป็นสัตว์ที่กินอาหารได้หลากหลายทั้งพืชผักชนิดต่างๆเช่น ผักบุ้ง ตำลึง ผักคะน้า ผักกาด ผักปลัง ผักขม เป็นต้น ซึ่งพืชเหล่านี้บางชนิดเป็นพืชสวนครัว บางชนิดเป็นพืชที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนผลไม้ที่เต่าเหลืองกินได้มักเป็นผลไม้สุก เช่น ชมพู่ มะม่วง ลูกยอ ฝรั่ง ลูกตำลึง ลูกตะขบ แตงโม แตงกวา แตงไทย ขนุน มะเฟือง มะขามเทศ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าหญ้าหรือวัชพืชต่างๆก็สามารถกินได้ (รอการวิเคราะห์ว่าเป็นพืชชนิดใด) รวมทั้งเห็ดเล็กๆ และดอกไม้ที่ร่วงตกอยู่บนพื้น รวมทั้งพบว่ามันสามารถกิน ไส้เดือน และ ซากสัตว์ที่เน่าเปื่อย เช่น หนู กบ และพวกเต่าด้วยกันเองที่ตายแล้วและส่งกลิ่นเหม็น เป็นต้น สิ่งอื่นๆที่นอกเหนือจากนี้ที่พบเช่น ข้าวเหนียวที่ชาวบ้านวางไว้ให้กิน มูลสัตว์ และอาหารเม็ด เป็นต้น ในการศึกษานี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์เนื่องจากข้อมูลยังไม่มากพอ และมักไม่ค่อยพบเต่าขณะที่กินอาหารในสภาพแวดล้อมปกติ

<u>ผลการศึกษา ศัตรู และปรสิต ที่มีผลต่อการอยู่รอดของเต่าเหลือง</u>

จากการสังเกตพบว่า ศัตรูธรรมชาติที่พบในพื้นที่นี้คือ มด ซึ่งมีเป็นจำนวนมากทั่วพื้นที่ของหมู่บ้าน (ยังไม่ได้จำแนกชนิด) มดเหล่านี้จะเข้ารุมทำร้ายกัดและกิน เต่าเล็กที่อ่อนแอ และตายในที่สุด

ส่วนปรสิต : จากการสังเกตไม่พบเห็บ หรือหมัดบนตัวเต่า แต่พบพยาธิในเต่าเป็นจำนวนมากจากอุจจาระ (ยังไม่ได้จำแนกชนิด)

<u>ผลการศึกษาโรคที่มีผลทำให้เต่าตาย</u> : ในการศึกษานี้ไม่สามารถระบุโรคที่ทำให้เต่าตายได้ เนื่องจากไม่สามารถทำการผ่าชันสูตร หรือตรวจเช็คเนื้อเยื่อได้ เนื่องจากทางหมู่บ้านไม่อนุญาต และเมื่อพบเต่าซึมและตายชาวบ้านมักนำไปฝังทันที ส่วนสาเหตุที่ทำให้เต่าตายได้แก่ รถ มักพบเต่าถูกรถชนอยู่บ่อยๆ

สรุปผลและวิจารณ์

การศึกษาวิวัฒนาการการเจริญเติบโตของเต่าเหลืองตั้งแต่วัยเด็กจนโตเต็มวัย การเจริญเติบโต ขนาด และโครงสร้างของประชากรของเต่าเหลืองที่หมู่บ้านกอก ยังต้องรอผลจากการศึกษา จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้ ส่วนการศึกษาความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียพบว่ามีความแตกต่างระหว่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p < 0.05$) ทั้งหมด 1 ลักษณะ (โดยใช้สถิติ t- test) และเมื่อใช้สถิติ Mann-Whitney test พบลักษณะที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งหมด 32 ลักษณะ

การศึกษาโครงสร้างทางขนาดและอายุของประชากรพบว่าในอนาคตประชากรเต่าเหลืองควรจะมีขนาดลดลง ทั้งนี้เนื่องจากในอนาคตวัยเจริญพันธุ์จะไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ ในขณะที่วัยก่อนเจริญพันธุ์ซึ่งจะเติบโตมาทดแทนเป็นวัยเจริญพันธุ์มีจำนวนน้อย เพราะฉะนั้นในอนาคตวัยเจริญพันธุ์ของประชากรนี้จะมีจำนวนน้อย ดังนั้นประชากรจึงมีแนวโน้มลดลง

สำหรับการศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของเต่าเหลืองที่บ้านกอก สรุปได้ว่า ฤดูฝนเป็นฤดูที่มีการจับคู่ผสมพันธุ์กันมากที่สุด ส่วนในฤดูร้อนจะน้อยที่สุดทั้งนี้เนื่องจากมีอากาศร้อนมาก แต่การที่พบเห็นบ้างในบางครั้งเพราะสภาพภูมิอากาศที่มีการเปลี่ยนแปลง มีฝนตกหลงฤดูทำให้มีอากาศชื้นเย็นสบายเหมาะแก่การผสมพันธุ์ และหลังจากนั้นจะเริ่มทยอยวางไข่ในช่วงเดือนตุลาคม ถึงเดือนกุมภาพันธุ์ ไข่จะเริ่มทยอยฟักเป็นตัวและพบเห็นได้มากในช่วงเดือน มิถุนายน ถึง สิงหาคม (ทั้งนี้พบว่าไข่ของเต่าเหลืองจะออกไม่พร้อมกัน) ใน 1 รัง อาจมีไข่ได้ตั้งแต่ 1- 9 ฟอง อัตราการอยู่รอดของลูกเต่าเหลืองที่บ้านกอกพบว่ามีน้อยมาก เนื่องจากในพื้นที่หมู่บ้านกอกมีมด เป็นจำนวนมากซึ่งเป็นศัตรูที่สำคัญสำหรับลูกเต่าที่เพิ่งเกิดใหม่และอ่อนแอ และในอีกกรณีหนึ่งที่ไม่พบเต่าเล็กที่ติดรหัสไว้เนื่องจากอาจมีการกระจายไปไกลกว่าจุดเดิมและหลบซ่อนในที่รก ๆจึงหาไม่พบ แต่อีกกรณีหนึ่งที่อาจเป็นไปได้ก็คือตายหมด ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อตรวจเช็คจำนวนประชากรเต่าเหลืองทั้งหมดภายในหมู่บ้านและภายในสวนเต่า เราจะพบว่าเต่าเล็กที่มีอายุ 1-7 ปี มีน้อยมาก

ส่วนระยะเวลาในการฟักไข่ยังต้องรอผลการศึกษา

จากการศึกษาลักษณะอาหารที่เต่าเหลืองกินได้ สามารถสรุปได้ว่า เต่าเหลืองเป็นสัตว์ที่กินง่าย และกินได้ทั้งพืชและสัตว์ เช่น ผลไม้สุก เห็ด พืชผักสวนครัวที่ชาวบ้านปลูก วัชพืช หรือผักหญ้าที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ไส้เดือน ซากสัตว์ที่เน่าเปื่อย และอาหารอื่นๆที่ชาวบ้านให้เช่น ข้าว อาหารเม็ด รวมทั้งมูลสัตว์ เป็นต้น ดังนั้นเต่าเหลืองจึงมีชีวิตอยู่ร่วมกับชาวบ้านดี ส่วนโรคที่ทำให้เต่าตายไม่สามารถสรุปได้ เพราะการศึกษานี้ไม่สามารถทำการผ่าตรวจสอบได้ แต่จากความเจริญของสังคม ความประมาท มีผลทำให้เต่าตายมากที่สุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลของการศึกษานี้เพื่อใช้เป็นความรู้พื้นฐานต่อการศึกษานิเวศวิทยาประชากรและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของเต่าเหลือง *Indotestudo elongata* ที่บ้านกอก จังหวัดขอนแก่น และจะเป็นประโยชน์ต่อจัดการการท่องเที่ยวที่หมู่บ้านกอก ตำบลสวนหม่อน อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่นในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Auffenberg, W. and Iverson, J. B. 1979. Demography of terrestrial turtles. In M. Harless and N. Morlock (eds), Turtles: perspectives and research, pp. 541-569. New York: Wiley.

Blyth, E. 1853. Notices and descriptions of various reptiles, new or little known. Journal of the Royal Asiatic Society of Bengal. 22(7): 639-655.

Bour, R. 1980. Essai sur la taxinomie des Testudinidae actuels (Reptilia, Chelonii).

Bulletin of the American Museum of Natural History Paris. (4) A(2): 541-546. Cited in J. B. Iverson, P.Q. Spinks, H. B. Shaffer, W. P. McCord, and I. Das. 2001. Phylogenetic relationships among the Asian tortoises of the Genus *Indotestudo* (Reptilia: Testudines: Testudinidae). Hamadryad. 26(2): 273.

Chen, T. H. and Lue, K. Y. 2002. Growth Patterns of the Yellow-Margined box turtle (*Cuora flavomarginata*) in Northern Taiwan. Journal of Herpetology. 36(2): 201-208.

Crumly, C. R. 1982. A cladistic analysis of Geochelone using cranial osteology. Journal of Herpetology. 16(3): 215-234.

Crumly, C. R. 1984. A hypothesis for the relationship of land tortoise genera (family Testudinidae). Studia Geologica Salmanticensia, Vol. Especial 1. Studia Palaeochelonologica 1: 115-124. [Published in 1985]. Cited in J. B. Iverson, P.Q. Spinks, H. B. Shaffer, W. P. McCord, and I. Das. 2001. Phylogenetic relationships among the Asian tortoises of the Genus *Indotestudo* (Reptilia: Testudines: Testudinidae). Hamadryad. 26(2): 272.

Das, I. 1991. Colour guide to the turtles and tortoises of the Indian subcontinent. Avon: R&A Publishing.

Das, I. 1995. Turtles and tortoises of India. Bombay: Oxford University Press.

Das, I., Dattagupta, B. and Gayen, N. C. 1998. History and catalogue of reptile types of the zoological survey of India. Journal of South Asian Natural History. 3(2): 121-172.

Ernst, C. H. and Barbour, R. W. 1989. The turtles of the world. Washington: Smithsonian Institution Press.

Goin, G. T. and Goin, O. B. 1971. Introduction to herpetology. San Francisco: W.H. Freeman and Company. 353p.

Hendrie, D. 1998. "Protecting Viet Nams turtles", Report of the Cuc Phuong Conservation Projekt, October 1998. [On-line]. Available from: http://www.cites.org/eng/cop/11/doc/35.pdf - [February 27, 2008]

IUCN, 2007. IUCN Red List of Threatened Species. [On-line]. Available from: http://www.iucnredlist.org. [February 26, 2008].

Jenkins, M. D. 1995. Tortoises and freshwater turtle: the trade in Southeast Asia.

Cambridge: Traffic International. Cited in P.P. van Dijk. The Natural history of the elongated tortoise, *Indotestudo elongata* (Blyth, 1853) (Reptilia: Testudines) in a hill forest mosaic in western Thailand, with notes on sympatric turtle species. Doctoral dissertation. Department of Zoology, Faculty of Science, National University of Ireland, 1998.

Lindholm, W. A. 1929. Revidiertes Verzeichnis der Gattung der rezenten Schildkroten nebst Notizen zur Nomenklatur einiger Arten. Zool. Anz. 81: 275-295. Cited in J. B. Iverson, P.Q. Spinks, H. B. Shaffer, W. P. McCord and I. Das. 2001. Phylogenetic relationships among the Asian tortoises of the Genus *Indotestudo* (Reptilia: Testudines: Testudinidae). Hamadryad. 26(2): 272.

Loveridge, A. and Williams, E. E. 1957. Revision of the African tortoises and turtles of the Suborder Cryptodira. Bulletin of the Museum Comparative Zoology at Harvard. 115(6): 163-557.

Moll, E. O. 1989. Tortoises of tropical Asia: regional introduction; *Geochelone platynota*, Burmese Star Tortoise; *Indotestudo elongata*, Elongated Tortoise; *Manouria emys*, Asia, Brown Tortoise; *Manouria impressa*, Impressed Tortoise. In I. R. Swingland and M. W. Klemens (eds), The Conservation Biology of Tortoises, pp. 111-122 Switzerland: IUCN.

Nutaphand, W. 1979. The turtles of Thailand. Siamfarm Zoological Garden. Bangkok.

Smith, M. A. 1931. The fauna of British India, including Ceylon and Burma. Reptilia and Amphibia, Vol 1. Loricata, Testudines. London.

Sutthitham, T., Intachakra, T., Verakul, S. and Sanoamuang, L. 1996. The study on ecosystem and planning layout for tourism development at Ban Kok Village, Mancha Khiri District, Khon Kaen Province. (in Thai). Khon Kaen: Khon Kaen University. (Mimeographed)

Tharapoom, K. 1996. Radio-Telemetry study of home range size and activities of elongated tortoise *Indotestudo elongata* (Blyth,1853 at Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary. Master's Thesis. Department of Biology, Graduate School, Chulalongkorn University.

Thirakhupt, K. and van Dijk, P. P. 1994. Species diversity and conservation of turtles of western Thailand. Natural History Bulletin of the Siam Society. 42: 207-259.

van Dijk, P. P. 1998. The Natural history of the elongated tortoise, *Indotestudo elongata* (Blyth, 1853) (Reptilia: Testudines) in a hill forest mosaic in western Thailand, with notes on sympatric turtle species. Doctoral dissertation. Department of Zoology, Faculty of Science, National University of Ireland.

Znari, M., Germano, D. J. and Mace, J.C. 2005. Growth and population structure of the Moorish Tortoise (*Testudo graeca graeca*) in Westcentral Morocco: possible effects of over-collecting for the tourist trade. Journal of Arid Environments. 62: 55-74.

โครงการ CEB_D_19_2009

CEB_D_19_2009

ชื่อ-นามสกุล นายพิสิษฐ์ พลูประเสริฐ **เลขประจำตัว** 5073924323
หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

อนุกรมวิธานของแมลงปั่นใยในภาคตะวันตกของประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Taxonomy of webspinners (Insecta: Embiidina) in western Thailand

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ จริยา เล็กประยูร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงแข สิทธิเจริญชัย
อาจารย์ ดร. บัณฑิกา อารีย์กุล บุทเซอร์

คำนำ

แมลงปั่นใย (webspinners) จัดอยู่ในอันดับ Embioptera หรือ Embiidina มีสมาชิกกระจายอยู่ทั่วโลก ทั้งในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนประมาณ 2,000 ชนิด ในประเทศไทย แมลงปั่นใยยังมีการศึกษากันน้อยมาก ซึ่งเป็นแมลงที่น่าสนใจในเรื่องของพฤติกรรมทางสังคม นิเวศวิทยา ลักษณะบางประการทางสัณฐานวิทยาแบบโบราณ และชีววิทยาทางวิวัฒนาการ ซึ่งต้องรอการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในประเทศไทยต่อไป การศึกษาจะดำเนินการในพื้นที่ภาคตะวันตกของประเทศไทยที่ครอบคลุมถึง 5 จังหวัด (ตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์) ซึ่งประกอบไปด้วยความหลากหลายของป่าไม้ (อักขรานุกรม ภูมิศาสตร์ประเทศไทย, 2545) แมลงปั่นใยอาศัยอยู่ได้ในป่าไม้หลายประเภท (Ross, 2000) ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จะให้ความสนใจในเรื่องของความหลากหลายของชนิดและสัณฐานวิทยาของแมลงปั่นใยในภาคตะวันตกของประเทศไทย ซึ่งบริเวณนี้ยังไม่มีข้อมูลมาก่อน โดยจะบรรยายลักษณะภายนอกโดยละเอียดและให้ข้อมูลทางชีววิทยาบางประการและนิเวศวิทยารวมทั้งกรแพร่กระจายในแหล่งที่สำรวจ และสร้างไดโคโทมัสคีย์และรูปวิธานคีย์เพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางวิชาการต่อไป และเก็บรักษาตัวอย่างที่ได้ศึกษาแล้วในพิพิธภัณฑ์

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์เพิ่มพูนข้อมูลทางวิชาการของแมลงปั่นใยในพื้นที่ภาคตะวันตก นอกจากข้อมูลการสำรวจโดย Rossทางภาคเหนือ และภาคตะวันออก และจากข้อมูลที่มีตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์แมลงในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งในการมีตัวอย่างอ้างอิงของประเทศไทยเพิ่มขึ้นและเพิ่มข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย และอาจมีประโยชน์ในการประยุกต์เพื่อการศึกษาด้านที่เกี่ยวข้องต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชนิด และบรรยายลักษณะทางสัณฐานของแมลงปั่นใยในภาคตะวันตกของประเทศไทย
2. เพื่อสร้างคีย์แบบไดโคโทมัส (Dichotomous Key) และรูปวิธานคีย์ (Pictorial Key) ในระดับ วงศ์ สกุล และ ชนิด ของแมลงปั่นในในภาคตะวันตกของไทย

วิธีการศึกษา

1. พื้นที่ทำการศึกษา

พื้นที่ทำการศึกษาจะเก็บตัวอย่างในภาคตะวันตกของประเทศไทย ซึ่งประกอบไปด้วย 5 จังหวัด คือ ตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และ ประจวบคีรีขันธ์

พื้นที่ของภาคตะวันตกของประเทศไทยมีขนาด 53,675 ตารางกิโลเมตร ทางด้านเหนือติดกับทางด้านใต้ของภาคเหนือ ทางใต้ติดกับ ทางด้านบนของภาคใต้ ทางด้านตะวันออกติดกับทางด้านตะวันตกของภาคกลาง และ ด้านทางตะวันตกติดกับทางด้านตะวันออกของพม่า พื้นที่ป่าไม้โดยทั่วไปประกอบไปด้วย ป่าดิบชื้น ดิบแล้ง ดิบเขา เบญจพรรณ และ เต็งรัง

2. การเก็บและบันทึกข้อมูล

ในแต่ละจังหวัด หลังจากแบ่งสภาพป่าและตรวจสอบสภาพพื้นที่แล้วก็ทำการแบ่งพื้นที่ย่อยของแต่ละประเภทป่าออกเป็น 3 ส่วน โดยในแต่ละส่วนจะกำหนดเส้นทางการสำรวจ 1 เส้น ระยะทาง 1 กิโลเมตร (แต่ละเส้นสำรวจจะมีระยะสำรวจตลอดเส้นทางทั้งทางด้านซ้ายและขวาประมาณด้านละ 2 เมตร) แต่ละเส้นสำรวจจะทำการเดินหาโดยตรงตามแหล่งอาศัยย่อยที่มีโอกาสที่จะเป็นที่อยู่อาศัยของแมลงปั่นใย ซึ่งสังเกตจากแหล่งที่มีมอสส์ ไลเคนส์ เปลือกไม้ และ ใบไม้แห้ง ซึ่งเป็นอาหารของแมลงปั่นใยที่อยู่ในบริเวณที่พบ เช่น เปลือกของต้นไม้ (ที่มักมีรอยแตก) รอยแตกตามก้อนหิน และตามเศษซากใบไม้แห้ง ตัวอย่างที่พบจะเก็บด้วยมือ และอุปกรณ์ช่วยต่างๆ ประกอบด้วย เครื่องดูดแมลงขนาดเล็ก คีมหนีบ พู่กัน สิ่ว และถาด หรือขวด พลาสติก ทำการบันทึกรูปแบบของรัง สีของใยไหม ลักษณะแหล่งอาศัยทางนิเวศ บันทึกความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน และระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลและตำแหน่งพิกัดทางภูมิศาสตร์ โดยมี GPS เป็นเครื่องมือในการบันทึกพิกัด จะทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาปี 2552 – 2554 โดยครอบคลุมในทั้งฤดูแล้งและฝน สำหรับแมลงปั่นใยที่อยู่ในระยะไข่ หรือตัวอ่อนจะนำกับมาเลี้ยงและติดตามผลต่อไปในห้องปฏิบัติการ ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การวิเคราะห์ตัวอย่างและการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

3.1 การเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

กลุ่มไข่จะเก็บกลับมาพร้อมกับพืชอาหาร ตัวอ่อนจะเลี้ยงในกล่องพลาสติก และให้อาหารที่มีตามสภาพธรรมชาติ หรือ โดยการประยุกต์ โดยใช้ใบผักกาด หรือ ปีกแมลงสาบ มาใช้เป็นอาหารของแมลงปั่นใย ทำการเก็บในที่อุณหภูมิที่มีความเย็นและร่มเงาพอ และรักษาให้มีความชื้นอยู่เสมอ ตัวอย่างของการเก็บมาเลี้ยง จะนำกลับมาให้มากพอเพื่อใช้เพศผู้สำหรับการวินิจฉัยชนิด

3.2 การเก็บรักษาและการทำสไลด์ตัวอย่าง

ตัวเต็มวัยที่ตายแล้วจะทำการเก็บรักษาไว้ที่แอลกอฮอล์ 70 % และนำตัวอย่างบางส่วนมาทำสไลด์ตามวิธีการของ Ross (2000)

3.3 การจัดจำแนกชนิดและการจัดคำบรรยายรายละเอียด

ตรวจสอบชนิดของแมลงปั่นใยภายใต้จุลทรรศน์สเตอริโอ รุ่น Stermi DV4 โดยศึกษาลักษณะสำคัญของแต่ละวงศ์ สกุล และชนิด รวมทั้งทำการวัดสัดส่วนตัวอย่างต่างๆ ที่ใช้จำแนก ได้แก่ อวัยวะเพศผู้ (male genitalia) รูปแบบของปีก papillae ของด้านขาหลัง รวมทั้งบริเวณสีต่าง ๆที่มี ทั้งส่วนหัว อก และท้อง และจัดทำคำบรรยายลักษณะโดยละเอียดของแต่วงศ์ สกุล และชนิด พร้อมแสดงรูปวาดหรือรูปถ่ายประกอบคำบรรยาย

3.4 การวาดรูปและการถ่ายภาพ

การวาดรูปจะวาดในส่วนที่เป็นลักษณะที่สำคัญที่ใช้ในการาแยกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โดยจะร่างด้วยดินสอและตามด้วยปากกาสำหรับวาดรูป สำหรับการถ่ายภาพจะเลือกตัวอย่างที่เก็บไว้มาถ่ายลักษณะที่สำคัญต่าง ๆ ผ่านภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเช่นกัน

3.5 การวิเคราะห์และแปลความหมายข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจและศึกษารายละเอียดนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่แล้วในประเทศไทย รวมทั้งการวิเคราะห์แหล่งที่อยู่อาศัยกับข้อมูลทางกายภาพบางประการ ตัวอย่างแมลงปั่นในหลังจากทำการศึกษาแล้ว จะมีการหนดรหัส CUMZ และหมายเลขรหัสประจำตัวของแต่ละตัวอย่าง เพื่อความสะดวกในการจัดทำฐานข้อมูล ตัวอย่างดังกล่าวจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงของพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยา แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CUMNH) เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงทางอนุกรมวิธานต่อไป

3.6 การสร้างคีย์

ทำการสร้างคีย์แบบไดโคโทมัสคีย์และรูปวิธานคีย์ ตั้งแต่ระดับ วงศ์ สกุล และชนิด และแสดงภาพประกอบลักษณะสำคัญ

4. การวิเคราะห์ผลและการอธิบายผล

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา จะใช้เอกสารของ Ross (1970 และ 2007) และ Szumik (1996 และ 2008) ทั้งระดับวงศ์ สกุล และชนิด ตัวอย่างบางชนิดจะทำการส่งไปตรวจสอบโดยผู้เชี่ยวชาญเพื่อทำการยืนยัน (โดยเฉพาะชนิดใหม่ๆ ที่พบ) และยึดหลักไปตามกฎของ ICZN (1999)

ทำบัญชีรายชื่อชนิดของแมลงปั่นใยที่พบ แมลงปั่นใยที่ได้จะทำการเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์แมลงของพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยา แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CUMNH)

ผลการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้พบแมลงปั่นใยที่แพร่กระจายอยู่ในภาคตะวันตกของไทยมี 4 วงศ์ 7 สกุล 7 ชนิด10 รูปแบบสัณฐาน และไม่สามารถระบุสกุลได้ 1 ชนิด ได้แก่ วงศ์ Embiidae พบ 1 สกุล คือ 1. *Odembia* พบ 2 ชนิด คือ *Odembia* sp.1 และ *O.* sp.2 วงศ์ Notoligotomidae พบ 1 สกุล คือ1. *Ptilocerembia* พบ 4 ชนิด คือ *Ptilocerembia* sp. 1. *P.* sp. 2, *P.* sp. 3 และ *P.* sp.วงศ์ *Oligotomidae* พบ 4 สกุล คือ สกุล *Aposthonia* พบ 4 ชนิด คือ *Aposthonia borneensis, A. ceylonica, A.* sp.1และ *A.* sp.2 สกุล *Eosembia* พบ 3 ชนิด คือ *Eosembia auripiceta, E.* sp. และ *E.* sp. 2สกุล *Lobosembia* พบ 1 ชนิด คือ *Lobosembia mandibulata* และ สกุล *Oligotoma* พบ 3 ชนิด คือ *Oligotoma humbertana, O. nigra* และ*O. saundersii* และ วงศ์ *Teratembiidae* พบ 1 สกุล ซึ่งยังไม่สามารถระบุสกุลได้ในขณะนี้ โดยพบวงศ์ Oligotomidae ได้ทั่วภาคตะวันตก และพบแหล่งอาศัยที่มีความหลากหลายมีทั้งที่เป็นป่าตลอดจนสวนผลไม้ต่าง ๆ

สรุปผลและวิจารณ์

ตัวอย่างของแมลงปั่นใยบางชนิดยังไม่สามารถวินิจฉัยได้ชัดเจน เนื่องจากยังเป็นตัวอ่อน จึงต้องนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการต่อไป ตัวเต็มวัยเพศผู้บางชนิดที่ศึกษายังไม่สามารถวินิจฉัยชื่อได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากเอกสารที่มอยู่ไม่เพียงพอ ต้องสืบค้นเอกสารเพิ่มเติม จึงยังต้องคงรอผลการศึกษาต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของแมลงปั่นใยในประเทศไทยจะได้รับข้อมูลรายละเอียดทางด้านสัณฐานวิทยาเป็นหลักของการใช้วินิจฉัยชนิดของแมลงปั่นใยในประเทศไทย

2. การศึกครั้งนี้จะได้คีย์แบบไดโคโทมัสคีย์และรูปวิธานคีย์ ตั้งแต่ระดับ วงศ์ สกุล และชนิด ที่สามารถใช้ในการจัดจำแนกและวินิจฉัยแมลงปั่นในจากภาคตะวันตกของประเทศไทยได้

เอกสารอ้างอิง

Argaman, Q., and Mendel, Z.1991. Damage by webspinners (Insecta: Embioptera) in Israel. Tropical Pest Management. 37: 101.

Edgerly, J. S. 1987. Maternal behaviour of a webspinner (Order Embiidina). Ecological Entomology 12: 1–11.

Edgerly, J. S. 1988. Maternal behaviour of a webspinner (Order Embiidina): Mother–nymph associations. Ecology Entomology. 13: 263–272.

Fontana, P. 2002. Contribution to the knowledge of Mediterranean Embiidina with description of a new species of the genus Embia Latreille, 1825 from Sardinia (Italy) (Insecta Embiidina). Atti della Accademia Roveretana degli Agiati Serie 8 B Classe di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali. 2B: 39-50.

Lee, S., Han, M.-J. and Woo, K.-S. 2002. New record of a web-spinner, *Oligotoma saundersii* (Embiidina,Oligotomidae) in Korea. Korean Journal of Systematic Zoology. 18: 121-125.

Okajima, G. 1926. Description of a new species of *Oligotoma* from Japan together with some notes on the family Oligotomidae (Embiidina). Journal of the College of Agriculture. Imperial University of Tokyo 7: 411-432.

Ross, E. S. 1957. The Embioptera of California. Bulletin of the California Insect. Survey.6 : 51-57.

Ross, E.S. 1960. Pathenogenetic African Embiotera. The Wasmann Journal of Biology.18 : 297-304

Ross, E.S. 1970. Biosystematics of the Embioptera. Annual Review Entomology. 15:157-171.

Ross, E.S. 1978. The Embiidina of China. Memoirs Hongkong Natural History Society. 13: 1-8.

Ross, E.S. 1991. Embioptera (Embiidina). In CSIRO (ed). The Insects of Australia. A Textbook for Students and Research Workers, 2nd ed. pp. 405-409. Melbourne University Press,Carlton, Australia. 2 volumes.

Ross, E. S. 1999. World List of Extant and Fossil Embiidina (= Embioptera). California Academy of Science. Available from http://research.calacademy. org/research/entomology/Entomology_Resources/embiilist/embiilist.html

Ross, E.S. 2000. EMBIA, Contributions to the biosystematics of the insect order Embiidina. Occasional Papers of the California Academy of Science, 149 (Part 1):1-53 and (Part 2): 1-36.

Ross, E.S. 2007. The Embiidina of Eastern Asia, Part I. Proceedings of the California of Academy of

Sciences. 58 : 575-600.

Szumik, C. 1996. The higher classification of the order Embioptera: A cladistic analysis. Cladistics 12: 41-64.

Szumik, C. 1999. Avance sorbre la biología de Pararhagadochir trachelia (Navás) (Embioptera: Embiidina). Boletin de Entomologia Venezolana, 14 : 81-85.

Szumik, C., Edgerly, J. S., and Hayashi, C. Y. 2008. Phylogeny of embiopterans (Insecta). Cladistics 24: 993–1005.

The International Commission on Zoological Nomenclature. 1999. International Code of Zoological Nomenclature, Fourth Edition. The International Trust of Zoological Nomenclature 1999, London. 306 p.

Yang, C. 1999. Embioptera, Oligotomidae. Fauna of Insects Fujian Province of China. 3: 65-67.

โครงการ CEB_D_23_2010

CEB_D_23_2010

ชื่อ-นามสกุล นางสาวณัฐรินทร์ วงศ์ธรรมวานิช **เลขประจำตัว** 5073840223
หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ความหลากหลายของชนิดและนิเวศวิทยาประชากรของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ วงศ์ Zephroniidae ในจังหวัดน่าน

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Species diversity and population ecology of giant pill millipedes, Family Zephroniidae in Nan Province

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. กำธร ธีรคุปต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา

คำนำ

ปัจจุบันการศึกษา วิจัยที่เกี่ยวข้องกับกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ ที่ปรากฏทั่วโลกมีจำนวนน้อยมาก เอกสารที่ปรากฏส่วนใหญ่เป็นการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่สุดสำหรับการศึกษาทางด้านอื่นๆ ต่อไป Wesener (2009) จำแนกกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ออกเป็น 4 วงศ์ ได้แก่ Sphaerotheriidae, Zephronidae, Procyliosomatidae และ Arthrosphaeridaeสำหรับในเขตสัตวภูมิศาสตร์แบบโอเรียนตอล (oriental region) มีการกระจายของกิ้งกือ Family Zephroniidae จากการศึกษาของ Enghoff (2005) พบว่ามีกิ้งกือในประเทศไทยทั้งหมด 123 ชนิด แต่ทั้งนี้มีการรายงานกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ไว้เพียงชนิดเดียวคือ *Zephronia siamensis* บนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี และจังหวัดจันทบุรีเท่านั้น การเก็บข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นส่วนหนึ่งของภาคตะวันออกจากประเทศไทยเท่านั้น

บทบาทในระบบนิเวศที่สำคัญของกิ้งกือส่วนใหญ่ คือเป็นสัตว์กินซากอินทรีย์ (detritivore) แต่การศึกษานิเวศวิทยาเกือบทุกด้านของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์นับว่ายังขาดแคลน ทำให้ไม่สามารถทราบประโยชน์ โทษ หรือวางแผนการอนุรักษ์ได้ทันท่วงที ทำให้กิ้งกือบางชนิดอาจสูญพันธุ์ไปก่อนที่จะมีการศึกษารายละเอียด การศึกษาครั้งนี้จะช่วยในการปรับปรุงการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ วงศ์ Zephorniidae ในประเทศไทย นอกจากนี้การศึกษานิเวศวิทยาประชากรของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์บางชนิดทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยา เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ในประเทศไทย และการอนุรักษ์ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิดและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ในจังหวัดน่าน
2. เพื่อศึกษาขนาดประชากร การกระจาย ช่วงเวลาในการทำกิจกรรม อาหาร นิเวศการสืบพันธุ์ การเจริญเติบโต และความแตกต่างระว่างเพศของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ที่ป่าไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาความหลากหลายของชนิดและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์

การดำเนินงานในภาคสนาม การศึกษาความหลากหลายของชนิดและสถานภาพทางอนุกรมวิธานในจังหวัดน่าน ทำการเก็บตัวอย่างกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ในช่วงฤดูฝนโดยการเก็บตัวอย่างโดยตรง (Direct observation)

การดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ ทำการระบุชนิดจากการเปรียบเทียบตัวอย่างกิ้งกือกระสุนพระอินทร์จากจังหวัดน่านกับตัวอย่างกิ้งกือ *Zephronia siamensis* จากเกาะสีชัง และการบรรยายลักษณะของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ในประเทศพม่า เวียดนาม กัมพูชา สิงคโปร์ และมาเลเซีย สำหรับการวิเคราะห์สถานภาพทางอนุกรมวิธานของกิ้งกือจะทำการเปรียบเทียบตัวอย่างต้นแบบจากพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาในต่างประเทศกับตัวอย่างที่เก็บมา

2. การศึกษานิเวศวิทยาประชากรของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์

ศึกษานิเวศวิทยาประชากรของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ ดำเนินการภายในพื้นที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ซึ่งมีพื้นที่ป่าเป็นป่าผลัดใบ ได้แก่ ป่าเต็งรัง และป่าผสมผลัดใบ

2.1 การศึกษาขนาดประชากรและการกระจาย จะทำการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มตัวอย่างโดยใช้แปลงสี่เหลี่ยมขนาด 2×2 ตารางเมตร จำนวน 20 แปลง ภายในแปลงจะวางแปลงขนาด 30×30×30 ตารางเซนติเมตรในมุมทางด้านตะวันตกเฉียงใต้เพื่อศึกษาการกระจายของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ในแนวดิ่งทุกเดือนเป็นเวลา 1 ปี บันทึกจำนวนตัวของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์และปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ความชื้นดิน ความชื้นเศษซากใบไม้ เป็นต้น

2.2 กิจกรรมในรอบวันของกิ้งกือจะทำการศึกษาในฤดูฝน กิจกรรมต่าง ๆ ของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์จะถูกบันทึกทุก ๆ 30 นาที ตลอดทั้งวัน ทำการบันทึกระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุดสำหรับการเคลื่อนที่ในหนึ่งวัน

2.3 อาหารของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์จะสังเกตในพื้นที่ศึกษา โดยส่วนของพืชและเศษซากใบไม้ที่กิ้งกือกำลังกินจะถูกเก็บและเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชหรือภาพถ่ายเพื่อระบุชนิดต่อไป

2.4 ระหว่างการศึกษาในภาคสนาม หากพบนิเวศวิทยาการสืบพันธุ์ต่าง ๆ จะทำการบันทึก เช่น ฤดูการสืบพันธุ์ พฤติกรรมการเกี้ยวพาราสี รูปแบบการสืบพันธุ์ พื้นที่วางไข่และจำนวนไข่

2.5 การศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างเพศของกิ้งกือ จะทำการวัดและเปรียบเทียบกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เพศละ 30 ตัว

ผลการศึกษา

1. การศึกษาความหลากหลายของชนิดและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ในจังหวัดน่าน

จากการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ ในป่าตำบลไหล่น่าน กับ *Zephronia siamensis* Hirst, 1907 บนเกาะสีชัง พบว่า ลักษณะภายนอก เช่น สี จำนวนชั้นของฟันบนริมฝีปากล่าง จำนวนตุ่มรับความรู้สึกที่หนวด รูปร่างของอวัยวะสืบพันธุ์ในเพศผู้และเพศเมีย โครงสร้างของปล้องด้านในฯลฯ แตกต่างกัน แต่ทั้งนี้ต้องทำการเปรียบเทียบกับกิ้งกือสกุล *Zephronia* ชนิดอื่นในพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาในต่างประเทศต่อไป

การเก็บตัวอย่าง ได้กิ้งกือกระสุนพระอินทร์ เป็นจำนวน 28 จุดสำรวจในพื้นที่ป่าเต็งรัง ป่าผสมผลัดใบและป่าดิบแล้ง ในพื้นที่จังหวัดน่าน ทั้งนี้ใน อำเภอนาหมื่น อำเภอทุ่งช้าง อำเภอเฉลิมพระเกียรติ อำเภอบ่อเกลือ และอำเภอบ้านหลวง สำรวจไม่พบกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะทำการศึกษาต่อไป

2. การศึกษานิเวศวิทยาประชากรของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์

2.1 การศึกษาขนาดประชากรและการกระจาย ขณะนี้เก็บข้อมูลเสร็จเรียบร้อย และรอการวิเคราะห์

2.2 การศึกษากิจกรรมในรอบวัน จากกิ้งกือเพศผู้ 16 ตัว และเพศเมีย 23 ตัว พบว่า กิ้งกือไม่เป็นสิ่งมีชีวิตที่หากินกลางวันและกลางคืน เนื่องจากพบว่ากิจกรรมกินอาหารตลอดทั้งวัน ความถี่ในการเดินจะพบมากในช่วงเช้าทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ทั้งนี้กิ้งกือแต่ละตัวมีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของวัน

2.3 การศึกษาอาหารที่กิ้งกือกระสุนพระอินทร์กิน พบว่าเศษซากใบไม้ส่วนใหญ่ที่กิ้งกือกระสุนพระอินทร์กิน ได้แก่ ใบไผ่ไร่ ใบเสี้ยวดอกขาว และใบประดู่ เป็นต้น โดยลักษณะของเศษซากใบไม้ส่วนใหญ่จะเปื่อย มีความชื้น 100% หรือน้อยกว่าเล็กน้อย

2.4 การศึกษานิเวศวิทยาการสืบพันธุ์ จากการสำรวจในภาคสนามพบว่ากิ้งกือกระสุนพระอินทร์ส่วนใหญ่มีกิจกรรมการผสมพันธุ์ในช่วงต้นฤดูฝน

2.5 การศึกษาการเจริญเติบโต จากการศึกษาในปี 2552-2553 พบกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ขนาดต่างๆ มีการลอกคราบ จำนวนทั้งสิ้น 19 ตัว โดยพบว่ากิ้งกือกระสุนพระอินทร์ที่มีปล้องครบ 13 ปล้องแล้ว มีแนวโน้มในการลอกคราบมากกว่า 5 ครั้ง และมีอายุขัยมากกว่าสองปีจากร่องรอยการถูกไฟไหม้ในปี 2552 ซึ่งในพื้นที่ป่าไหล่น่านไม่มีไฟป่าในปีดังกล่าว

2.6 การศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เก็บตัวอย่างได้เพศผู้และเพศเมีย เพศละ 30 ตัว ทั้งนี้อยู่ระหว่างการเก็บรวบรวมข้อมูล

สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การศึกษานี้จะช่วยปรับปรุงการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ วงศ์ Zephroniidae และจะได้ key ในระดับชนิดพร้อมแผนที่การกระจายของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์ในจังหวัดน่าน

2. การศึกษานี้จะเป็นความรู้พื้นฐานทางด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาของกิ้งกือกระสุนพระอินทร์เพื่อการวิจัยในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Ashwini, K.M. and Sridhar, K.R. 2006. Seasonal abundance and activity of pill millipedes (*Arthrosphaera magna*) in mixed plantation and semi-evergreen forest of southern India. Acta Oecologica 29: 27–32.

Attems, C. 1936. Diplopoda of India. Mem. India Mus., 11:133-323.

Attems, C. 1938. Die von Dr. C. Dawydoff in franzosisch Indochina gesammelten Myriopoden. Mem. Mus. Natn. Hist. nat., Paris, (n.s.) 6: 187-353.

Attems, C. 1953. Myriopoden von Indochina, Expedition von Dr. C. Dawydoff (1938-1939). Mem. Mus. Natn. Hist. nat., Paris, (n.s., A) 5: 133-230.

Banerjee, B. 1967. Seasonal Changes in the Distribution of the Millipede *Cylindroiulus punctatus* (Leach) in Decaying Logs and Soil. The Journal of Animal Ecology 36 (1): 171-177.

Dangerfield, J.M. and Telford. S.R. 1991. Seasonal activity patterns of julid millipedes in Zimbabwe. Journal of Tropical Ecology 7: 281-285.

Druce, D., Hamer, M. and Slotow, R. 2004. Sampling strategies for millipedes (Diplopoda), centipedes (Chilopoda) and scorpions (Scorpionida) in savanna habitats. African Zoology 39(2): 293-304.

Enghoff, H. 2005. The millipedes of Thailand (Diplopoda). Steenstrupia 29(1): 87-103.

Enghoff, H., Sutcharit, C. and Panha, S. 2007. The shocking pink dragon millipedes, Desmoxytes purpurodea, a colourful new species from Thailand (Diplopoda: Polydesmida: Paradoxosomatidae). Zootaxa 1563: 31-36.

Golovatch, S.I., Hoffman, R.L., Adis, J. and Morais, J.W. 1995. Identification Plate for the Millipede Orders Populating the Neotropical Region South of Central Mexico (Myriapoda, Diplopoda). Studies on Neotropical Fauna and Environment 30(3): 159-164.

Haacker, U. 1972. Tree climbing in pill-millipedes. Oecologia (Berlin) 10: 191-192.

Haacker, U. 1974. Patterns of Communication in Courtship and Mating Behaviour of Millipedes (Diplopoda). Symposia of the Zoological Society of London 32: 317-328.

Hirst, A.S. 1907. On four new Pill-Millipedes from the Malay Peninsula and Siam. The Annals and Magazine of Natural History 20(7): 215-219, pl. 10.

Hopkin, S.P. and Read, H.J. 1992. The Biology of Millipedes. Oxford University Press, New York.

Hoffman, R.L. 1979. Classification of the Diplopoda. Museum d'Histoire naturelle, Geneve, Switzerland.

Hoffman, R.L. 1982. Diplopoda. In S.P. Parker (ed.). Synopsis and Classification of Living Organisms Vol.2. McGraw-Hill, New York, pp. 698-724.

Hoffman, R.L. 1990. Diplopoda. In D.L. Dindal (ed.). Soil Biology Guide. John Wiley & Son, Inc., New York, pp 835-860.

Jeekel, C.A.W. 1951. A new Pill-milliped from the Malayan Peninsula (Diplopoda, Sphaerotheiidae). Tijdschr. Ent., 93: 101-107.

Jeekel, C.A.W. 1974. The group taxonomy and geography of the sphaerotheriida (Diplopoda). Symposia of the Zoological Society of London 32: 41-52.

Jeekel, C.A.W. 2001. A Bibliographic Catalogue of the Asiatic Sphaerotheriida (Diplopoda). Myriapod Memoranda 3:5-38.

Kaesner, A. 1968. Invertebrate Zoology II. Interscience, New York, pp 389-429.

Lawrence, R.F. 1984. The Centipedes and Millipedes of Southern Africa. Cape Town, Balkema.

Mesibov, R., Taylor, R.J. and Brereton R.N. 1995. Relative efficiency of pitfall trapping and hand collecting from plots for sampling of millipedes. Biodiversity and Conservation 4:429-439.

Pocock, R.I. 1890a. Three new species of Zephronia from the Oriental Region. Annali Mus. Civ. Stor. Nat. Genova, 29: 79-83.

Pocock, R.I. 1890b. On the Myriopoda of Burma. Pl. 1 . Report on the Oniscomorpha collected by Sig. L. Fea, by Mr. E.W. Oates and by the late Sig. G.B. Comotto. Annali Mus. Civ. Stor. Nat. Genova, 30: 384-395.

Pocock, R.I. 1895. Descriptions of new genera of Zephroniidae, with brief diagnoses of some new species. Ann. Mag. Nat. Hist., (6) 16: 409-415.

Shelley, R.M. 1999. Centipedes and Millipedes: with emphasis on north America fauna. The Kansas School Naturalist. No. 45(3): 3-15.

Sierwald, P. and Bond, J.E. 2007. Current status of the myriapod class diplopoda (millipedes): taxonomic diversity and phylogeny. The Annual Review of Entomology. 52: 401-420.

Silvestri, F. 1895. I Chilopodi ed I Diplopodi di Sumatra e delle Isole Nias, Engano e Mentavei. Annali Mus. Civ. Stor. Nat. Genova, 34: 707-760.

Stoev, P., Enghoff, H., Panha, S. and Fuangarworn, M. 2007. A second species in the millipede suborder Sinocallipodidea Shear, 2000 (Diplopoda: Callipodida). Zootaxa 1450: 63-68.

Verhoff, K.W. 1910-1914. Die Diplopoden Deutschlands. 1-640, pl. 1-35.

Verhoff, K.W. 1924. Results of Dr. E. Mjoberg's Swedish scientific expeditions to Australia 1910-1913. 34. Myriapoda: Diplopoda. Ark. Zool., 16 (5): 1-142, pl. 1-5.

Wesener, T., Van den Spiegel, D., 2009. A first phylogenetic analysis of Giant Pill-Millipedes (Diplopoda:Sphaerotheriida), a new model Gondwanan taxon, with special emphasis on island gigantism. Cladistics 25: 1–29

กลุ่มทางด้านพันธุศาสตร์

โครงการ CEB_M_49_2009

ชื่อ-นามสกุล นายภูมินทร์ สิมพลิพันธ์ **เลขประจำตัว** 4972605523
หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** สาขาวิชาสัตววิทยา

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ความหลากหลายของยีนเมโรซอยต์เซอร์เฟซโปรตีน 1, 2, 3, 4 และ 5 (*msp*-1, 2, 3, 4 และ 5) ของเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ที่เก็บจากพื้นที่ชายแดนของประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Diversity of Merozoite Surface Protein-1, 2, 3, 4 and 5 (*msp*-1, 2, 3, 4 and 5) Genes Among *Plasmodium falciparum* Collected from Border Areas of Thailand

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงชัย หาญยุทธนากร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. เนาวรัตน์ กาญจนาคาร

คำนำ

Malaria remains as one of the major global health problems. There are approximately 2-3 millions death from malaria infection each year. The transmission of the disease occurs in tropical regions including Thailand. Although the malaria eradication program launched by Thai government, successfully eradicate this disease in the central part of Thailand, people lived near the border regions of Thai-Myanmar, Thai-Laos, Thai-Cambodia and Thai-Malaysia are still under the influence of malaria disease. Four species of human malaria, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*, are found in Thailand, with a newly identified species in human, *P. knowlesi*. However, the widely spread species of human malaria are *P. falciparum* and *P. vivax*.

The use of antimalaria drug is the most popular approach to prevent and control the malaria infection because of their effectiveness and low-cost. Additional strategies for malaria prevention are increasing after the drug resistant parasite emerged worldwide. Malaria vaccine has been considered as a hope for malaria eradication strategy. Unfortunately, there is no effective vaccine available. The major problem of the malaria vaccine development is the diversity of target genes and proteins of the parasites in different parts of the world. Thailand is, now, known as a low transmission area, but many reports indicate that there is high variation of vaccine candidate protein sequences among parasites in this country, especially those proteins on the surface of merozoite stage. The merozoite surface protein (MSP)-1, 2, 3, 4 and 5 are the most investigated vaccine candidate proteins of *P. falciparum*. Although many research works had determined the polymorphism status of these proteins, the data cannot be related. Moreover, the parasite collection in previous studies are collected only from the North-western 12 region of Thailand, Tak province, thus it may not be the good representative of polymorphism status of each proteins in Thailand. In this study, the leading vaccine candidate proteins of *P. falciparum*, merozoite surface protein (MSP) 1, 2, 3, 4 and 5, are studied to reveal the diversity of their nucleotide and amino acid sequences. The parasite isolates in

our studies are collected from 5 border areas of Thailand, where high incident of infected cases are reported each year.

วัตถุประสงค์

1. To reveal the partial gene sequence of merozoite surface protein (*msp*)-1, 2, 3,4 and 5 genes of *P. falciparum* collected from Thailand

2. To study the diversity of *msp*-1, 2, 3, 4 and 5 genes of *P. falciparum* collected from Thailand

วิธีการศึกษา

1. *Plasmodium falcipaum* genomic DNA preparation

In this study, the parasite genomic DNA was extracted by phenol-chloroform method as described by Snounou (Snounou *et al.*, 1993). Firstly, two hundred microlitre (µl) of blood contained cultured parasites was mixed with 500 µl of 0.05% saponin and incubated at room temperature for 10 min or until the solution was transparent. The mixture was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and the parasite pellet was washed twice with 1,000 µl of cold 1X Phosphate buffer saline (PBS). The pellet was lysed with 200 µl of the Proteinase K solution (Proteinase K, 0.5mg/ml) overnight at 37 °C. After incubation, the volume was adjusted to 500 µl by autoclaved distilled water. The sample was, then, extracted with the phenol chloroform extraction procedure. The Tris-EDTA (TE) saturated phenol, 500 µl, was added and mixed by vortex for 1 min. After centrifugation at 13,000 rpm for 10 min, the upper layer was transferred to a new tube and combined with 500 µl of phenol/chloroform/isoamyl alcohol. The aqueous phase was separated by centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. Sodium acetate (3 M, pH 5.2) 50 µl and 1,000 µl of cold absolute ethanol was mixed with the upper layer in a new tube for DNA precipitation. Solution was kept in -20 °C overnight. DNA pellet were obtained by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min and washed with 70% ethanol. The pellet was air dried for 20-30 min. Finally, 100 µl of TE buffer was added to dissolve DNA. The DNA stocked solution was preserved in -20 °C until used.

2. Primer design

P. falciparum 3D7 strain chromosome sequences, from Genbank databases, were used for primer design. The sequence numbers included NC000910 (*msp* -2, 4 and 5 genes), NC004314 (*msp*-1 gene) and NC004330 (*msp*-3 gene) which were located on the *P. falciparum* chromosome 2, 9 and 10 respectively. Melting temperature (*Tm*) of each primer was predicted by a simplified *Tm* equation.

3. Gene amplification

The Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the 5 interested genes. In addition, the *msp*-3, 4 and 5 genes were amplified by the nested-PCR method. The method of PCR

was described by Mullis (Mullis, 1990). For PCR and nested-PCR, the total volume for 1 reaction was 20 µl. The genomic DNA templates were diluted with distilled water into 1:10 dilution, then, they were incubated at 60°C for 10 min prior to use. In this study, 1 µl of 1:10 dilution DNA template was added into the PCR mixture. The thermocycler in this study was the GeneAmp PCR system 9700 machine, Applied Biosystems.

4. DNA sequencing

After the studied gene, from each isolate, was amplified in 3-5 reaction tubes, then, they were pooled into a 1.5 ml microfuge tube. All samples, at least 50 □l, were purified prior to direct sequencing. Both strands of all amplified products were sequenced. Sequencing reactions were performed in a MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler using a ABI PRISM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kits with AmpliTaq DNA polymerase (FS enzyme) (Applied Biosystems), following the protocols supplied by the manufacturer. Single-pass sequencing was performed on each template using our designed primer. The fluorescent-labeled fragments were purified from the unincorporated terminators with an ethanol precipitation protocol. The samples were resuspended in distilled water and subjected to electrophoresis in an ABI 3730xl sequencer, Applied Biosystems (Macrogen Inc., Korea).

5. Sequence alignment

The sequences from both strands of a PCR product were aligned with BioEdit program. The input file format of this program was sequence.ab1 file which obtained from Macrogen Inc., Korea. The sequence of each isolate was deduced from the matched sequences of both strands. Later, all sequences were compared and analyzed for the diversity.

6. Phylogenetic tree analysis

The PHYLIPS program version 3.2 (Felsenstein, 1989), free license, was used as a phylogeny analysis tool. This program was run on Mac Book, Mac OS X version 6.9. The input file format of this analysis program was PHYLIPS file format (sequence.phy).

ผลการศึกษา

1. After the block 17 fragment was amplified, all amplified products were checked by agarose gel electrophoresis with TBE buffer. Compared with DNA size marker, all amplified products were seen as a single band at 300 bp in size, similar to the calculated size from designed primers. No size variation was detected (Figure 1).

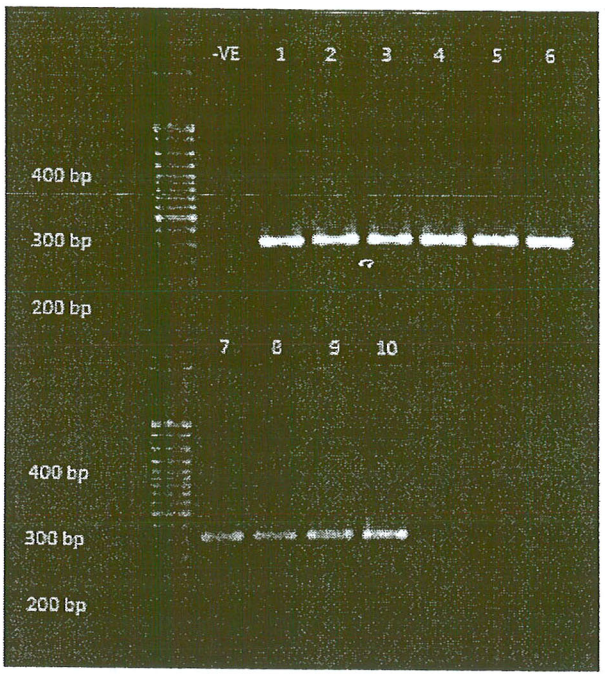


Figure 4.1 A photograph of an agarose gel electrophoresis showed some amplified products from malaria parasite samples. The gel electrophoresis condition was 1.5% (W/V) agarose in 1XTBE buffer processing under 80 voltages for 30 mins. After staining with ethidium bromide, the products were detected by UV transilluminator (UVP Bioimaging systems, AutoChemi system). The amplified product size was compared with 100 bp DNA standard ladder marker (BioExcellence, Thailand).

2. Diversity of *msp-117* among *Plasmodium falciparum* population in Thailand

All 217 nucleotides of the block 17 from 61 samples were sequenced and further analyzed. A sequence from 2 samples indicated a multiple infection and was excluded from data analysis. Another 1 sample cannot be collected its genomic DNA. These block 17 fragments from Thailand is highly conserved. They showed 5 point mutation positions: CAA/GAA at 4858, AAA/ACA at 5000, AAC/AGC at 5027, GGA/AGA at 5029 and CTT /TTT at 5074 (Figure 2). All of the mutations occurred at the first (3/5) or second (2/5) positions of each codon (Table 1). These point mutations caused non-synonymous mutation at all 5 positions; E/Q at position 1644, K/T at 1691, N/S at 1700, G/R at 1701 and L/F at 1716 where they can be located on the first (1 amino acid change) and second (4 amino acid changes) EGF-like domain. Neither insertions nor deletions were detected in this gene.

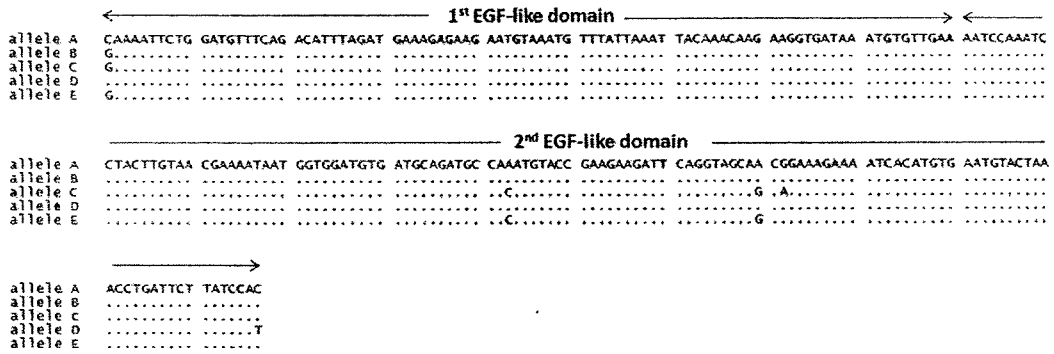


Figure 4.2 Five genotypes of the block 17 are aligned and compared with allele A (top line). Conserved sequences of other alleles are represented as dot below allele A sequence. Point mutations in other alleles are replaced with alternative nucleotide letters.

สรุปผลและวิจารณ์

The data of genetic structure among *P. falciparum* population is the necessary information to develop fighting strategies to control the disease, for example, vaccine development, drug treatment. In this study, the genetic diversity of the *msp-117* gene from Thailand was studied. The results showed that nearly all *P. falciparum* isolated collected during 2002 – 2009 may contain only one genotype of the *msp-117* (monogenotype infection). These may reflect the reduction of malaria infection in the past ten years by the effective drug treatment and other malaria control program.

Although early studies of *msp-1* gene showed that the gene in *P. falciparum* may arrived from the recombination of two allelic types, K1 and MAD20 (Tanabe *et al.*, 1987), later studies on the block 2 of this gene revealed 4 distinct allelic groups; K1, MAD20, RO33 and MR (Tanabe *et al.*, 1987, Ferreira *et al.*, 1998, Takala *et al.*, 2002 and Happi *et al.*, 2004). On the other hand, our results and others suggested that the block 17 can be typed into 10 alleles worldwide (Sakihama *et al.*, 1999, Sakihama *et al.*, 2006, Sakihama *et al.*, 2007, Kaneko *et al*,. 1997, Ferreira *et al.*, 2003, Vijay Kumar *et al.*, 2005, Lalitha *et al.*, 1999 and Qari *et al.*, 1998) but only 5 alleles have been reported in Thailand (Sakihama *et al.*, 1999 and Sakihama *et al.*, 2006). Similarly, the *msp-117* from GenBank showed that K1, MAD20 and RO33 isolates which have unique block 2 alleles, have Q/KNG/L, E/TSR/L and Q/KNG/L alleles, respectively, in their block 17. In our study, five alleles in their MSP-*119* sequences were found as previously reported in Tak province. Most of the malaria population in Tak showed the E/KNG/L as the dominant alleles, 54.17% (n=72), and also E/TSR/L (19.44%), Q/KNG/L (18.06%), Q/KNG/F (5.56%) and E/TSG/L (2.78%) [14]. However, another study of the same block of *msp-1* gene, in Tak province, revealed only 4 alleles (no E/TSG/L allele) while the E/KNG/L still remained the majority allele of MSP-*119* (Sakihama *et al.*, 2007). From these reports and our finding indicated that E/KNG/L allele may be the most dominant allele of MSP-*119* in Thailand. Although, the

E/KNG/L allele was marked as a dominant allele in Thailand, the difference of allele distribution in different areas and also in each year can be clearly seen. Our analysis of MSP-*119* allele distribution in each area with the 2 test indicated that the distribution pattern of all population were different. The uniqueness distribution pattern of each population should be actually collected from many distinct areas. One studied area dataset, which large sample size, was not good representative information of the population in large scale area such 42 as country and continent. The fluctuation of allele distribution should also be frequently determined.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. This research is the data base for study Merozoite Surface Protein-1, 2, 3, 4 and 5 (*msp*-1, 2, 3, 4 and 5) *Plasmodium falciparum* in Thailand

2. The data base for product and development the vaccine available that the major problem of the malaria.

เอกสารอ้างอิง

Blackman, M.J. and Holder, A.A. 1992. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with the other fragments of the MSP1. Molecular and Biochemical Parasitology 50:307-315.

Chappel, J.A. and Holder, A.A. 1993. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. Molecular and Biochemical Parasitology 60: 303-312.

Lalitha, P.V., Malrihta, P., Chattopadhyay, R. and Chauhan, V.S. 1999. *Plasmodium falciparum*: variations in the C-terminal cysteine-rich region of the merozoite surface protein-1 in field samples among Indian isolates. Experimental Parasitology 92: 12-18.

McColl, D.J. and Anders, R.F. 1997. Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). Molecular and Biochemical Parasitilogy 90: 21-31.

Takala, S., Branch, O., Escalante, A.A., Kariuki, S., Wootton, J. and Lal, A.A. 2002. Evidence for intragenic recombination in *Plasmodium falciparum*: identification of a novel allele family in block 2 of merozoite surface protein-1: Asembo bay Area Cohort Project XIV. Molecular and Biochemical Parasitology 125: 163-171.

Wang, L., Black, C.G., Marshall, V.M., and Coppel, R.L. 1999. Structural and Antigenic Properties of Merozoite Surface Protein 4 of *Plasmodium falciparum*. Infection and Immunity 67: 2193-2200.

โครงการ CEB_M_59_2010

CEB_M_59_2010

ชื่อ-นามสกุล นางสาวศรัณยู ถาวร **เลขประจำตัว** 5072639323
หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** พันธุศาสตร์

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของลักษณะบางประการที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตในถั่วเหลืองฝักสด *Glycine max* (L.) Merrill

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Genetic analysis of some characters related to yield in vegetable soybean Glycine max (L.) Merrill

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร.ชนิตา ปาลิยะวุฒิ

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยส่งถั่วเหลืองฝักสดเป็นสินค้าออกไปยังประเทศต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เนื่องจากถั่วเหลืองฝักสดเป็นพืชที่ได้รับความนิยมบริโภคเป็นอย่างมากในประเทศญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา เพราะมีประโยชน์ต่อสุขภาพ และรสชาติอร่อย ถั่วเหลืองนำรายได้เข้าประเทศในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก และมีแนวโน้มว่าตลาดต่างประเทศยังมีความต้องการฝักสดเพิ่มมากขึ้นทุกปี ถั่วเหลืองฝักสดที่ปลูกเพื่อส่งออกต่างประเทศส่วนใหญ่ต้องนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง การผลิตเมล็ดพันธุ์ในประเทศจากเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้านั้น เมล็ดพันธุ์มักเน่าเสียหรือบวมก่อนเมล็ดแห้งเพราะฝักและเมล็ดที่มีขนาดใหญ่เปลือกหนา จึงทำให้การระเหยน้ำออกจากเมล็ดไปได้ช้า เมล็ดพันธุ์ที่ได้จึงน้อยและด้อยคุณภาพ แนวทางการแก้ไขปัญหานี้ จึงทำได้โดยการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสด โดยใช้พ่อ-แม่พันธุ์ คือ ถั่วเหลืองสายพันธุ์ 'เชียงใหม่ 60' (CM 60) ที่ปลูกอย่างแพร่หลายภายในประเทศ ซึ่งมีลักษณะให้ผลผลิตดี ต้านทานโรคต่าง ๆ และเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมภายในประเทศ กับถั่วเหลืองฝักสดที่นิยมบริโภคจากต่างประเทศ ทำให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับปลูกในประเทศ เมล็ดพันธุ์คุณภาพดี มีผลผลิตสูง และตรงตามความต้องการของตลาด นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มกำลังการผลิตถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออกได้อีกด้วย การศึกษาลักษณะทางพืชไร่ต่าง ๆ ที่สัมพันธ์กับลักษณะผลผลิตโดยใช้ค่าสหสัมพันธ์จะบ่งบอกว่าลักษณะใดที่ส่งผลต่อผลผลิต และการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะเหล่านั้นเป็นสิ่งสำคัญที่สามารถบ่งชี้ถึงโอกาสในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะได้สายพันธุ์เป็นไปตามคุณสมบัติข้างต้นมีความเป็นไปได้มากหรือน้อยเพียงไร นอกจากตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะผลผลิตสูงจะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดในอนาคต งานวิจัยครั้งนี้ได้วิเคราะห์กลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อผลผลิต ซึ่งได้รับยีนดังกล่าวจากพันธุ์ 'Kahori' โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เข้าใจถึงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมลักษณะผลผลิตสูงของถั่วเหลืองฝักสด

วัตถุประสงค์

1. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะบางประการกับลักษณะผลผลิต
2. วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมและอัตราพันธุกรรมของลักษณะผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิต
3. วิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบของผลผลิตเหล่านั้นในถั่วเหลืองฝักสด

วิธีการศึกษา

1. ปลูกประชากร RIL (F_7) และพ่อแม่
2. เก็บข้อมูลลักษณะต่าง ๆ ของพ่อ แม่ และ F_7 ดังนี้
   2.1 พื้นที่ใบต่อต้น
   2.2 วันออกดอก
   2.3 น้ำหนักแห้งของ ใบ ลำต้น ราก
   2.4 จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และจำนวนเมล็ดต่อต้น
   2.5 น้ำหนักเมล็ดต่อต้น และน้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด
3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะต่าง ๆ กับผลผลิต
4. วิเคราะห์การแปรผันทางพันธุกรรม และค่าอัตราพันธุกรรม ของลักษณะต่าง ๆ
   4.1 วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างในกลุ่มของประชากร RIL โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน
   4.2 ประมาณค่าการแปรผันทางพันธุกรรมและการแปรผันของสภาพแวดล้อม เพื่อประมาณค่าอัตราพันธุกรรมในแนวแคบ (narrow-sense heritability)
5. ศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยใช้ AFLP เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม
   5.1 เก็บตัวอย่างใบอ่อนของถั่วเหลืองจากรุ่นพ่อแม่ และ RIL โดยวิธีทำให้แห้งอย่างรวดเร็วด้วยซิลิกาเจล
   5.2 การสกัด DNA
   5.3 การวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรม AFLP
   - ทดสอบ Polymorphism ของรุ่นพ่อแม่เพื่อหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เหมาะสมในการนำมาทดสอบการกระจายตัวของพันธุกรรมของประชากรรุ่น RIL
   - ตรวจสอบลักษณะแถบของ DNA ที่เกิดขึ้น และบันทึกค่าแถบ DNA ที่ได้
6. จัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมและสถิติสำหรับวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะในข้อ 3
   6.1 ทดสอบการกระจายตัวของเครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละเครื่องหมายในประชากรรุ่น RIL โดย Goodness of Fit อัตราส่วน 1:1 โดยใช้การทดสอบ Chi-Square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99%
   6.2 ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MAPMAKER version 3.0 ในการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมและประเมินระยะห่างระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม

6.3 ใช้วิธีการ Simple linear regression และ Composite Interval Mapping (CIM) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ WinQTL Cartographer ทำการวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL ของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว

ผลการศึกษา

ลักษณะพื้นที่ใบต่อต้น วันออกดอก และน้ำหนักแห้ง มีการกระจายตัวของข้อมูลในประชากรรุ่น F_7 แบบโค้งปกติ มีค่าเฉลี่ยลักษณะต่าง ๆ ของพ่อ แม่ และ F_7 ดังตารางที่ 1

ลักษณะ	ค่าเฉลี่ย		
	พ่อ	แม่	F_7
พื้นที่ใบต่อต้น (cm^2)	612	650	718
วันออกดอก (วัน)	22.5	30.5	29.6
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	4.59	6.83	6.60

ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ดังตารางที่ 2

	น้ำหนักแห้ง	พื้นที่ใบ	วันออกดอก
วันออกดอก	0.74	0.68	1
พื้นที่ใบ	0.92	1	
น้ำหนักแห้ง	1		

ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะต่าง ๆ ดังตารางที่ 3

ลักษณะ	ค่าอัตราพันธุกรรมแนวแคบ
วันออกดอก	0.613
พื้นที่ใบ	0.611
น้ำหนักแห้ง	0.819

ขณะนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาในขั้นตอนที่เหลือ ดังนี้

- เก็บตัวอย่างลักษณะจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนเมล็ดต่อต้น น้ำหนักเมล็ดต่อต้น และน้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด
- คัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่น่าจะเกี่ยวของกับลักษณะที่ศึกษา จากแผนที่ยีนของถั่วเหลือง
-

สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษา จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากข้อมูลค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะองค์ประกอบของผลผลิตบางลักษณะที่ได้ทำการศึกษาสามารถบ่งบอกว่าลักษณะนั้น ๆ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของผลผลิตหรือไม่ ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะของลักษณะดังกล่าว และตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบผลผลิตในถั่วเหลืองฝักสดจากคู่ผสม CM 60 x Kahori สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2528. ปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช.

ธีระ สมหวัง. 2544. การถ่ายทอดประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L) Merrill). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่นา ภาควิชาพืชไร่นา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชาการเกษตร, กรม. 2523. ถั่วเหลือง. เอกสารวิชาการ เล่ม 3. กรุงเทพฯ: งานทะเบียนและประมวลสถิต กองแผนงาน.

สมศักดิ์ ศรีสมบุญ. 2547. การพัฒนาการผลิตถั่วเหลืองฝักสด. เอกสารประกอบการบรรยาย ในการประชุมทางวิชาการ เรื่อง การวิจัยและพัฒนาถั่วเหลืองฝักสด: บทบาทของรัฐและเอกชน. วันที่ 14-16 ตุลาคม 2547 ณ. โรงแรมริมกกรีสอร์ท จ. เชียงใหม่. 11 หน้า

สุจิตรา ชูชีพ. 2544. ลักษณะทางการเกษตรบางประการและความสามารถในการให้ผลผลิตของถั่วเหลืองลูกผสมชั่วที่ 1 จากการผสมข้ามระหว่างถั่วเหลืองฝักสดและถั่วเหลืองน้ำมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Ball, R.A., McNew, R.W., Vories, E.D., Keisling, T.C. and Purcell, L.C. 2001. Path analyses of population density effects on short-season soybean yield. Agronomy Journal. 93: 187-195.

Basten, C.J., Weir, B.S. and Zeng, Z-B. 2001. QTL cartographer version 1.15 . Raleigh: Department of Statistics. North Carolina State University.

Board, J.E., Zhang, W. and Harville, B.G. 1996. Yield rankings for soybean cultivars grown in narrow and wide rows with late planting dates. Agronomy Journal. 88: 240–245.

Cregan, P.B., Jarvik, T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C., Lark, K.G., Kahler, A.L., Kaya, N., Van Toai, T.T., Lohaes, D.G., Chung, T. and Specht, J.E. 1999. An integrated genetic linkage map of soybean genome. Crop Science. 39: 1464 – 1490.

Draper, J. and Scott, R. 1988: The isolation of plant of nucleic acids. In Draper, J., Scott, C., Armitage, P. and Waldan, R. (eds.) . Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual, 212 - 214 . London: Blackwell Scientific Publishing.

Gan, Y., Stulen, I., van Keulen, H. and Kuiper, P.J.C. 2001. Physiological response of soybean genotype to plant density. Field Crops Research. 74: 231 - 241.

Kearsy, M.L. and Pooni, H.S. 1996. The genetical analysis of quantitative traits. London: Chapman & Hall.

Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. and Newberg, L. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage map of experimental and natural populations. Genomics I : 174 – 181.

Liu, B., Fujiro, T., Yan, Z.-H., Sakamoto, S., Xu, D. and Abe, J. 2007. QTL mapping of domestication-related traits in soybean (*Glycine max*). Annals of Botany. 100: 1027–1038.

Matasyoh, L.G., Wachira, F.N., Kinyua, M.G., Thairu Muigai, A.W. and Mukiama, T.K. 2008. Leaf storage conditions and genomic DNA isolation efficiency in *Ocimum gratissimum* L. from Kenya. African Journal of Biotechnology. 7 5: 557-564.

Qing-shan, C., Zhong-chen, Z., Chun-yan, L., Da-wei, X., Hong-mei, Q., Da-peng, S., Chi-yun, S. and Guo-hua, H. 2007. QTL analysis of agronomic traits in soybean. Agricultural Sciences in China. 6 4: 399-405.

Rao, M.S.S., Bhagsari, A.S. and Mohamed A.I. 2002. Fresh green seed yield and seed nutritional traits of vegetable soybean genotypes. Crop Science. 42: 1950-1958.

Sharma, A.D., Gill, P.L. and Singh, P. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plant. Plant Molecular Biology. 20: 415a-415f.

Specht, J.E., Hume, D.J. and Kumudini, S.V. 1999. Soybean yield potential-a genetic and physiological perspective. Crop Science. 39: 1560–1570.

Yoshida, S., Forno, D.A. and Cock, J. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. Int. Rice Res. Inst.

โครงการ CEB_D_13_2008

CEB_D_13_2008

ชื่อ-นามสกุล นายอนุสรณ์ ปานสุข **เลขประจำตัว** 4973861023
หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1835) จากแหล่งอาศัยธรรมชาติในประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Morphological differences and genetic diversity of rice field frogs *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1835) from natural habitats in Thailand

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร

คำนำ

กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1835) เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์ Ranidae สกุล *Hoplobatrachus* จัดได้ว่าเป็นสัตว์พื้นเมืองของประเทศไทย ที่สามารถพบได้ในบริเวณที่ราบลุ่มทั่วทุกภาคของประเทศ กบนาเป็นอาหารโปรตีนที่มีผู้นิยมรับประทาน ดังนั้นจึงมีผู้นิยมจับกบนาจากธรรมชาติไปเป็นอาหารเป็นจำนวนมาก ทำให้ประชากรกบนาในธรรมชาติมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากการล่ากบนาในธรรมชาติ ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ประชากรกบนาลดลงอย่างรวดเร็วแล้ว การบุกรุกพื้นที่ธรรมชาติที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของกบนาเพื่อทำการเกษตรกรรมก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ประชากรกบนา(Frost *et al.*, 2006) ในธรรมชาติลดลง นอกจากนี้ในปัจจุบัน การเปลี่ยนแปลงที่ทำให้อุณหภูมิของโลกที่ร้อนขึ้น ก็อาจเป็นสาเหตุสำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ทำให้ประชากรกบนาลดลงอย่างรวดเร็วมายิ่งอีกด้วย

กบนาในปัจจุบันจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ที่มีการเพาะเลี้ยงมาเป็นเวลานานมากกว่า 20 ปี ในการเพาะเลี้ยง พ่อแม่พันธุ์ที่นำมาเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะเป็นกบที่มีการจับมาจากธรรมชาติ (Pariyanonth and Daorerk, 1995) ประชากรที่เป็นพ่อแม่พันธุ์ในที่เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่มีการผสมอยู่แต่ในพื้นที่เดียวกัน ทำให้มีการผสมแบบเลือดชิด ที่อาจทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรลดลง กบมีขนาดเล็กลง โตช้า และลดความต้านทานโรค

จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของประชากรกบนาในบางพื้นที่มีลักษณะแตกต่างจากประชากรกบนาทั่วไป นอกจากนั้นการศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบนาทั้งในธรรมชาติ และในที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยยังไม่มีความชัดเจนมากนัก เนื่องจากยังมีผู้ทำการศึกษากันน้อยมาก ทำให้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกบนาที่พบในประเทศไทยจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ซึ่งในการศึกษาสามารถใช้ความรู้ทางชีวโมเลกุลได้หลายวิธี เช่น เทคนิค inter-simple sequence repeats (ISSRs) (Guicking และคณะ 2005), random amplified polymorphism DNA (RAPD), minisatellite (Bradley และคณะ 2000) หรือการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนในไมโตคอนเดรีย (Vieites และคณะ 2006) เป็นต้น การศึกษาโดยวิธีการต่างๆเหล่านี้สามารถนำมาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิค Morphological Discrimination ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

หลายชนิด (Matsui, 1984; Vukov *et al.*, 2006) และทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกบนาในธรรมชาติที่พบตามแหล่งต่างๆในประเทศไทย ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ เทคนิค inter-simple sequence repeats และ การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนในไมโตคอนเดรีย โดยผลการศึกษาที่ได้รับจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบนาในธรรมชาติ รวมทั้งเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์กบนาในแหล่งเพาะเลี้ยง เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกบนาของประเทศต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยาของกบนาจากแหล่งอาศัยธรรมชาติในประเทศไทย
2. เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบนาจากแหล่งอาศัยธรรมชาติในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่

1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบนาที่อาศัยในแหล่งธรรมชาติ

(1.1) ทำการเก็บตัวอย่างกบนาที่อาศัยในแหล่งธรรมชาติจากบริเวณต่างๆในประเทศ โดยวิธี Visual Encounter Survey (Heyer *et al.*, 1994) และเก็บตัวอย่างกบนาในเวลากลางคืน ซึ่งขอบเขตการเก็บตัวอย่างกบนาอ้างอิงจากขอบเขตการกระจายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยโดยวิธีของ Inger, 1999 เป็นตัวกำหนดสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง ซึ่งแบ่งเป็น 4 ส่วน ได้แก่

(1.1.1) Northeastern montane region ทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดน่าน (NAN) และตาก (TAK)

(1.1.2) Thai-Lao dry plateau ทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดอุดรธานี (UDN) สกลนคร (SKN) มุกดาหาร (MDH) อุบลราชธานี (UBR) และนครราชสีมา 2 แหล่ง ได้แก่ อำเภอเมือง (NKR) และอำเภอวังน้ำเขียว (WNK)

(1.1.3) Southeastern Asian lowlands ทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี (CBR) สระแก้ว (SKW) จันทบุรี (CTR) ตราด (TRAD) นครนายก (NKN) ลพบุรี (LOP) และเพชรบุรี (PCB)

(1.1.4) Tenasserim and Malay peninsula ทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร (CHP) พังงา (PNA) และสงขลา (SKL)

(1.2) ทำการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งสิ้น 21 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวลำตัว (snout-vent length; SVL), ความยาวของหัว (head length; HL), ความยาวจากปลายปากถึงรูเปิดจมูก (snout-nostril length; S-NL), ความยาวจากรูเปิดจมูกถึงตา (nostril-eyelid length; N-EL), ความยาวปาก (snout length; SL), ความยาวตา (eye length; EL), ความยาวจากตาถึงแผ่นปิดหู (tympanum-eye length; T-EL), เส้นผ่านศูนย์กลางแผ่นปิดหู (tympanum diameter; TD), ความกว้างของหัว (head width; HW), ระยะห่างระหว่างรูเปิดจมูก (internarial distance; IND), ระยะห่างระหว่างตา (interorbital distance; IOD), ความยาวขาหน้า (forelimb length; FLL), ความยาวตั้งแต่มือถึงข้อศอก (lower arm length; LAL), ความยาวของนิ้วมือที่ 3 (third finger length; TFL), ความยาวของนิ้วมือที่ 1 (first finger length; FFL), ความยาวของมือ (hand length; HAL), ความกว้างของขาหน้า (forearm width; FAW), ความยาวของขาหลัง (hindlimb length; HLL), ความยาวของหน้าแข้ง (tibia

length; TL), ความยาวของเท้า (foot length; FL) และความยาวของนิ้วเท้าที่ 4 (fourth toe length; FTL) จากนั้นนำมาวิเคราะห์หา means of multivariate methods include principal component analysis (PCA), canonical variate analysis (CVA) and discriminant analysis (DA)

2) การศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลของกบนาที่อาศัยในแหล่งธรรมชาติ แบ่งได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่

(2.1) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบนาด้วยเทคนิค ISSR มีขั้นตอนดังนี้

(2.1.1) สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนตับ หรือนิ้วเท้าของกบนา

(2.1.2) ทดสอบหา ISSR ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ซึ่ง ISSR ไพร์เมอร์ที่เหมาะสม คือ ให้ ISSR profiles ที่ชัดเจน มี polymorphism และไม่มีความแปรปรวนของ ISSR profiles

(2.1.3) เก็บรวบรวมข้อมูลของการมีและไม่มีแถบของ PCR product จากตัวอย่างทั้งหมดที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ตัวเดียวกัน

(2.1.4) วิเคราะห์ความหลากหลายของยีนและค่า genetic distance ด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.32 ส่วนการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่าง genetic distance กับ geographic distance วิเคราะห์ ด้วยโปรแกรม Arlequin version 3.10 เพื่อทดสอบระดับนัยสำคัญ

(2.2) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบนาด้วยลำดับเบสของยีน 12S rRNA, 16S rRNA และยีน cytochrome-*b* (cyt-*b*) ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ มีขั้นตอนดังนี้

(2.2.1) สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนตับ หรือนิ้วเท้าของกบนา

(2.2.2) ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน cytochrome-*b* (cyt-*b*) ด้วยไพร์เมอร์ L14841 (5'-CTC CCA GCC CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AAC TTC G-3') และไพร์เมอร์ CB3-H (5'-GGC AAA TAG GAA GTA TCA TTC TG-3') (Kosuch *et al.*, 2001) ยีน 12S rRNA ด้วยไพร์เมอร์ FS01 (5'-AAC GCT AAG ATG AAC CCT AAA AAG TTC T-3') และไพร์เมอร์ R16 (5'-ATA GTG GGG TAT CTA ATC CCA GTT TGT TTT-3') (Sumida *et al.*, 1998) และยีน 16S rRNA ด้วยไพร์เมอร์ F51 (5'-CCC GCC TGT TTA CCA AAA ACA T-3') และไพร์เมอร์ R51 (5'-GGT CTG AAC TCA GAT CAC GTA-3') (Sumida *et al.*, 2002)

(2.2.3) วิเคราะห์หาลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่ได้ และทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่างแต่ละตัวโดยใช้โปรแกรม Clustal X (Thompson *et al.*, 1997)

(2.2.4) นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหา Genetic distance และวิเคราะห์เพื่อสร้าง phylogenetic tree ของประชากรกบนาที่พบในประเทศไทยโดยใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 2002) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน cyt-*b*, 12S rRNA และยีน 16S rRNA ของกบ *Hoplobatrachus tigerinus* (HT) และ *Fejervarya limnocharis* (FL) เป็น outgroup

ผลการศึกษา

จากการเพิ่มจำนวนของยีน cytochrome-*b* (Cyt-*b*) ยีน 12S rRNA และยีน 16S rRNA ด้วยไพร์เมอร์ L14841, CB3-H ,FS01 , R16 , F51 และ R51 ตามลำดับในประชากรตามธรรมชาติทั้งสิ้น 18 กลุ่มประชากร พบว่าทั้ง 3 ยีนมีจำนวนลำดับเบสเท่ากับ 1,375-1,376 เบส และเมื่อนำเฉพาะลำดับเบสของยีน Cyt-*b* ซึ่งมีขนาด 564 เบสมาเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยโปรแกรม Clustal X พบว่าลำดับเบสของยีน Cyt-*b* มีทั้งหมด

23 รูปแบบ (haplotypes) จากจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด 74 ตัวอย่าง และเมื่อนำมาสร้างสาย phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PAUP* version 4.0b10 พบว่าสามารถแบ่งประชากรได้เป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มแรกประกอบด้วยตัวอย่างกบนาบริเวณ Southeastern Asian lowlands บางส่วน (จังหวัดชลบุรี นครนายก ลพบุรี และเพชรบุรี) ตัวอย่างกบนาจากบริเวณ Tenasserim and Malay peninsula บางส่วน (จังหวัดพังงา และสงขลา) และตัวอย่างกบนาจากจังหวัดตาก

กลุ่มที่สอง ประกอบด้วยตัวอย่างกบนาบริเวณ Thai-Lao dry plateau (จังหวัดอุดรธานี มุกดาหาร สกลนคร นครราชสีมา และอุบลราชธานี) ตัวอย่างกบนาบริเวณ Southeastern Asian lowlands บางส่วน (จังหวัดสระแก้ว จันทบุรี และตราด) และตัวอย่างกบนาจากจังหวัดชุมพร และจังหวัดน่าน (รูปที่ 1)

โดยทั้งสองกลุ่มแยกกันออกมาอย่างชัดเจน ซึ่งยืนยันได้จากค่า bootstrap ที่ปรากฏอยู่ใน phylogenetic tree ซึ่งมีค่าสูง

ส่วนลำดับเบสของยีน 12S rRNA และ 16S rRNA อยู่ในระหว่างดำเนินการสร้างสาย phylogenetic tree

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบนาด้วยเทคนิค ISSR ได้ทำการหาไพร์เมอร์และสภาวะของ PCR ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยทดสอบไพร์เมอร์ UBC ชุดที่ 8 เพื่อทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรได้ จากการทดสอบไพร์เมอร์ทั้งสิ้น 60 แบบ (UBC 801-UBC 860) ที่อุณหภูมิ annealing 54 องศาเซลเซียส พบว่ามีไพร์เมอร์ทั้งหมด 9 แบบ ได้แก่ UBC 807, UBC 825, UBC 826, UBC 827, UBC 829, UBC 835, UBC 840, UBC 841 และ UBC 856 ที่สามารถแสดงดีเอ็นเอที่ชัดเจน และบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรได้ เมื่อทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอผ่านปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิดังกล่าว ซึ่งในขณะนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ทั้ง 9 แบบเรียบร้อยแล้ว และกำลังอยู่ในขั้นตอนวิเคราะห์ผลการทดลอง

ส่วนการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบนากำลังอยู่ในขั้นตอนการวิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกัน

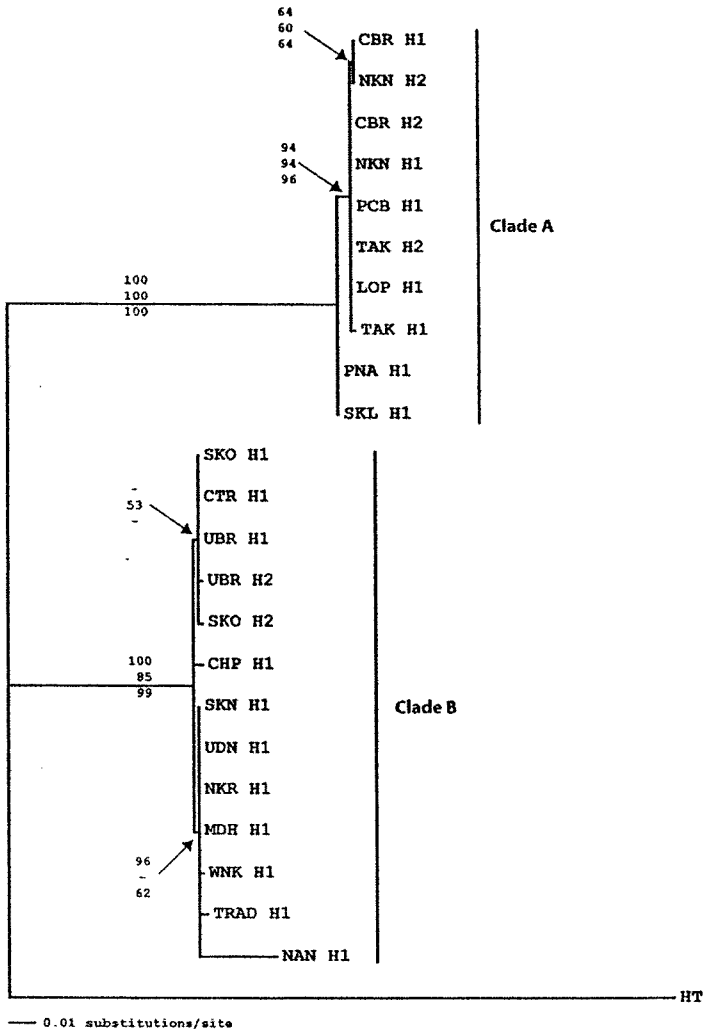
สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษา จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรกบนาจากแหล่งอาศัยธรรมชาติบริเวณต่างๆในประเทศไทย เพื่อการอนุรักษ์ประชากรกบนาในแหล่งอาศัยธรรมชาติ

2. ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กบนาในแหล่งเพาะเลี้ยง



รูปที่ 1 phylogenetic tree ของลำดับเบสของยีน cytochrome-*b* (Cyt-*b*) ที่ทำการศึกษาในกบนา

เอกสารอ้างอิง

Chan-ard, T. 2003. **A Photographic Guide to Amphibians in Thailand.** Bangkok: Darnsutha Press Co. Ltd.

Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F. B., de Sa, R. O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S. C., Raxworthy, C. J., Campbell, J. A., Blotto, B. L., Moler, P., Drewes, R. C., Nussbaum, R. A., Lynch, J. D., Green, D. M. and Wheeler W. C. 2006. The Amphibian Tree of Life. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 297: 1-370.

Inger, R. F. 1999. Distribution of Amphibians in Southern Asia and Adjacent Islands. **In Patterns of Distribution of Amphibians** Baltimore: The John Hopkins University Press, 445-482.

Kosuch, J., Vences, M., Dubois, A., Ohler, A. and Bohme, W. 2001. Out of Asia: Mitochondrial DNA Evidence for an Oriental Origin of Tiger Frogs, Genus *Hoplobatrachus*. **Mol. Phylogenet. Evol.** 21(3): 398-407.

Matsui, M. 1984. Morphometric Variation Analyses and Revision of the Japanese Toads (Genus *Bufo*, Bufonidae). **Contr. Biol. Lab. Kyoto Univ.** 26: 209-428.

Pariyanonth, P. and Daorerk, V. 1995. Frog Farming in Thailand. **INFOFISH International,** 3/95: 25-28.

Sumida, M., Ogata, M., Kaneda, H., Yonekawa, H., 1998. Evolutionary relationships among Japanese pond frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of cytochrome b and 12S ribosomal RNA genes. **Genes Genet. Syst.** 73: 121–133.

Sumida, M., Kondo, Y., Kanamori, Y., Nishioka, M., 2002. Inter- and intraspecific evolutionary relationships of the rice frog Rana limnocharis and the allied species *R. cancrivora* inferred from crossing experiments and mitochondrial DNA sequences of the 12S and 16S rRNA genes. **Mol. Phylogenet. Evol.** 25: 293–305.

Swofford, D. L. 2002. **PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods).** Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aides by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research.** 25(24): 4876-4882.

Taylor, E. H. 1962. The Amphibian Fauna of Thailand. **Univ. Kansas. Sci. Bull.** 43(8): 368-373.

Vukov, T. D., Dzukic, G., Lelo, S., Borkin, L. J., Litvinchuk, S. N. and Kalezic, M. L. 2006. Morphometrics of the Yellow-bellied Toad (*Bombina variegata*) in the Central Balkans: Implications for Taxonomy and Zoogeography. **Zool. Stud.** 45(2): 213-222.

โครงการ CEB_D_16_2009

CEB_D_16_2009

ชื่อ-นามสกุล นางสาวศิริพร ศรีภิญโญวณิชย์ **เลขประจำตัว** 4873853923
หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ลักษณะสมบัติของยีนพบใหม่ที่ตอบสนองต่อความเครียดจากความเค็มในข้าว *Oryza sativa* L.

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Characterization of the novel salt stress responsive gene in rice *Oryza sativa* L.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม Professor Dr. Hongya Gu
ผู้ศาสตราจารย์ ดร. ธีรพงษ์ บัวบูชา

คำนำ

Abscisic acid (ABA) is plant stress hormone that essential for salt stress adaptation, including stomatal closure, stress-responsive gene expression and metabolic changes. Exposure to desiccation, salt stress and low temperature are generally accompanied by an increase in endogenous ABA levels prior to the activation of a number of water- and salt- stress-induced genes (Chandler and Robertson, 1994), the products of which are thought to be involved in protection of the cell or in recovery from the stress-mediated physiological insult. Indeed, during vegetative growth ABA is an important signal for triggering plant responses to adverse environmental conditions (Leung and Giraudat, 1998; Nambara and Marion-Poll, 2005), and ABA coordinates many of these stress responses such as immediate stomatal closure, osmolyte accumulation and induction of synthesis of stress-related proteins such as late embryogenesis abundant and heat shock proteins, reactive oxygen scavengers, etc. However whilst many abiotic-stress-inducible genes are controlled by ABA, some are not, which indicates that both ABA-dependent and ABA-independent regulatory systems are involved in stress-responsive gene expression (Bray et al., 2000; Zhu, 2002).

In our research, the rice *nucleolin1* (*OsNUC1*) was found to be the salt inducible gene which it was found to be higher expressed in salt-stress condition, especially in salt-resistant line. The *OsNUC1* has a potential involvement of the salt stress signaling. In this experiment, the function of *OsNUC1* on salt resistant was identified in correlation with ABA signaling if it acts via ABA-dependent or ABA-independent pathways. The exogenous ABA application was used as the strategy to determine the function of this gene in ABA signaling. In previous reports, the application of exogenous ABA to both whole plants and in tissue culture facilitated the adaptation to subsequent increased salinity in several phylogenetically diverse plants. Thus, ABA treatment prior to an increased salinity insult was reported to improve the growth of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) (Khadri et al., 2007), to reduce leaf abscission and increased salt tolerance in citrus plants (Gómez Cardenas et al., 2003), and to induce salt adaptation in jojoba shoots grown *in vitro* (Mill et al., 2001).

The *OsNUC1* gene expression under normal and salt-stress conditions was examined by real time RT-PCR technique. The *OsNUC1* gene was significantly induced by exogenous ABA application under both conditions. We also found that ABA induced *OsNUC1* gene expression in the salt-resistance rather than salt-susceptible line. To elucidate the action of *OsNUC1* in salt-stress signaling which it acts via ABA-dependent or ABA-independent pathway, the ABA biosynthesis inhibitor, abamine SG, was added into the nutrient solution and than evaluated the change in *OsNUC1* transcript level. This result performed the *OsNUC1* responses to salt stress by action via ABA-independent pathway to enhance salt-resistant ability.

วัตถุประสงค์

To determine if the *OsNUC1* gene action via ABA dependent or ABA independent pathway using exogenous ABA and anti-ABA substance application.

วิธีการศึกษา

1. Plant materials and growing conditions

The Thai indica rice (Oryza sativa L.) cultivar Leung Pra Tew 123 (LPT123) was obtained from the Agriculture Department, Ministry of Agriculture and Cooperation, Thailand, and was used in comparison with the salinity-tolerant line, LPT123-TC171 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991; Thikart et al., 2005), were grown in modified WP nutrient solution (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) in the greenhouse with natural light (93–99 μmol photon.m-2.s-1) and a relative humidity of between 74% and 81%. Germinated seeds were transferred to modified WP nutrient solution for 1 week in a greenhouse under natural light. The nutrient solution was changed once a week during the experimental period. Rice seedlings were grown in WP no. 2 nutrient solution (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) for fourteen days before being subjected to the salt-stress condition provided by the addition of 0.5 % (w/v) NaCl. After tissue collection, it was immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until RNA extraction was performed.

Exogenous ABA and AbamineSG treatment

To test if ABA is required for *OsNUC1* gene expression, two parallel experiments were performed. In the first, the 100 μM cis-, trans-ABA (Sigma) solution was sprayed on the two-week-old, normal-grown seedlings everyday for nine days, then *OsNUC1* gene expression was quantified by real-time PCR after 0, 3, 6 and 9 days after treatment. In the second parallel experiment, 50 μM abamine SG, which is a potent ABA inhibitor via inhibition of NCED in the ABA synthesis pathway (Kitahata et al., 2006), was add into the nutrient solution (systemic) to a final concentration of 50 μM, and *OsNUC1* gene expression was assayed as transcript levels by two stage quantitative real time RT-PCR at 0, 1 and 2 days after treatment. Longer experimental periods than two days led to severe

damage of seedlings and so were not assayed. Abamine SG was provided by Prof. Dr. Tadao Asami (RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan).

2. Expression profile

RNA extraction

Leaf blade tissues were used for RNA extraction in which the standard hot-phenol method (Udomchalothorn et al., 2009).

Real-time polymerase chain reaction

The first strand cDNA was synthesized with 1-3 μg of purified total RNA (pre-treated with DNaseI) using oligo(dT)15 primers and cDNA was synthesized with Sensicript Reverse Transcriptase (QIAGEN). The primer sequences for *OsNUC1* are as followed: 5'-ATGGATCTGACCTCGGTGGA-3' (sense) and 5'GTCTTCCTCCTCTCTCAGTG-3' (antisense). To normalize gene expression, a parallel amplification of *OsACTIN* (accession number: AK101613), the housekeeping control gene, was performed using *OsACTIN* specific primers; forward primer: 5'-AGCTATCGTCCACAGGAA-3' and reverse primer: 5'-ACCGGAGCTAATCAGAGT-3'. Real-time PCR technique was used for quantitatively determine the expression profile of the *OsNUC1*. The quantitative real-time PCR was conducted on the Opticon2 Continuous Fluorescence Detector System (MJ research, USA). Each reaction contained 10 μl of 2x SYBR Green Master Mix Reagent (Toyobo), 1 μl of cDNA samples, and 200 nM gene-specific primers in a final volume of 20 μl. The thermal cycle used was as follows: 94 °C for 20min, than 40 cycles of 94 °C for 20s, 53 °C for 20s and 72 °C for 20s, then a final extension at 72 °C was done for 10 min.

ผลการศึกษา

The potential involvement of ABA in *OsNUC1* gene expression was investigated by following the expression levels of *OsNUC1* gene transcripts after exogenous application of 100 μM ABA, an inhibitor of ABA biosynthesis (Kitahata et al., 2006), as described in the methods section. On day1 and day2 after treatment, the exogenous ABA application clearly induced significant levels of *OsNUC1* transcript expression in two week-old seedlings of both the salt-sensitive and salt-tolerant lines grown under normal conditions with slightly numerically but not statistically significantly higher transcript levels seen in the salt-resistant line (Figure 1). However, both these indica rice lines *OsNUC1* transcript levels at three days after ABA treatment had returned to near basal levels and showed only weakly elevated transcript levels compared to the controls. Thus, the salt-tolerant line had an apparent higher at the level of *OsNUC1* transcript expression levels than the salt-sensitive one.

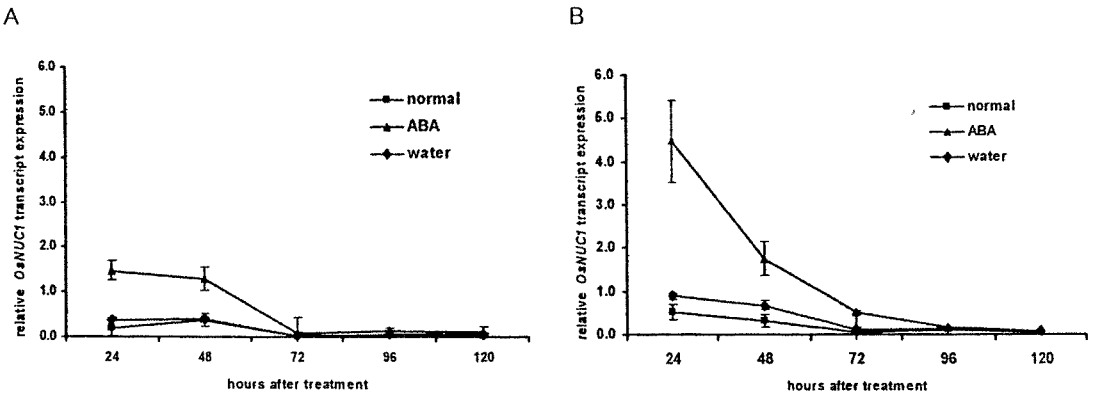


Figure1. Exogenous ABA induced gene expression of *OsNUC1* in rice seedlings, LPT123 (A) and its isogenic line, LPT123-TC171 (B), under normal condition.

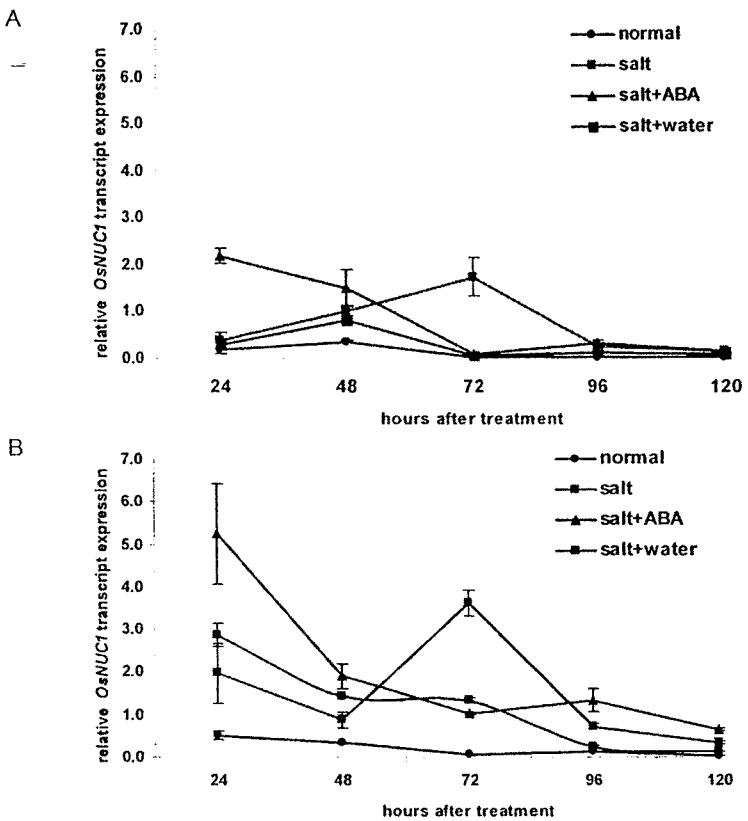


Figure2. Exogenous ABA induced gene expression of *OsNUC1* in rice seedlings, LPT123 (A) and its isogenic line, LPT123-TC171 (B), under salt stress condition.

Salt-stress also induced *OsNUCS1* transcript expression in both rice lines, but the magnitude and kinetics markedly differed from that observed by exogenous ABA application. The exogenous ABA induces the earlier response of *OsNUC1* gene expression under salt stress (Figure 2). While the abamine SG didn't affect on the *OsNUC1* gene expression under normal condition (Figure 3). The *OsNUC1* transcript level in abamineSG treatment was similar to that of the control treatment, so the abamine SG also didn't affect on the *OsNUC1* expression under salt stress condition (Figure 4). Therefore, the *OsNUC1* function to salt stress via ABA-independent pathway.

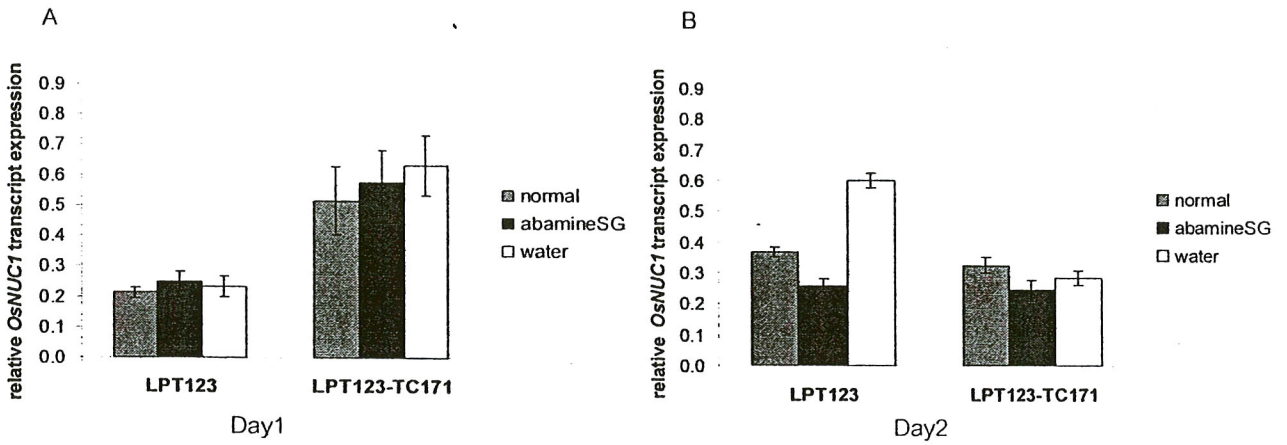


Figure3. Effect of abamine SG on *OsNUC1* gene expression on day1 (A) and day2 (B) after treatment under normal condition.

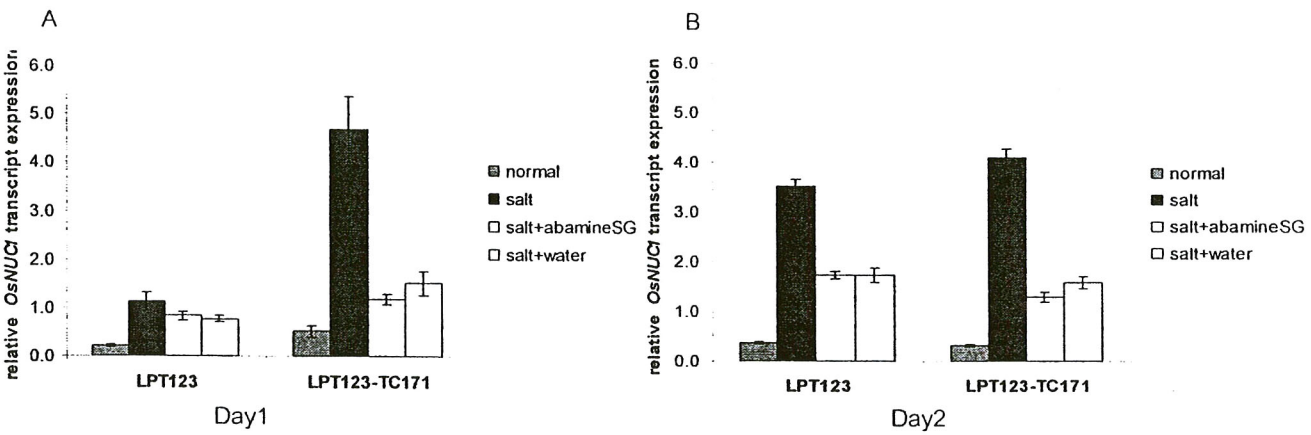


Figure4. Effect of abamine SG on *OsNUC1* gene expression on day1 (A) and day2 (B) after treatment under salt stress condition.

To confirm that the application of abamine SG causes the reduction in ABA content and also inhibits other ABA responsive genes, the ABA content in leaves and the gene expression of *OsCIPK15* and *OsCYP707A5*, which were previously reported to be induced by ABA, were evaluated. Application of abamine SG caused approximately 10-12 fold reduction in ABA content

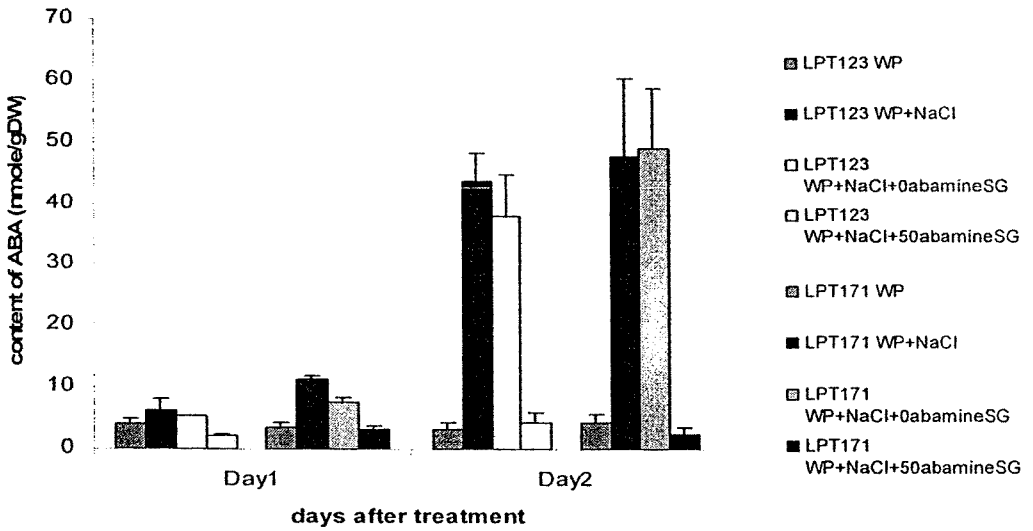


Figure5. ABA content (nmole/gDW) in the LPT123 and LPT123-TC171

in leaf tissues after 2 days of treatment (Figure 5). ABA content measurement had to be determined within a short period of the experiment, because rice seedlings with salt stress together with abamine SG application would not survive in the longer period.

สรุปผลการศึกษา

The *OsNUC1* gene was induced by the exogenous ABA application under normal and salt stress condition. However, the exogenous ABA is not requirement of this gene function. We provide data consistent with the notion that *OsNUC1* transcript induction is involved in ABA-independent, as topical ABA application induces *OsNUC1* transcript expression under both normal and salt stress conditions, whilst application of the ABA biosynthetic inhibitor abamine SG doesn't inhibited *OsNUC1* transcript expression levels. The *OsNUC1* gene responses to salt stress by action via ABA-independent pathway to enhance salt-resistant ability.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

This experiment will clarify the effects of salt-resistant gene on salt stress such as the searching or selective breeding for new plant cultivars with the desired stress tolerant characters, and the investigation of stress tolerant plants as model systems to evaluate stress tolerant mechanisms.

เอกสารอ้างอิง

Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (ed.): Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Pp. 1158–1203. American Society of Plant Physiologists, Rockville.

Chandler, P.M., Robertson, M. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 113-141.

Gómez-Cardenas, A., Arbona, V., Jacas, J., Primo-Millo, E., Talon, M., 2003. Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. J. Plant Growth Regul. 21: 234–240.

Khadri, M., Tejera, N.A., Lluch, C. 2007. Sodium chloride–ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. Environmental and Experimental Botany. 60: 211-218.

Kitahata, N., Han, S.Y., Noji, N., Saito, T., Kobayashi, M., Nakano, T., Kuchitsu, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Matsumoto, S., Tsujimoto, M., Asamia, T. 2006. A 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase inhibitor for use in the elucidation of abscisic acid action mechanisms. Biol. and Med. Chem. 14: 5555–5561.

Leung, J., Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. Annual Review of Plant Physiology 49: 199–222.

Mills, D., Zhang, G., Benzioni, A. 2001. Effect of different salt and of ABA on growth and mineral uptake in jojoba shoots grown in *vitro*. J. Plant. Physiol. 158: 1031–1039.

Nambara, E., Marion-Poll, A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annual Review of Plant Biology 56, 165–185.

Vajrabhaya, M., Vajrabhaya, T. 1991. Somaclonal variation of salt tolerance in rice. In YPS Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin Heidillberg : Spring-Valege. 14:368-382.

Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 53: 247-273.

โครงการ CEB_D_24_2010

CEB_D_24_2010

ชื่อ-นามสกุล นางสาวจิรัฏติกาล แก้วเมืองมูล **เลขประจำตัว** 5173805423
หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ลักษณะสมบัติและการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์แอลฟากลูโคซิเดสชนิดที่ I, II และ III ในผึ้งไทย *Apis cerana indica*

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Characterization and Expression of recombinant α-glucosidase I, II and III in the Thai honeybee *Apis cerana indica*

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม Professor Dr. Atsuo Kimura
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ

1.คำนำ

ผึ้งสามารถสร้างน้ำผึ้ง (Honey) ได้จากเอนไซม์ α - Glucosidase (HBGase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิด exo-type carbohydrolase โดยการเปลี่ยน Inversion ของน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่มีอยู่ในน้ำหวาน (Nectar) โดยงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในผึ้งยุโรป *A. mellifera* พบ HBGase อยู่ 3 isoform ได้แก่ HBGase I, HBGase II และ HBGase III ซึ่งในแต่ละ isoform มีความแตกต่างกันทั้งในลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน การเข้าทำปฏิกิริยากับ substrate และ localization โดย HBGaseI ,II และ III มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 1,986 bp (ORF คือ 1,767 bp) 1,910 bp (ORF คือ 1,743 bp) และ 1,915 bp (1,704 bp) ตามลำดับ

ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเอนไซม์ HBGase I, II, และ III ในผึ้งพันธุ์ยุโรป *A. mellifera* ทั้งใน Native enzyme และ recombinant enzymes แต่ยังไม่มีการศึกษา recombinant enzymes ในผึ้งไทยเลย ยกเว้นได้มีการศึกษา Native enzyme ในผึ้งโพรง *A. cerana*และ ผึ้งมิ้ม *A. florae* แล้ว ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาเอนไซม์ HBGase I, II, และ III ของrecombinant clones จากผึ้งโพรง A. *cerana indica* ซึ่งเป็นผึ้งเศรษฐกิจของไทย และนิยมเลี้ยงกันในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง โดยในงานวิจัยนี้จะหา full length cDNA ของ HBGase I, II และ III เพื่อทำการ clone เข้าสู่ pPICZαA แล้วดูการ expression ของยีนในเซลล์ยีสต์ *Pichia pastoris* แล้วทำการ Characterization ยีนที่ได้จากการ recombinant clones ต่อไป ซึ่งคาดว่าเอนไซม์นี้ที่ได้จากรีคอมบิแนนท์ของผึ้งน่าจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสได้ดีกว่า α - Glucosidase ที่ได้จากแบคทีเรีย

2.วัตถุประสงค์

1. ศึกษา full length cDNA ของ α - Glucosidase I, II และ III จากผึ้งไทย *A cerana indica*
2. วิเคราะห์การแสดงออกของยีน และทำการ Purify รีคอมบิแนนท์ของ α - Glucosidase I, II และ III ในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)
3. ทำการ Characterize รีคอมบิแนนท์ของ α - Glucosidase I, II และ III

3.วิธีการศึกษา

3.1 Honey bee source

เก็บตัวอย่างผึ้งโพรง *A. cerana* จากฟาร์มผึ้งในจังหวัดสมุทรสงคราม และเก็บตัวอย่างผึ้งไว้ที่ -80^0 C จนกว่าจะนำมาทดสอบ

3.2 RNA extraction และ cDNA synthesis

นำผึ้งจากข้อง 3.1 มาทำการบดด้วย liquid nitrogen ด้วย mortar แล้วทำการสกัด RNA ด้วยวิธี Phenol/Chloroform แล้วนำมาตรวจสอบ RNA ที่สกัดได้ด้วย 1.2% (w/v) formaldehyde และ agarose gel electrophoresis ด้วยการย้อมสี ethidium bromide แล้วส่องดูด้วย UV spectrophotometers หลังจากนั้นจะทำการสกัด mRNA ด้วย oligotex mRNA mini kit (Qiagen)

3.3 Primer design และ RT-PCR to obtain full length cDNA

ออกแบบ Primer ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจ โดยการออกแบบ primer อ้างอิงจากยีน HBGase I, II และ III จากผึ้งพันธุ์ญี่ปุ่น *A. mellifera* โดยใช้โปรแกรม primer 3 แล้วทำ cDNA โดยวิธี RT-PCR โดยใช้ RT-PCR system kit (Promega) ในแต่ละ reaction (25 μl) ประกอบไปด้วย 200 ng RNA template, 1xAMV/T*fl* reaction buffer, 0.2 μM ของ dNTP, 0.4 μM ของ Forward primer และ reverse primer , 1 mM ของ $MgSO_4$, 0.1 U ของ AMV reverse transcriptase และ 0.1 U T*fl* DNA polymerase หลังจากนั้นทำ RT-PCR โดยใช้ condition ดังนี้ 1 cycle ของ 48^{0}C 45 นาที และ 94^{0}C 2 นาที ตามด้วย 30 cycles ของ 94^{0}C 30 วินาที, 42^{0}C 30 วินาที และ 68^{0}C 2 นาที และขั้นสุดท้าย 1 cycle ของ 68^{0}C 7 นาที หลังจากทำ RT-PCR เสร็จแล้วนำไป run agarose gel electrophoresis เพื่อดูผลของ PCR products ที่ได้ หลังจากได้ band PCR product แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติหน่วย Bioservice unit (BSU)

3.4 Expression recombinant

เมื่อได้ full length ของยีน HBGI, II และ III แล้วทำการ Clone เข้าสู่ pPICZαA แล้ว vary % MeOH ที่ใช้ในการ induced enzymes โดยทำ starter (clone ที่มี HBGase III) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 ml BMGY (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% YNB, 4x10^{-50}% biotin, 1% glycerol or 0.5% methanol) ทำการ shaking ที่ 30^{0}C 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา inoculate ลงใน 10 ml fresh BMGY จำนวน 10 flask (sample 5 flask, control 5 flask โดยใช้ GS115/pPICZ/lacz เป็น positive control) โดยใช้ความเข้มข้น 100 μl starter/ 1 ml BMGY หลังจากนั้น shaking ที่ 30^{0}C 200 rpm จนกระทั่ง OD_{600} มีค่า 2-6 แล้วนำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเก็บ cell pellet หลังจากนั้นเตรียม BMMY (ใช้ MeOH แทน glycerol) ที่ความเข้มข้น 0%, 1%, 2.5%, 5% และ 10% แล้วนำ cell pellet ที่ได้จาก BMGY ข้างต้นมาใส่ใน BMMY แล้วทำการเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 200 ชั่วโมง (shaking ที่ 30^{0}C 200 rpm) ในแต่ละวันเก็บตัวอย่าง flask ละ 1 ml แล้วนำไปปั่นเพื่อแยกส่วน pellet และ supernatant (media) ที่ 10,000 rpm 4^{0}C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำไปวัดค่า Enzyme activity ต่อไป

3.5 วิธีการ Assay Enzymes activity

ใช้วิธี *p*-nitrophenol Method (Nishimoto, 2007) โดยในหลอดทดลองประกอบด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 0.05 ml, 5mM p-nitrophenyl α- glucoside (PNPG) (Sigma) ปริมาณ 0.05 ml และ 0.1M Sodium acetate buffer (pH 5.5) ปริมาณ 0.1 ml หลังจากนั้นนำหลอดทดลอง (mixture) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}C เป็นเวลา 2-3 นาที หลังจากนั้นนำ Enzyme ในส่วน media และ pellet มาใส่ในหลอดทดลอง (mixture) 0.05 ml แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}C เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 ml 1 M Sodium carbonate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัด OD_{400} nm เพื่อดูค่าดูดกลืนแสงสีเหลือง โดยเปรียบเทียบกับ Blank (0.5 ml น้ำกลั่น และ 0.5 ml 1M sodium carbonate) และ control (0.2 ml น้ำกลั่น 0.5 ml 1M sodium carbonate และ 0.05 ml 5mM PNPG) สำหรับ pellet นั้นก่อนจะนำไปเติมใน mixture ให้ทำการ break cell ก่อนโดยใช้ Breaking buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.4, 1mM PMSF of other protease inhibitor, 1 mM EDTA, 5% glycerol) หลังจากนั้นวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี $E^{1\%}_{1cm}$ ที่ A280 nm (Nishimoto *et al.*, 2001)

วิธีการคำนวณ Activity

Enzyme activity (U/ml) = Real A400 x 0.037 μmol x 1/T x 1/E x enzyme dilution โดยที่

Real A400 = OD_{400} Sample – OD_{400} Blank , T = incubation time (10 min), E = enzyme solution (0.05 ml)

3.6 Purified Enzyme ด้วย His-trap affinity column

นำส่วน pellet ที่ได้จาก Large scale (1.2 liter BMMY) มาทำการ Break cell แล้วนำส่วน supernatant มาทำการ concentrated protein ด้วย Vivaspin 20 (GE Healthcare) ที่ความเร็ว 8,000 rpm 4^{0}C จนกระทั่งเหลือตัวอย่างปริมาตร 10 ml เพื่อนำมาเข้า HisTrap affinity columms ขนาด 1 ml (GE Healthcare) เตรียม binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M Nacl, 20-40 mM imidazole, pH 7.4) และ elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M Nacl, 500 mM imidazole, pH 7.4) หลังจากนั้นล้าง column ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ syringe ประมาณ 3-5 ml แล้ว equilibrate column ด้วย binding buffer อย่างน้อย 5 ml โหลดตัวอย่างของเราลงไป ตามด้วย binding buffer เพื่อล้าง column อย่างน้อย 10-15 ml ขั้นตอนสุดท้ายคือ elute protein ด้วย elution buffer 5 ml เก็บ fraction ละ 2 ml จำนวน 15 fraction แล้วทำการ Assay enzyme

4.ผลการศึกษา

4.1 full length cDNA ของ HBGase I และ II

สำหรับการทำ full length cDNA ของ HBGase I และ II โดยใช้ primer ที่ออกแบบมาจาก HBGase I และ II จากผึ้งพันธุ์ยุโรป *A. mellifera* ได้ผลดังตารางที่ 1 ซึ่งผลดังกล่าวได้เพียง partial cDNA บางส่วนของยีน HBG I และ II เท่านั้น โดยยังต้องทำการ Amplify ยีนบริเวณดังกล่าวต่อไป

คู่ Primer	F1R1	F2R2	F3R3	F4R4
HBGase I	/	/	/	-
HBGase II	-	/	/	/

ตารางที่ 1 แสดง patial cDNA ของ HBGase I และ II โดยใช้เทคนิค RT-PCR

4.2 Expression Recombinant *Pichia pastoris* ของยีน HBGase III

หลังจากที่ได้ทำการ amplify ยีนทั้งสาย (full length) โดยใช้ FW primer ที่มีบริเวณ restriction site ของ Eco*RI* และ ใช้ RW primer ที่มีบริเวณ restriction site ของ KpnI แล้วทำการ Electroporation เข้าสู่ *P. pastoris* แล้ว induced ด้วย 1% Methanol พบว่า Enzyme ในส่วน pellet มี activity สูงกว่า supernatant (media) ซึ่งมีค่า activity น้อยมากๆ จึงสรุปได้ว่า Enzyme ส่วนใหญ่อยู่ใน pellet และค่า Specific activity ของ pellet สูงที่สุดในช่วง day 7 (144h) หลังจาก induced ด้วย 1%MeOH จึงได้ทำการเตรียม purified โดยทำ Large scale (1.2 liter BMMY) แล้วทำการ induced ด้วย 1%MeOH เป็นเวลา 7 วัน (144h) หลังจากนั้นได้ทำการ Assay Enzyme activity ผลดังตารางที่ 2

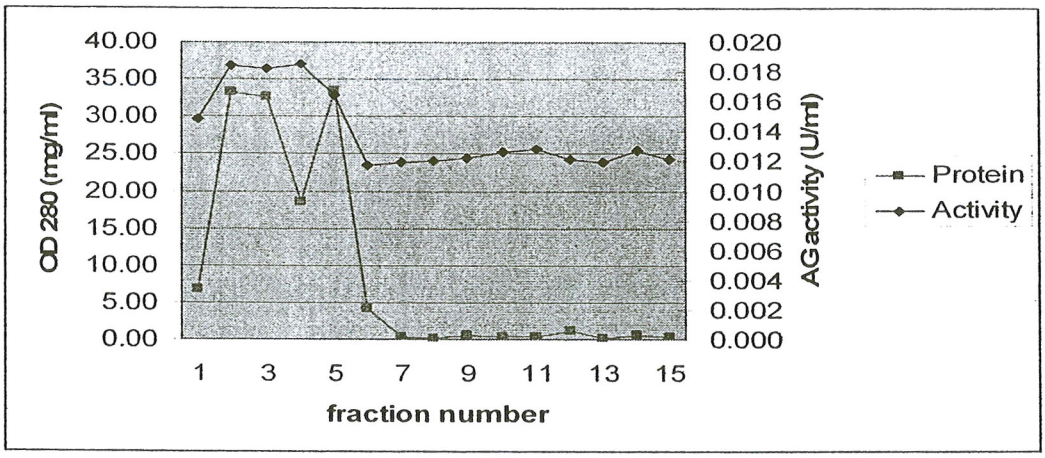
ตารางที่ 2 ผลการ induced *HBGase* III ด้วย 1%MeOH ใน 1.2 Liter BMMY

Source	Enzyme Activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
Pellet	0.09	45.3	0.002
Media	0.005	55.5	0.00009

จากตารางที่ 2 พบว่าค่า Enzyme Activity ของ *HBGase* III จาก *Apis cerana* ในส่วน pellet ได้ค่า 0.09 U/ml ซึ่งใกล้เคียงกับ *HBGase* III จาก *A. mellifera* ซึ่งมีค่า 0.12 U/ml (Nishimoto *et al.*, 2007)

4.3 Purified Enzyme ด้วย His-trap affinity column

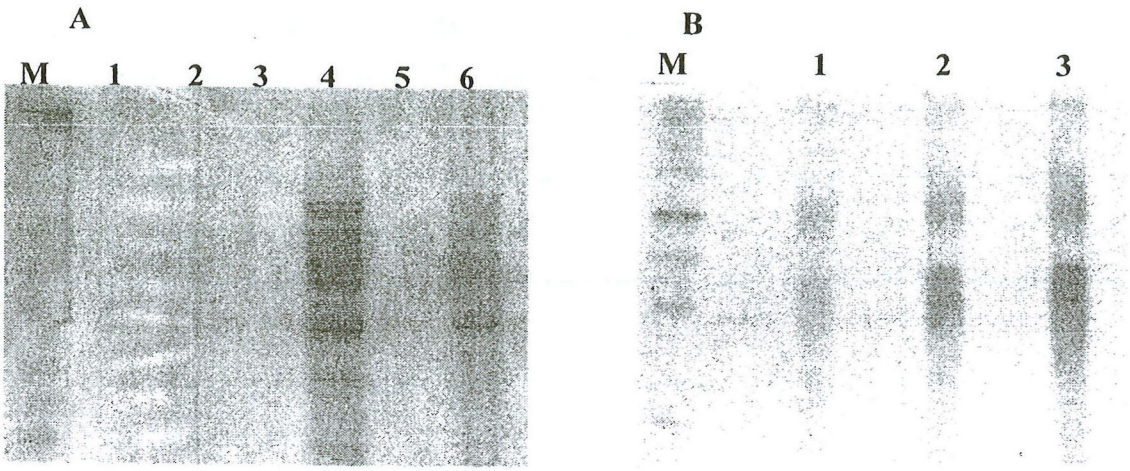
หลังจากนำส่วน Pellet มาทำการ Purified ด้วย His-trap affinity column แล้ว ได้ผลดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Enzyme activity และปริมาณโปรตีนจากการ purified

Fraction 1-5 = sample, fraction 6-12= wash (binding buffer), fraction 13-15 = elution buffer

จากรูปที่ 1 แสดงว่า *HBGase* III มี activity สูงในส่วนของ unbound ซึ่งผลสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่มีใน fraction ที่ 1-5 ซึ่งสาเหตุที่ *HBGase* III ไม่สามารถเกาะกับ column ได้นั้นอาจเนื่องมาจากความเป็นขั้วของโปรตีนไม่เหมาะสม เนื่องจากในการ design primer นั้นได้ design ในส่วน polyhistidine tag เข้าไปในส่วน primer ด้วย และใน Vector (pPICZαA) นั้นก็มี polyhistidine tag อยู่ก่อนแล้ว



รูปที่ 2 แสดง SDS-PAGE ของ *HBGaseIII* ภาพ A: Lane 1-3 แสดงรูปแบบโปรตีนจาก supernatant (media) Lane 4-6 แสดงรูปแบบโปรตีนจาก pellet ก่อนเข้า column และภาพ B: แสดงรูปแบบโปรตีน ที่ได้จากการ poll รวมของ fraction ที่ 1-5 ปริมาณ 10 μg, 25 μg และ 50 μg ใน Lane 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

เมื่อนำ enzyme fraction ที่ 1-5 มา pool รวมกับแล้วนำมา concentrated protein ด้วย Vivaspin 20 (GE Healthcare) ให้เหลือ enzyme ประมาณ 3 ml แล้วนำมา run SDS-PAGE ก็ได้ดังรูปที่ 2B แสดงให้เห็นว่าหลังจากนำมา purified แล้ว band protein สะอาดขึ้น หลังจากนั้นนำ Enzyme มาทำการหา Optimum conditions for enzyme activity ต่อไป

4.4 Optimum condition for enzyme activity

4.4.1 pH activity (Nishimoto *et al.*, 2001)

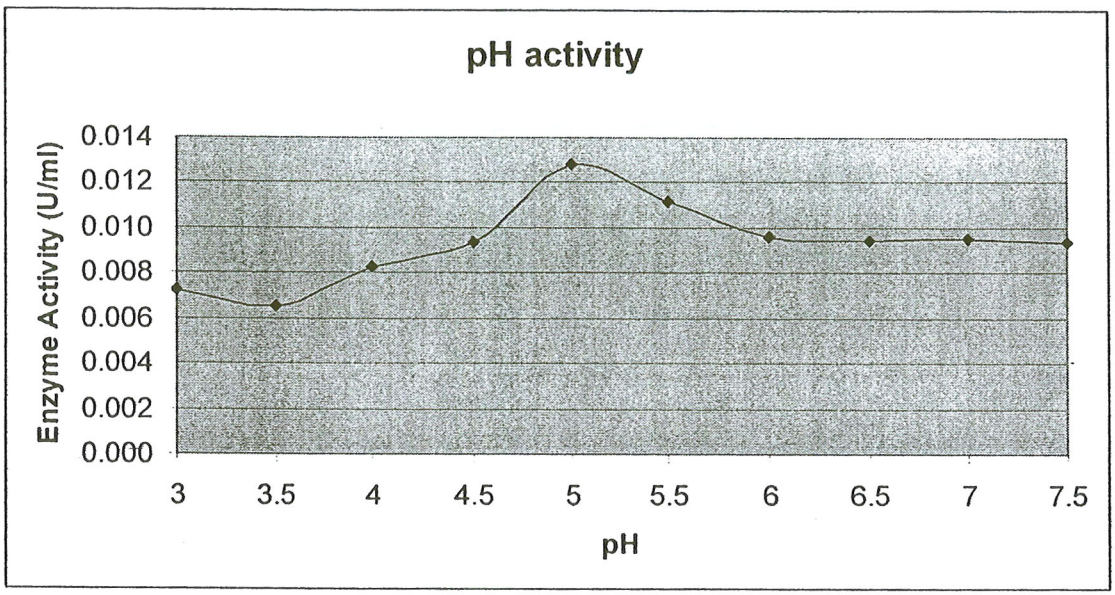
วิธีการหา pH activity เริ่มต้นโดยการเตรียม Briton-Robinson buffer pH 3.0-7.5 (40mM acetic acid, 40 mM phosphoric acid, 40 mM boric acid) แล้วปรับ pH ตามต้องการด้วย 1M NaOH หลังจากนั้นนำ enzyme ตัวอย่างไป Assay ที่ buffer pH ต่างๆ แล้วดูค่า Enzyme activity ทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย

4.4.2 pH stability (Wongchawalit *et al.*, 2006)

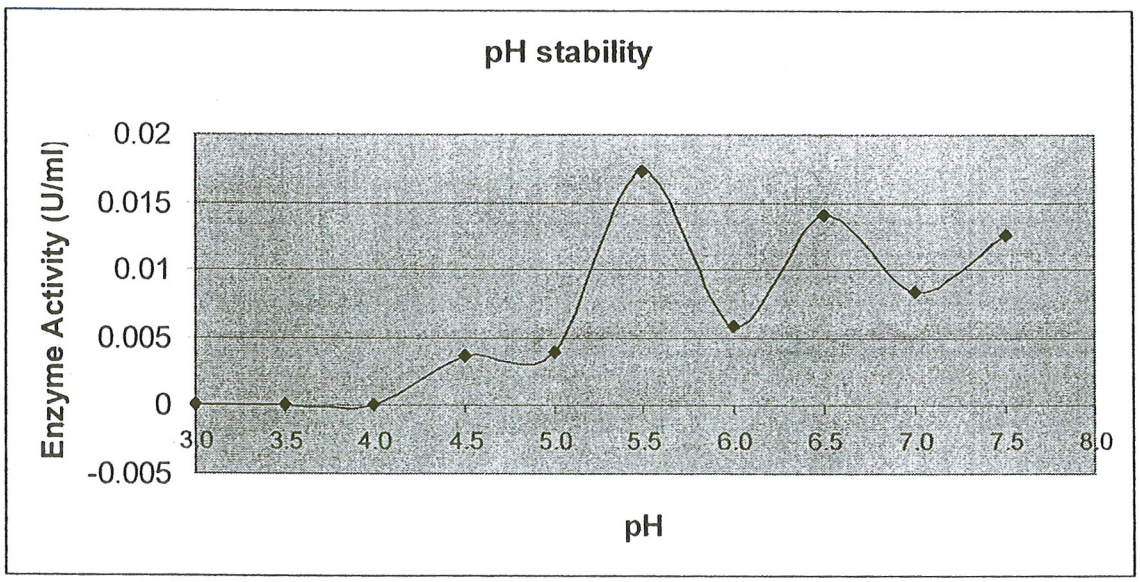
วิธีการหา pH stability ทำโดยนำ enzyme มา diluted ด้วย Briton-Robinson buffer pH 3.0-7.5 แล้วนำไปบ่มที่ 4^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมา Assay enzyme activity ทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย

4.4.3 thermal stability (Nishimoto *et al.*, 2007)

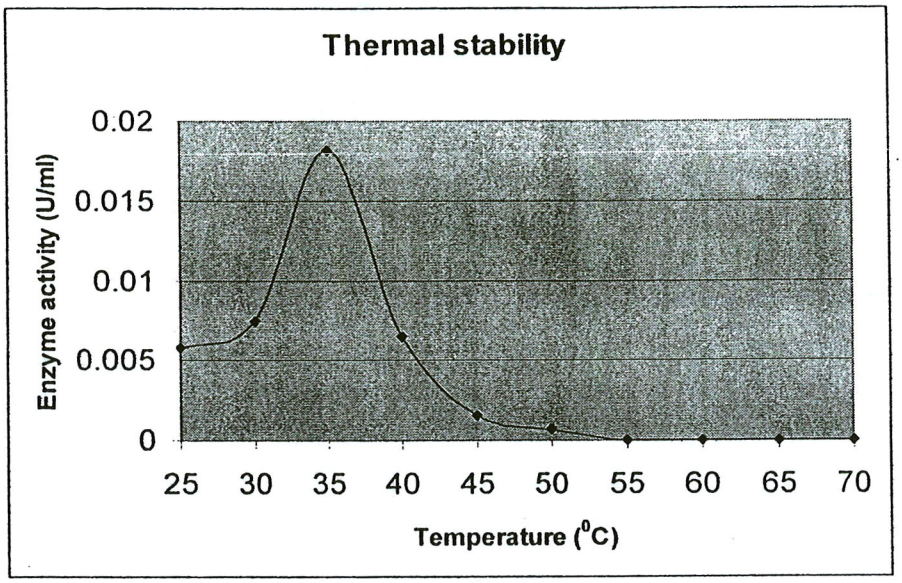
ทำโดยการ dilute enzyme ด้วย 0.1M sodium acetate buffer (5.5) ที่มี 0.05% Triton X-100 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ (25-70^{0}C) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ mixture ไป chill on ice แล้วนำไป pre-incubated ที่ 37^{0}C ประมาณ 2-3 นาที แล้วนำไป Assay enzyme activity ทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย



รูปที่ 3 แสดงค่า pH activity ของ *HBGase* III ที่ได้จากการ Assay enzyme ที่ Buffer pH ต่างๆกัน



รูปที่ 4 แสดง pH stability ของ *HBGase*III หลังจากบ่มด้วย buffer ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมา Assay enzyme activity



รูปที่ 5 แสดง Thermal stability ของ HBGaseIII หลังจากบ่ม enzyme ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมา Assay enzyme activity

ตารางที่ 4 แสดง Properties ของ Native และ Recombinant HBGaseIII ของผึ้งโพรงไทย และผึ้งพันธุ์ญี่ปุ่น

Enzyme properties	A. cerana		A. mellifera (Nishimoto *et al.*, 2007)	
	native (HBGase) (Chanchao *et al.*, 2008)	Recombinant (HBGase III)	native (HBGase III)	Recombinant (HBGase III)
optimum pH	5.0	5.0	5.5	5.7
pH stability	-	4.5-7.5	5.0-10.0	5.0-10.3
Thermal stability	-	<50°C	<40°C	<40°C
Optimum temperature	50°C	-	-	-

5. สรุปผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

จากการทดลอง Expression ของเอ็นไซม์ α-glucosidase III (*HBGase*III) จากรีคอมบิเนนท์ของผึ้งโพรงไทย *Apis cerana indica* พบว่าสามารถ express enzyme activity ได้สูงสุดเมื่อ induced ด้วย 1%MeOH เป็นเวลา 144 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMMY หลังจากที่ได้ทำ Large scale พบว่าเอ็นไซม์มี Activity 0.09 U/ml ซึ่งผลการทดลองใกล้เคียงกับ Activity ของรีคอมบิเนนท์ของผึ้งพันธุ์ญี่ปุ่น *Apis mellifera* (Nishimoto *et al.*, 2007) ซึ่งมีค่า 0.12 U/ml เมื่อนำมาจำแนก Characterization ต่างๆ พบว่ารีคอมบิเนนท์ของ *HBGase*III มี pH Activity สูงสุดที่ 5.0 ซึ่งตรงกับ native enzyme α-glucosidase จาก *Apis cerana indica* (Chanchao *et al.*, 2008) และมีค่า pH stability ระหว่างช่วง pH 4.5-7.5 นอกจากนั้นยังสามารถ Assay enzyme ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50°C ซึ่งเป็นข้อดี

ของรีคอมบิเนนท์จากผึ้งโพรงไทยที่ enzyme สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงๆ ได้ดีกว่ารีคอมบิเนนท์ที่ได้จากผึ้งโพรงญี่ปุ่น ซึ่ง Assay enzyme ได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40^{0}C ดังตารางที่ 4

Future experiment

ทำ substrate specificity ของ *HBGaseIII* ซึ่งจะใช้ substrate ต่างๆ คือ maltose, maltotriose maltoteraose, isomaltose, sucrose, PNPG, และ soluble starch แล้วนำมาหาค่า kinetic ของ enzyme

6.เอกสารอ้างอิง

Chanchao, C., Pilalam, S., and Sangvanich, P. 2008. Purification and characterization of α-glucosidase in *Apis cerana indica*. *Insect Science* 15: 217-224.

Nishimoto, M., Kubota, M., Tsuji, M., Mori, H., Kimura, A., Matsui, H., and Chiba, S. 2001. Purification and Substrate specificity of honeybee, *Apis mellifera* L., α-glucosidase III. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65: 1610-1616.

Nishimoto, M., Mori, H., Moteki, T., Takamura, Y., Iwai, G., Miyaguchi, Y., Okuyama, M., Wongchawalit, J., Surarit, R., Svasti, J., Kimura, A., and Chiba, S. 2007. Molecular cloning of cDNAs and genes for three α-glucosidase from european honeybee, *Apis mellifera* L., and heterologous production of recombinant enzymes in *Pichia pastoris*. *Bioscience, Biotechnology,and Biochemistry* 71: 1703-1716.

Wongchawalit, J., Yamamoto, T., Nakai, H., Kim, Y.M., Sato, N., Nishimoto, M., Okuyama, M., Mori, H., Saji, O., Chanchao, C., Wongsiri, S., Surarit, R., Svasti, J., Chiba, S., and Kimura, A. 2006. Purification and characterization of α-glucosidase I from Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*) and molecular cloning of its cDNA. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 70: 2889-2898.

กลุ่มทางด้านประยุกต์

โครงการ CEB_M_52_2009

CE_M_52_2009

ชื่อ-นามสกุล นางสาวสุทธิณี เหลาแตว **เลขประจำตัว** 5072518023
หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** สัตววิทยา

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

นิเวศวิทยาการกินอาหารของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในพื้นที่เกษตรและป่าธรรมชาติ จังหวัดน่าน

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Feeding ecology of amphibians in agricultural area and natural forest, Nan Province

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฏฐ์ คนซื่อ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. ชัชวาล ใจซื่อกุล

คำนำ

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจัดว่ามีความสำคัญในระบบนิเวศ เป็นปัจจัยสำคัญในห่วงโซ่อาหารและกระบวนการถ่ายทอดและหมุนเวียนพลังงานที่ก่อให้เกิดความสมดุลในระบบนิเวศนั้นๆ นอกจากนี้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ วัดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เนื่องจากในช่วงระยะตัวอ่อนของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะต้องอาศัยอยู่ในน้ำ เมื่อโตเต็มวัยต้องมีความชื้นช่วยในการดำรงชีวิต ถ้าสภาพแวดล้อมแห้งแล้งขาดน้ำ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะไม่สามารถสืบพันธุ์ เจริญเติบโต และดำรงชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นจำนวนและความหลากหลายของชนิดที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ วัดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ นอกจากใช้เป็นตัวชี้วัดแล้ว สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกยังมีบทบาทในการควบคุมแมลง และกินแมลงเป็นอาหารหลักทำให้ลดจำนวนแมลงที่เป็นศัตรูพืช เป็นการช่วยลดการใช้สารเคมีควบคุมแมลงในพื้นที่ทำการเกษตรทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอันเกิดจากการใช้สารเคมีควบคุมแมลงลงได้ ซึ่งผลการศึกษาชนิดอาหารของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสามารถที่จะนำข้อมูลไปประยุกต์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้

ที่ผ่านมาการศึกษาทางด้านนิเวศวิทยาการกินอาหาร และชนิดอาหารของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษานิเวศวิทยาการกินอาหาร และชนิดอาหารของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญ สำหรับการนำสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมาใช้เป็นตัวควบคุมแมลงศัตรูตามหลักชีววิธี ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดอาหารของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในถิ่นอาศัย 2 แบบ ได้แก่ พื้นที่เกษตร และป่าธรรมชาติ ในพื้นที่ป่าห้วยหลวง บริเวณพื้นที่โครงการป่าชุมชนบ้านตาแวน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน
2. เพื่อเปรียบเทียบความหลากหลายของชนิดอาหารในถิ่นอาศัยทั้ง 2 แบบ
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและชนิดอาหารในถิ่นอาศัย 2 แบบ

วิธีการศึกษา

1) การศึกษาภาคสนาม

1.1 การสำรวจชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณป่าชุมชนบ้านตาแวน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน

1.1.1 ทำการสำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกด้วยวิธี Visual Encounter Survey (VES) แบบ Randomized Walking Design การสำรวจดังกล่าวดำเนินการในเวลากลางคืน เวลา 19:00-24:00 น. โดยทำการสำรวจเดือนละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 12 เดือน โดยทำการสำรวจในสภาพพื้นที่ 2 ประเภท ได้แก่ พื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่าธรรมชาติ จากนั้นทำการจำแนกชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกตามการจำแนกของ Taylor (1962) และ Chan-ard (2003) และทำการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่สำรวจพบดังนี้

- ขนาดลำตัวจากปลายปากถึงบริเวณรูเปิดทวาร (snout-vent length: SVL)
- ความกว้างของปาก โดยวัดจากมุมขากรรไกรด้านหนึ่งถึงมุมขากรรไกรด้านตรงข้าม (mouth width)
- ความยาวของปาก โดยวัดจากปลายปากถึงมุมขากรรไกร (mouth length)
- น้ำหนักตัว (body weight)
- เพศ (ถ้าสามารถดูจาก sexual secondary character ได้)

1.1.2 เก็บตัวอย่างอาหารที่อยู่ในกระเพาะอาหารของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่สำรวจพบด้วยวิธี Reversed Stomach (Hirai and Matsui, 2001) แล้วรักษาสภาพตัวอย่างอาหารที่พบในกระเพาะด้วย บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10 % เพื่อนำไปจำแนกชนิดอาหารในห้องปฏิบัติการต่อไป

1.2 การสำรวจชนิดแมลงบริเวณป่าชุมชนบ้านเรือง ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน

ทำการสำรวจชนิดแมลงในบริเวณเดียวกับที่ทำการสำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก โดยใช้วิธีดังต่อไปนี้

1.2.1 ทำการเก็บตัวอย่างแมลงในอากาศ ด้วยวิธีใช้สวิงจับ (sweeping method) ที่ระดับความสูงประมาณ 0-50 ซม. (Hirai and Matsui, 1999) โดยตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บได้จะนำมาเก็บรักษาสภาพตัวอย่างที่พบในแอลกอฮอล์ 95 %

1.2.2 ทำการเก็บตัวอย่างสัตว์หน้าดิน ด้วยการวางกับดักแบบหลุมโจน (pitfall trap) โดยนำถ้วยพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร สูง 40 มิลลิเมตร ฝังดินให้ปากถ้วยเสมอกับผิวดิน ก้นถ้วยใส่ detergent ผสมน้ำที่ความเข้มข้น 10% เพื่อไม่ให้แมลงที่ตกลงไปสามารถขึ้นมาได้ จากนั้นทำการเก็บรักษาสภาพตัวอย่างแมลงที่พบในแอลกอฮอล์ 95 %

1.2.3 ทำการเก็บแมลงด้วยกับดักแสง (light trap) โดยเริ่มวางกับดักเวลา 19:00-24:00 น. จากนั้นทำการเก็บรักษาสภาพตัวอย่างแมลงที่พบในแอลกอฮอล์ 95 %

2) การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2.1 การจำแนกกลุ่มแมลงที่สำรวจพบ ทำการจำแนกกลุ่มของแมลง ระดับอันดับ (order) และระดับวงศ์ (family) รวมทั้งทำการวัดขนาดความกว้าง และความยาวของแมลงแต่ละกลุ่ม เพื่อนำมาสร้างสมการเชิงเส้นของขนาดแมลงแต่ละกลุ่มที่สำรวจพบ

2.2 การจำแนกชนิดอาหารที่พบในกระเพาะของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก โดยจำแนกชนิดอาหารที่พบใน ระดับชั้น (class) สำหรับสัตว์ขาปล้องที่ไม่ใช่แมลง ยกเว้นในกลุ่มแมลงจะทำการจำแนกใน ระดับอันดับ และระดับวงศ์ จากนั้นทำการวัดขนาดความกว้างและความยาวของเหยื่อแต่ละตัวที่พบโดยไม่รวมหนวดและ cerci ในกรณีที่อาหารเป็นแมลง และถูกย่อยไปบางส่วนจะทำการทำนายขนาดของอาหาร จากสมการเชิงเส้นของขนาดแมลงแต่ละกลุ่ม เพื่อนำมาคำนวณปริมาตรเหยื่อแต่ละตัวโดยใช้สูตร $V= 4/3\pi(L/2)(W/2)^2$ (Hirai and Matsui, 2000a; Hirai and Matsui, 2000b)

2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ ทำการวิเคราะห์ทางสถิติในด้านต่างๆ ต่อไปนี้

2.3.1 คำนวณความถี่ สัดส่วนจำนวนตัวและสัดส่วนปริมาตรเหยื่อแต่ละกลุ่มที่พบในกระเพาะอาหาร และเปรียบเทียบความถี่ของเหยื่อชนิดต่างๆ ที่พบในกระเพาะอาหารระหว่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด

2.3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด กับชนิดของเหยื่อ และขนาดของเหยื่อที่พบ

2.3.3 ความสัมพันธ์ของชนิดอาหารที่พบในกระเพาะของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก กับชนิดของแมลงที่พบในพื้นที่ที่ทำการศึกษา

2.3.4 คำนวณหา simple similarity index เพื่อดูการเกิด dietary overlap ระหว่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดเพื่อหาความสัมพันธ์ของอาหารที่พบในกระเพาะของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด

2.3.5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรมากสุดและปริมาตรน้อยที่สุดของอาหารกับขนาดลำตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด

ผลการศึกษา

จากการศึกษาในภาคสนามพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้งหมด 10 ชนิด (*Bufo melanostictus, Polypedates leucomystax, Fejervarya limnocharis, Hoplobratachus rugulosus, Occidozyga martesii, O. lima, Microhyala berdmorei, M. butleri, M. fissipes, M. heymonsi*) ในพื้นที่เกษตร และ 17 ชนิด (*B. melanosticthus, P. leucomystax, F. limnocharis, H. rugulosus, O. martesii, O. lima, Rana nigrovittata, R. livida, Limnonectes macrognathus, L. pileatus, L. kuhlii, L. hascheana, Xenophrys major, Leptobrachium smithii, Leptolalax pelodytoides,. M. fissipes* and *M. heymonsi*) ในพื้นที่ป่า จากการศึกษาพบว่า *O. martesii* เป็นชนิดที่พบมากในพื้นที่เกษตร และ *L. Macrognathus* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในพื้นที่ป่า และจากการวิเคราะห์อาหาร พบว่าอาหารส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแมลงและแมงมุมเป็นส่วนใหญ่

ผลการศึกาห้องปฏิบัติการ และการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติพบว่าความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่าไม่มีความแตกต่างกันมากนักและมีค่าความคล้ายคลึงของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่าเท่ากับ 0.519

สรุปผลและวิจารณ์

ผลจากการศึกษาพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้งหมด 19 ชนิด พบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 8 ชนิดในทั้งสองพื้นที่ และพบว่าในสองพื้นที่ศึกษาความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกไม่มีความแตกต่างกัน คือ 0.972 และ 0.957 ในพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่า จากการศึกษาอาหารในกระเพาะอาหารพบอาหารส่วนใหญ่ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอยู่ในกลุ่มสัตว์ขาข้อ (arthropoda) โดยเฉพาะในอันดับแมลง (insect) ที่พบในสัดส่วนร้อยละ 87.82 และ 87.02 ในพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่า โดยพบว่ากลุ่มเด่นอยู่ในอันดับ Hymenoptera และมีค่าความถี่ของการปรากฏของเหยื่อที่พบในพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่ามีค่าความถี่ใกล้เคียงกัน พบว่าสองพื้นที่มีค่าความถี่ปรากฏของแมลงกลุ่มมดมีค่าความสูงที่ 31.31 และ 21.14

จากการศึกษาในครั้งสามารถทำให้เราทราบว่าอาหารส่วนใหญ่ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) ในอันดับ arthropoda เป็นส่วนใหญ่ และจากข้อมูลดังกล่าวทำให้เราทราบถึงบทบาทของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในธรรมชาติที่สามารถใช้เป็นตัวควบคุมแมลงศัตรูพืชได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและชนิดอาหารในถิ่นอาศัยในแบบต่างๆ
2. ทราบบทบาทของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกต่อสัตว์อาหารชนิดต่างๆ
3. ได้สมการทำนายขนาดของแมลงที่เป็นอาหารของสะเทินน้ำสะเทินบกของประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

Attademo, A. M., Peltzer, P. M. and Lajmanovich, R. C. 2005. Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. **Agriculture Ecosystems and Environment** 106: 389-394.

Chan-ard, T. 2003. **A Photographic Guide to Amphibians in Thailand.** Bangkok: Darnsutha Press Co. Ltd.

Cicek, K. and Mermer, A. 2007. Food composition of the marsh frog, *Rana ridibunda* Pallas, 1771, in Thrace. **Turkey Journal of Zoology** 31: 83-90.

Hirai, T. 2004. Diet composition of introduced bullfrog, *Rana catesbeiana*, in the Mizorogaike Pond of Kyoto, Japan. **Ecological Research** 19: 375-380.

Hirai, T. and Matsui, M. 1999. Feeding habits of the pond frog, *Rana nigromaculata*, inhabiting rice fields in Kyoto, Japan. **Copeia** 4: 940-947.

Hirai, T. and Matsui, M. 2000a. Myrmecophagy in a ranid frog *Rana rugosa*: specialzation or weak avoidance to Ant Eating? **Zoological Science** 17: 459-466.

Hirai, T. and Matsui, M. 2000b. Feeding habits of the Japanese tree frog, *Hyla japonica*, in the reproductive season. **Zoological Science** 17: 977-982.

Hirai, T. and Matsui, M. 2001. Food habits of an endangered Japanse frog, *Rana porosa brevipoda*. **Ecological Research** 16: 737-743.

Hirai, T. and Matsui, M. 2002. Feeding ecology of *Bufo japonicas formosus* from the Montane Region of Kyoto, Japan. **Journal of Herpetology** 36(4): 719-723.

Hoddle, M. S. 2002. **Classical Biological Control of Arthropods in the 21st Century.** 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods. 14-18 January 2002. pp. 3-16.

Measey, G. J., Gower, D. J., Oommen, O. V. and Wilkinson, M. 2004. A subterranean generalist predator: diet of the soil-dwelling caecilian *Gegeneophis ramaswamii* (Amphibia; Gymnophiona; Caeciliidae) in southern India. **C. R. Biologies** 327: 65-76.

Taylor, E. H. 1962. The amphibian fauna of Thailand. **Univ. Kansas. Sci. Bull.** 43(8): 368-373.

White, A. 2004. Frogs as bio-indicators. **Frogfacts** 9: 1-4.

โครงการ CEB_M_56_2010

ชื่อ-นามสกุล นางสาวเปี่ยมสุขภรณ์ สว่างจินดา **เลขประจำตัว** 5172597723
หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** พฤกษศาสตร์

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวไทยพุทธในบ้านลีนานนท์และชาวไทยมุสลิมในบ้านจุฬาภรณ์พัฒนา 12 ตำบลสุคิริน อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Ethnobotany of Thai Buddhists in Ban Leenanont and Thai Muslims in Ban Chulabhorn Patana 12. tambon Sukirin, Sukirin district, Narathiwat province.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร.สร้อยนภา ญาณวัฒน์

คำนำ

พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน (Ethnobotany) หมายถึง การศึกษาการใช้ประโยชน์ของพืชที่ได้รับการสืบทอดกันมาแต่โบราณ ทั้งที่เป็นอาหาร เครื่องนุ่งห่ม ยารักษาโรค ที่อยู่อาศัย ตลอดจนที่ใช้เป็นสัญลักษณ์ และความเชื่อถือต่างๆ รวมถึงวิธีการจำแนกแบบพื้นบ้าน ตลอดจนขั้นตอนการเตรียม และลู่ทางการใช้พืชนั้น

งานวิจัยด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทยกำลังได้รับความสนใจจากหน่วยงานต่างๆ ทำให้มีการศึกษาด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในหลาย ๆ พื้นที่ของประเทศไทย ทั้งทางภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ เพราะผลการวิจัยจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้และการอนุรักษ์พันธุ์พืชเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

บ้านลีนานนท์ ตั้งอยู่ในหมู่ที่ 6 และบ้านจุฬาภรณ์พัฒนา 12 ตั้งอยู่ในหมู่ที่ 13 ตำบลสุคิริน อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส สองหมู่บ้านนี้มีอาณาเขตเชื่อมต่อกัน และมีสภาพแวดล้อมหมู่บ้านคล้ายคลึงกัน รอบ ๆ หมู่บ้านเป็นป่าสงวนแห่งชาติ คือ "ป่าสิริกิติ์" ชาวบ้านที่อาศัยอยู่ในบ้านลีนานนท์ส่วนใหญ่มีภูมิลำเนาเดิมอยู่ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ทั้งหมดนับถือศาสนาพุทธ ส่วนชาวบ้านที่อาศัยอยู่ในบ้านจุฬาภรณ์พัฒนา 12 ในอดีตเป็นสมาชิกพรรคคอมมิวนิสต์มลายา ส่วนใหญ่นับถือศาสนาอิสลาม ชาวบ้านในทั้งสองหมู่บ้านประกอบอาชีพทำสวนยางพาราและสวนผลไม้ เนื่องจากผู้อาศัยในชุมชนทั้งสองมีความแตกต่างทั้งในด้านพื้นฐานทางสังคม ศาสนา ภาษา และวัฒนธรรม ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาว่ามีการใช้ประโยชน์จากพันธุ์พืชเหมือนกันหรือต่างกันอย่างไร

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวไทยพุทธที่อาศัยอยู่ในบ้านลีนานนท์และชาวไทยมุสลิมที่อาศัยอยู่ในบ้านจุฬาภรณ์พัฒนา 12 ตำบลสุคิริน อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส

วิธีการศึกษา

1. สำรวจ รวบรวมเอกสาร และกำหนดพื้นที่ศึกษาวิจัย

1.1 รวบรวม ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน ทั้งในประเทศและต่างประเทศเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาในพื้นที่ที่กำหนด

1.2 กำหนดพื้นที่ศึกษา บ้านลีนานนท์ หมู่ที่ 6 และบ้านจุฬาภรณ์พัฒนา 12 หมู่ที่ 13 ตำบลสุคิริน อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส สำรวจและรวบรวมข้อมูลสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่ศึกษา

2.เก็บรวมรวมตัวอย่างพันธุ์ไม้และข้อมูลการใช้พันธุ์พืชในชีวิตประจำวันทั้งในด้านรูปธรรมและนามธรรมรวมทั้งวิธีการนำพืชมาใช้ แนวความคิดหรือความเชื่อที่มีต่อพืชชนิดนั้นๆ ของชาวบ้านในบ้านลีนานนท์และบ้านจุฬาภรณ์พัฒนา 12 ด้วยวิธีการดังนี้

2.1 สังเกต สัมภาษณ์ชาวบ้าน หมอยา ผู้นำในการประกอบพิธีกรรม ผู้นำชุมชน ที่มีความรู้เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์พันธุ์พืชในชุมชนอย่างน้อย 2 คนในแต่ละเรื่องเพื่อความแน่นอนว่ามีการใช้พืชดังกล่าวในรูปแบบเดียวกัน

2.2 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์ไม้ร่วมกับคนนำทางที่มีความรู้เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์พันธุ์พืชในบริเวณหมู่บ้าน สวนครัวในบริเวณบ้าน ในสวนและป่าใกล้หมู่บ้านเดือนละ 1 ครั้ง นาน 12 เดือน เพื่อจัดทำตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งสำหรับการอ้างอิง โดยเลือกเก็บตัวอย่างพืชที่มีทั้งใบ ดอกและ/หรือผลในกิ่งเดียวกันซึ่งมีความยาวประมาณ 1 ฟุต จำนวน 3-5 กิ่งตัวอย่างต่อพืชหนึ่งชนิดสำหรับไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้น และเก็บตัวอย่างโดยการขุดทั้งต้นสำหรับไม้ล้มลุกขนาดเล็ก พร้อมทั้งบันทึกภาพ ข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับสภาพแวดล้อมที่พืชขึ้นอยู่ เช่น สภาพดิน ระดับความสูง ซึ่งคาดว่าน่าจะรวบรวมตัวอย่างพันธุ์พืชได้ประมาณ 100 ชนิด

3. วิเคราะห์ข้อมูลพันธุ์พืชในห้องปฏิบัติการ

3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างพันธุ์พืชที่เก็บมาอย่างละเอียดเพื่อใช้ในการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ของพันธุ์พืช

3.2 ตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ของพันธุ์พืชโดยใช้เอกสารทางพฤกษอนุกรมวิธาน รวมทั้งตรวจหาชื่อพ้อง ชื่อพื้นเมืองภาษาไทยและภาษายาวี แล้วนำตัวอย่างพันธุ์พืชไปเทียบเคียงกับตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และที่หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ เพื่อศึกษาการแปรของพืชแต่ละชนิด/สกุล/วงศ์

3.3 จัดทำคำบรรยายลักษณะพันธุ์พืชแต่ละชนิดที่เก็บรวบรวมมา ลักษณะการใช้ประโยชน์พันธุ์พืชแต่ละชนิด ในการใช้เป็นอาหาร สมุนไพร การก่อสร้าง การทำเครื่องมือเครื่องใช้ในครัวเรือนและการประกอบอาชีพ และใช้ในทางพิธีกรรมและความเชื่อ รวมทั้งแนวความคิด ความเชื่อที่ชาวบ้านที่อาศัยอยู่ในทั้งสองชุมชนมีต่อพืช และศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์พันธุ์พืชจากเอกสารต่าง ๆ เช่น หนังสือของโครงการทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Plant Resources of South-East Asia; PROSEA)

4. วิเคราะห์ข้อมูล อภิปราย สรุปผลการวิจัยและเขียนรูปเล่มวิทยานิพนธ์

ผลการศึกษา

1. สำรวจ รวบรวมเอกสาร และกำหนดพื้นที่ศึกษาวิจัย คือ บ้านลีนานนท์และบ้านจุฬาภรณ์พัฒนา 12 ตำบลสุคิริน อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส
2. เก็บรวมรวมตัวอย่างพันธุ์ไม้และข้อมูลการใช้พันธุ์พืช จำนวน 190 ตัวอย่าง

สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษา จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านเพื่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

เกศริน มณีนูน. 2544. พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชนเผ่าซาไกในจังหวัดตรัง พัทลุง และยะลา.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา, บังอร ศรีพานิชกุลชัย, วีระพงศ์ ลุลิตานนท์ และ จรัสพรรณ สงวนเสริมศรี. 2548. การศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านของการใช้สมุนไพรเพื่อปรับภูมิคุ้มกันของร่างกายในจังหวัดอุบลราชธานี. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 10: 31-41.

ชูศรี ไตรสนธิ, ปริทรรศน์ ไตรสนธิ และ ปรัชญา ศรีสง่า. 2537. พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวม้งลาย หมู่บ้านแม่สาใหม่ จังหวัดเชียงใหม่. การประชุมสัมมนาพฤกษศาสตร์ไทยในอนาคต 2537 : 65-83.

ชูศรี ไตรสนธิ. 2539. พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวเขาในภาคเหนือของประเทศไทย. การประชุมวิชาการทางพฤกษศาสตร์ เรื่อง ทรัพยากรพืชของเชิงเขาหิมาลัย. องค์การสวนพฤกษศาสตร์ สำนักนายกรัฐมนตรี : 2-8.

เต็ม สมิตินันทน์ และวีระชัย ณ นคร. 2535. พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน. กรุงเทพฯ : หอพรรณไม้ กรมป่าไม้.

ไทยตำบล ดอท คอม. 2552. ข้อมูลทั่วไป ตำบลสุคิริน อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส. [online]. Available from: http://www.thaitambon.com/Tambon/ttambon.asp?ID=960902 สืบค้นเมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2552.

ไทยตำบล ดอท คอม. 2552. หมู่บ้านจุฬาภรณ์พัฒนา 12 ตำบลสุคิริน อำเภอสุคิริน จังหวัดนราธิวาส. [online]. Available from: http://www.thaitambon.com/Tambon/ttambon.asp?ID=960902&SME=01123161817 สืบค้นเมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2552.

ธวัชชัย สันติสุข. 2550. ป่าของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

ปิยนันนท์ วินิจชัยนันท์. 2538. พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวกะเหรี่ยงในเชียงใหม่ . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พร้อมจิตต์ ศรลัมพ์และวงศ์สถิต ฉั่วสกุล. 2538. สมุนไพรพื้นบ้าน อำเภอคอนสาร จังหวัดชัยภูมิ (1) ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

มานิตย์ ออพานิชกิจ. 2530. การศึกษาพืชผักพื้นเมืองในจังหวัดอุดรธานี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภมร แพ่งกุล. 2544. การใช้ประโยชน์พรรณพืชบริเวณป่าโต๊ะเทพ-ควนหินลับ อำเภอสะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2544. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เล่ม 6 หวาย. กรุงเทพฯ: สหมิตรพริ้นติ้ง.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2546. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 12 (1) พืชสมุนไพรและพืชพิษ เล่ม 1. กรุงเทพฯ: สหมิตรพริ้นติ้ง.

สำนักงานพัฒนาชุมชนอำเภอสุคิริน. 2552. สารสนเทศชุมชนบ้านลีนานนท์ หมู่ที่ 6 ต.สุคิริน อ.สุคิริน จ.นราธิวาส. [online]. Available from:

http://www.cddweb.cdd.go.th/sukhirin/Sukirin/6_Linanon.htm

สืบค้นเมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2552.

อมรรัตน์ บัวคล้าย, สหัช จันทนาอรพินท์ และหร้อหวาน วัชรจิรโสภณ. ความหลากหลายของเทอริโดไฟต์บริเวณบ้านศาลาแม็ง ต.คลองเฉลิม อ.กงหรา จ.พัทลุง. รายงานการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 2. 151-157.

อรทัย เนียมสุวรรณ. 2546. พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวเขาเผ่ากะหร่างในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุบลวรรณ อุโพธิ์. 2548. พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวไทยพุทธ และมุสลิม ในบางพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อุไร จิระมงคลการ. 2544. การศึกษาความหลากหลายและการใช้ประโยชน์ของพรรณพืชบริเวณป่าเต่าดำ จังหวัดกาญจนบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุไร ดำศรี. 2535. พืชผักพื้นเมืองในจังหวัดนครศรีธรรมราช. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Anderson, E.F. 1986a. Ethnobotany of hill tribes of northern Thailand. I. Medicinal plants of Akha. Economic Botany 40: 38-53.

Anderson, E. F. 1986b. Ethnobotany of hill tribes of northern Thailand : II. Lahu medicinal plant. Economic Botany 40: 442-450

Ahmud, F. B. and Holdswooth, D. K. 1995. "Medicinal Plants of Terengganu States Malaysia", International Journal of Pharmacognosy. 33: 259-261.

Bennet, C. B. 1992. Plants and People of the Amazonian Rainforests. BioScience 42: 599-607.

Cotton, C. M. 1996. Ethnobotany: Principles and applications. London: John Wiley and Sons.

Dangol, D. R. and Gurung, S. B. 1991. Ethnobotany of The Tharu Tribe of Chitwan District, Nepal. International J. Pharmacognosy 29: 203-209.

Dargar, H. S. 1988. Plant Folk Medicines among Nicobares Tribals of Car Nicobar Island, India. Economic Botany 43: 215-224.

Esmaeili, S., Naghibi, F., Mosaddegh, M., Sahranavard, S., Ghafari, S., and Addullah, N. R. 2009. Screening of antiplasmodial properties among some traditionally used Iranian planst. Journal of Ethnopharmacology. 121: 400-404.

โครงการ CEB_M_57_2010

CEB_M_57_2010

ชื่อ-นามสกุล นางสาวอัญชลี น่วมมี **เลขประจำตัว** 5272627023
หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** พฤกษศาสตร์

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวม้ง บ้านปางช้าง ตำบลพงษ์ อำเภอสันติสุข จังหวัดน่าน

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Ethnobotany of Hmong in Ban Pangchang, Tambon Pong, Amphoe Santisuk, Changwat Nan

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. สร้อยนภา ญาณวัฒน์

คำนำ

พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน (Ethnobotany) หมายถึง การศึกษาการใช้ประโยชน์จากพืชที่ได้รับการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษตั้งแต่โบราณ จนเป็นเอกลักษณ์ประจำท้องถิ่น ทั้งที่ใช้เป็นอาหาร เครื่องนุ่งห่ม ยารักษาโรค ที่อยู่อาศัย ตลอดจนใช้เป็นสัญลักษณ์ และความเชื่อต่าง ๆ รวมทั้งการจำแนกแบบพื้นบ้าน ตลอดจนขั้นตอนการเตรียม และลู่ทางการใช้พืชนั้น ๆ

ในปัจจุบันความเจริญทางเทคโนโลยีที่มีมากขึ้น ทำให้วัฒนธรรม ขนบธรรมเนียมต่าง ๆ ได้มีการเปลี่ยนแปลงไป วิถีชีวิตที่พึ่งพิงธรรมชาติเริ่มเลือนหายไป และการอพยพสู่ชุมชนเมืองของประชากรรุ่นใหม่ ทำให้ขาดการสืบทอดภูมิปัญญาพื้นบ้านไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการเก็บรวบรวมข้อมูลเหล่านี้เอาไว้ โดยแหล่งข้อมูลสามารถสืบหาได้จากกลุ่มชนเผ่าต่าง ๆ ที่ยังมีวิถีชีวิตผูกพันอยู่กับป่า

พื้นที่จังหวัดน่านมีพื้นที่ป่าที่เป็นต้นน้ำที่สำคัญของแม่น้ำน่าน อีกทั้งยังมีความหลากหลายของชนหลายกลุ่ม ซึ่งมีวัฒนธรรมและวิถีชีวิตดั้งเดิมที่มีเอกลักษณ์ของแต่ละชนเผ่า ชุมชนชาวม้งขาว หมู่ที่ 12 บ้านปางช้าง ตำบลพงษ์ อำเภอสันติสุข จังหวัดน่าน อยู่ในพื้นที่โครงการพัฒนาเพื่อความมั่นคงพื้นที่ลุ่มน้ำน่านอันเนื่องมาจากพระราชดำริ พื้นที่ที่ 7 และชาวม้งขาวส่วนใหญ่ยังคงมีวิถีชีวิตที่ต้องพึ่งพาอยู่กับปัจจัยพื้นฐานที่ได้มาจากธรรมชาติ สภาพทางสังคมยังไม่มีการพัฒนารูปแบบไปเป็นสังคมเมืองมากนัก รวมทั้งพื้นที่บริเวณนี้เป็นพื้นที่ป่าที่เคยถูกทำลายมาก่อน แต่กำลังได้รับการฟื้นฟูพื้นที่ป่ากลับมาอีกครั้งพร้อมกับการพัฒนาจากภายนอกที่เริ่มมีมากขึ้น อาจส่งผลให้สภาพแวดล้อมและสภาพสังคมรูปแบบเดิมนั้นเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นควรมีการศึกษาและรวบรวมภูมิปัญญาของชาวม้งขาวแห่งนี้ โดยเฉพาะด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านเอาไว้ อันจะเป็นประโยชน์ในด้านวิชาการ เศรษฐกิจ และการจัดการทรัพยากรธรรมชาติ รวมทั้งเป็นการอนุรักษ์ไว้ซึ่งวัฒนธรรมและเอกลักษณ์ของชาวม้งต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวม้ง บ้านปางช้าง ตำบลพงษ์ อำเภอสันติสุข จังหวัดน่าน

วิธีการศึกษา

1. สำรวจ รวบรวมเอกสาร และกำหนดพื้นที่ศึกษา
    1.1 รวบรวม ศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาในพื้นที่ที่กำหนด
    1.2 กำหนดพื้นที่ศึกษา หมู่บ้านชาวมังขาว หมู่ที่ 12 บ้านปางช้าง ตำบลพงษ์ อำเภอสันติสุข จังหวัดน่าน และรวบรวมข้อมูลสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่ศึกษา
2. เก็บตัวอย่างพันธุ์พืชและข้อมูลการใช้พืชของชาวมังในวิถีชีวิตประจำวัน ทั้งในด้านรูปธรรมและนามธรรม วิธีการนำพืชมาใช้ และส่วนของพืชที่นำมาใช้ประโยชน์ รวมทั้งแนวความคิดหรือความเชื่อที่มีต่อพืชชนิดนั้น ๆ โดยมีวิธีการโดยสังเขป คือ
    2.1. สัมภาษณ์หมอยา ผู้นำในการประกอบพิธีกรรม ผู้นำหมู่บ้าน คนเก่าแก่ อย่างน้อย 2 คน ในการใช้ประโยชน์จากพืชแต่ละชนิด รวมถึงใช้การสังเกตจากคน ในหมู่บ้าน
    2.2. สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์ไม้ รวมถึงบันทึกข้อมูลการใช้ประโยชน์จากพืช เช่น ลักษณะการใช้ประโยชน์ โดยจำแนกออกเป็น ใช้เป็นอาหาร สมุนไพร เครื่องนุ่งห่ม การทำเครื่องมือเครื่องใช้ในครัวเรือน หรือใช้ในทางพิธีกรรมและความเชื่อ รวมทั้งระบุถึงส่วนของพืชและขั้นตอนวิธีการเตรียมเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ ในบริเวณพื้นที่ศึกษาเดือนละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 12 เดือน ซึ่งคาดว่าน่าจะรวบรวมตัวอย่างพันธุ์พืชได้ประมาณ 100 ชนิด
    2.3. นำตัวอย่างพันธุ์พืชที่เก็บรวบรวมมา นำมาจัดทำเป็นตัวอย่างพันธุ์ไม้รักษาสภาพ เก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
    เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิง
3. วิเคราะห์ข้อมูลพันธุ์พืชในห้องปฏิบัติการ
    3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์พืชที่เก็บตัวอย่างมาอย่างละเอียด เพื่อใช้ในการตรวจหาชื่อ วิทยาศาสตร์ รวมทั้งตรวจหาชื่อพ้องและชื่อพื้นเมืองของพืชแต่ละชนิดจากเอกสารต่าง ๆ เช่น Flora of Thailand, Flora of China, Malay Peninsula และ Flora of Malesiana เป็นต้น
    3.2 จัดทำคำบรรยายลักษณะพันธุ์พืชแต่ละชนิดโดยสังเขป และการใช้ประโยชน์จากพืชแต่ละชนิด เช่น การใช้เป็นอาหาร สมุนไพร เครื่องนุ่งห่ม การทำเครื่องมือเครื่องใช้ในครัวเรือน หรือใช้ในทางพิธีกรรมและความเชื่อ รวมทั้งแนวความคิด ความเชื่อที่ชาวมังมีต่อพืช และเปรียบเทียบข้อมูลเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์พันธุ์พืชจากเอกสารต่าง ๆ เช่น หนังสือของโครงการทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Plant Resources of South-East Asia; PROSEA) และเอกสารที่เกี่ยวกับการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในบริเวณใกล้เคียง
4. อภิปราย สรุปผลการศึกษาและเขียนรูปเล่มวิทยานิพนธ์

ผลการศึกษา

ตารางที่ 1 ผลการดำเนินการศึกษา

แผนการดำเนินการศึกษา	ผลการศึกษา
1. สำรวจ รวบรวมเอกสาร และกำหนดพื้นที่ศึกษา	1. กำหนดพื้นที่ศึกษา คือ หมู่บ้านขาวม้งขาว หมู่ที่ 12 บ้านปางช้าง ตำบลพงษ์ อำเภอสันติสุข จังหวัดน่านและได้รวบรวมข้อมูลสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่ศึกษา
2. เก็บตัวอย่างพันธุ์พืชและข้อมูลการใช้พืชของชาวม้งในวิถีชีวิตประจำวัน	2. เก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์พืชได้ทั้งหมด 150 หมายเลข และรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับประเพณีวัฒนธรรมในการดำเนินชีวิตของชาวม้ง
3. วิเคราะห์ข้อมูลพันธุ์พืชในห้องปฏิบัติการ	3. ทำการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชที่ชาวม้งได้มีการใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันได้ทั้งหมด 50 ชนิด 48 สกุล 29 วงศ์ โดยเป็นพืชดอก 47 ชนิด 45 สกุล 26 วงศ์ และเฟิร์น 3 ชนิด 3 สกุล 3 วงศ์ (ดังตารางที่ 2)
4. อภิปราย สรุปผลการศึกษาและเขียนรูปเล่มวิทยานิพนธ์	สามารถสรุปผลได้ในเบื้องต้น แต่ยังต้องรอผลการศึกษาอีก

ตารางที่ 2 ชนิดพืชที่ชาวม้งนำมาใช้ประโยชน์ในวิถีชีวิตประจำวัน

Family	Species
พืชดอก 47 ชนิด	
1. Amaranthaceae	1. *Achyranthes aspera* Linn.
Amaranthaceae	2. *Amaranthus spinosus* Linn.
2. Anacardiaceae	3. *Spondias lakonensis* Pierre
3. Annonaceae	4. *Goniothalamus laoticus* (Finet & Gagnep.) Ban.
4. Apocynaceae	5. *Amalocalyx microlobus* Pierre ex Spire
Apocynaceae	6. *Tabernaemontana bovina* Lour.
5. Averrhoaceae	7. *Averrhoa carambola* L.
6. Bignoniaceae	8. *Fernandoa adenophylla* (Wall. ex G. Don) Steenis
7. Cucurbitaceae	9. *Coccinia grandis* (L.) Voigt
Cucurbitaceae	10. *Momordica charantia* L.
Cucurbitaceae	11. *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino
Cucurbitaceae	12. *Cucurbita moschata* Duchesne

8. Euphorbiaceae	13. *Phyllanthus emblica* Linn.
Euphorbiaceae	14. *Excoecaria cochinchinensis* Lour.
Euphorbiaceae	15. *Mallotus barbatus* Mull.Arg.
Euphorbiaceae	16. *Homonoia riparia* Lour.
Euphorbiaceae	17. *Jatropha curcas* L.
Euphorbiaceae	18. *Jatropha gossypiifolia* L.
9. Fabaceae (Caesalpinioideae)	19. *Cassia fistula* L.
Fabaceae (Caesalpinioideae)	20. *Tamarindus indica* L.
Fabaceae (Caesalpinioideae)	21. *Caesalpinia hymenocarpa* (Prain) Hattink
Fabaceae (Mimosoideae)	22. *Mimosa pudica* L.
Fabaceae (Mimosoideae)	23. *Albizia odoratissima* (L. f.) Benth.
Fabaceae (Mimosoideae)	24. *Acacia concinna* (Willd) DC.
Fabaceae (Papilionoideae)	25. *Pterocarpus macrocarpus* Kurz
10. Iridaceae	26. *Eleutherine palmifolia* (L) Merr.
11. Marantaceae	27. *Phrynium pubinerve* Blume
Marantaceae	28. *Stachyphrynium placentarium* (Lour.) Clausager & Borchs.
12. Menispermaceae	29. *Tinospora crispa* (L.) Hook.f. & Thoms.
13. Moraceae	30. *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent
14. Myrtaceae	31. *Psidium guajava* L.
15. Orchidaceae	32. *Dendrobium fimbriatum* Hook.
16. Passifloraceae	33. *Passiflora foetida* L.
Passifloraceae	34. *Passiflora laurifolia* L.
17. Plantaginaceae	35. *Plantago major* L.
18. Portulacaceae	36. *Talium triangulare* (Jacq.) Willd.
19. Rosaceae	37. *Rubus alceifolius* L.
20. Rubiaceae	38. *Gardenia sootepensis* Hutch.
21. Saururaceae	39. *Houttuynia cordata* Thunb.
22. Taccaceae	40. *Tacca chantrieri* Andre
23. Tiliaceae	41. *Microcos paniculata* L.
24. Ulmaceae	42. *Trema orientalis* (L.) Blume.
25. Zingiberaceae	43. *Etlingera metriocheilos* (Griff.) R.M. Sm.
Zingiberaceae	44. *Amomum maximum* Roxburgh
Zingiberaceae	45. *Kaempferia parviflora* Wall. ex Bak.
Zingiberaceae	46. *Alpinia zurumbet* (Persoon) B. L. Burtt & R. M. Smith
Zingiberaceae	47. *Kaempferia galanga* L. var. *galanga*

เฟิร์น 3 ชนิด	
27. Athyriaceae	48. *Diplazium esculentum* (Retz.) Sw.
28. Marattiaceae	49. *Angiopteris evecta* G. (foest). Hoffm.
29. Ophioglossaceae	50. *Ophioglossum petiolatum* Hook.

สรุปผลและวิจารณ์

ผลการศึกษาจนถึงปัจจุบัน พบว่า ตัวอย่างพันธุ์ไม้ที่ชาวม้งมีการใช้ประโยชน์ที่ผู้วิจัยสามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้ที่ 50 ชนิด 48 สกุล 29 วงศ์ โดยเป็นพืชดอก 47 ชนิด 45 สกุล 26 วงศ์ และเฟิร์น 3 ชนิด 3 สกุล 3 วงศ์ สำหรับการใช้ประโยชน์จากพืชทั้ง 50 ชนิดนี้ พบว่า ใช้เป็น (ก) พืชอาหาร 22 ชนิด (ข) พืชสมุนไพร 30 ชนิด (ค) พืชที่ใช้ทำที่อยู่อาศัยและเครื่องใช้ 2 ชนิด (ง) พืชที่ใช้ในพิธีกรรมความเชื่อต่าง ๆ 1 ชนิด และ (จ) พืชใช้ประโยชน์อื่น ๆ 4 ชนิด อย่างไรก็ตาม ยังมีตัวอย่างพืชจำนวนหนึ่งที่ยังไม่ได้ตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ แต่โดยรวมแล้วคาดว่าน่าจะมีพืชไม่น้อยกว่า 100 ชนิดที่ชาวม้งในหมู่บ้านปางข้างรู้จักนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งยังถือว่าค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับจำนวนชนิดพืชที่ชาวม้งที่ตั้งรกรากในพื้นที่อื่นและชาวเขาเผ่าอื่น ๆ ในจังหวัดน่าน ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากหมู่บ้านปางข้างมีฐานทรัพยากรธรรมชาติต่ำอันน่าจะเป็นผลมาจากการแผ้วถางป่าไม้เดิมเพื่อทำการเกษตรเชิงเดี่ยว จึงทำให้มีความหลากหลายของพืชน้อย อีกสาเหตุหนึ่งคือ ชาวม้งเหล่านี้เพิ่งย้ายถิ่นฐานมาตั้งรกรากในพื้นที่บ้านปางข้างได้ไม่นาน จึงรู้จักพืชที่จะนำมาใช้ประโยชน์น้อย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์และเผยแพร่ภูมิปัญญาพื้นบ้านของชาวม้งในประเทศไทย
2. เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาด้านความหลากหลายของพันธุ์พืชและเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์พืชต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ชูศรี ไตรสนธิ. 2539. พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวเขาในภาคเหนือของประเทศไทย. การประชุมวิชาการทางพฤกษศาสตร์ เรื่อง ทรัพยากรพืชของเชิงเขาหิมาลัย. องค์การสวนพฤกษศาสตร์ สำนักนายกรัฐมนตรี : 2-8.

เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. บริษัทประชาชน จำกัด. กรุงเทพฯ.

Santisuk, T. and Larsen, K. 1996. Flora of Thailand. Vol. VI part II. Diamond Printing Co. Ltd. Bangkok.

Santisuk, T. and Larsen, K. 1996. Flora of Thailand. Vol. VII part I. Diamond Printing Co. Ltd. Bangkok.

Santisuk, T. and Larsen, K. 1996. Flora of Thailand. Vol. VII part I. Diamond Printing Co. Ltd. Bangkok.

Santisuk, T. and Larsen, K. 2001. Flora of Thailand. Vol. VII part III. Prachachon Co.Ltd. Bangkok.

Santisuk, T. and Larsen, K. 2005. Flora of Thailand. Vol. VIII part I. Prachachon Co.Ltd. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1970. Flora of Thailand. Vol. II part I. ASRCT Press. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1972. Flora of Thailand. Vol. II part II. ASRCT Press. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1984. Flora of Thailand. Vol. IV part I. TISTR Press. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1985. Flora of Thailand. Vol. IV part II. TISTR Press. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1987. Flora of Thailand. Vol. V part I. Chutima Press. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1988. Flora of Thailand. Vol. III part III. Chutima Press. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1989. Flora of Thailand. Vol. III part IV. Chutima Press. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1990. Flora of Thailand. Vol. V part II. Chutima Press. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1992. Flora of Thailand. Vol. V part IV. Chutima Press. Bangkok.

Smitinad, T. and Larsen, K. 1993. Flora of Thailand. Vol. VI part I. Rumthai Press Co.Ltd. Bangkok.

โครงการ CEB_D_17_2009

CEB_D_17_2009

ชื่อ-นามสกุล นางสาวชุตาภา คุณสุข **เลขประจำตัว** 5073819123
หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

การประเมินกลุ่มประชากร และรูปแบบการเคลื่อนย้ายของประชากรปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) เพื่อการจัดการที่ยั่งยืน กรณีศึกษา ณ อ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Assessment of stock and movement pattern of blue swimming crab *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) for sustainable management: Case study in Kung Krabaen Bay, Chanthaburi Province

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนา คชเสนี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์

คำนำ

ปูม้า *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) เป็นทรัพยากรสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทั้งต่อการบริโภคภายในประเทศ และเพื่อการส่งออก ซึ่งในปัจจุบันได้เกิดวิกฤติการณ์จากการทำประมงมากเกินกำลังผลิต และในขณะเดียวกันก็มีการบุกรุกทำลายแหล่งที่อยู่อาศัย และแหล่งอนุบาลตัวอ่อนของปูม้า โดยจากข้อมูลสถิติของกรมประมงในปี พ.ศ. 2533 มีทรัพยากรปูม้าที่จับได้ 40,000 ตันต่อปี แต่ในปี พ.ศ. 2550 ทรัพยากรปูม้าลดลงเหลือเพียง 20,000 ตันต่อปีเท่านั้น โดยอ่าวคุ้งกระเบนซึ่งเป็นหนึ่งในแหล่งอนุบาลปูม้าวัยอ่อนที่สำคัญของประเทศนั้นก็ประสบกับวิกฤติการณ์ดังกล่าวเช่นเดียวกัน อีกทั้งยังเกิดความขัดแย้งในการใช้ทรัพยากรปูม้านี้ระหว่างชาวประมงลอบแบบพับ และชาวประมงอวนจมปู เพราะแต่ละฝ่ายต่างคิดว่าอีกฝ่ายนั้นทำการประมงที่มากเกินกำลังผลิต นอกจากนี้ องค์การบริหารปกครองส่วนท้องถิ่นก็ไม่มีนโยบายในการแก้ไขปัญหาความขัดแย้งนี้ ส่วนในการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์นั้นก็มีการศึกษาเกี่ยวกับการประเมินสต๊อกของประชากร โครงสร้างของประชากร รูปแบบการอพยพเคลื่อนย้ายค่อนข้างน้อย เนื่องจากเป็นการศึกษาที่ใช้ทุนสูง และยากต่อการเก็บผลการศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเครื่องหมายปู ที่ต้องเสี่ยงต่อการที่เครื่องหมายหลุด และเครื่องหมายไปมีผลขัดขวางการดำรงชีพของตัวปู จึงทำให้มีงานทางด้านนี้น้อยมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะค้นหาและแก้ไขปัญหาความขัดแย้งที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีการทางวิทยาศาสตร์ เพื่อพิสูจน์ และสร้างความเข้าใจที่ถูกต้องระหว่างผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย

วัตถุประสงค์

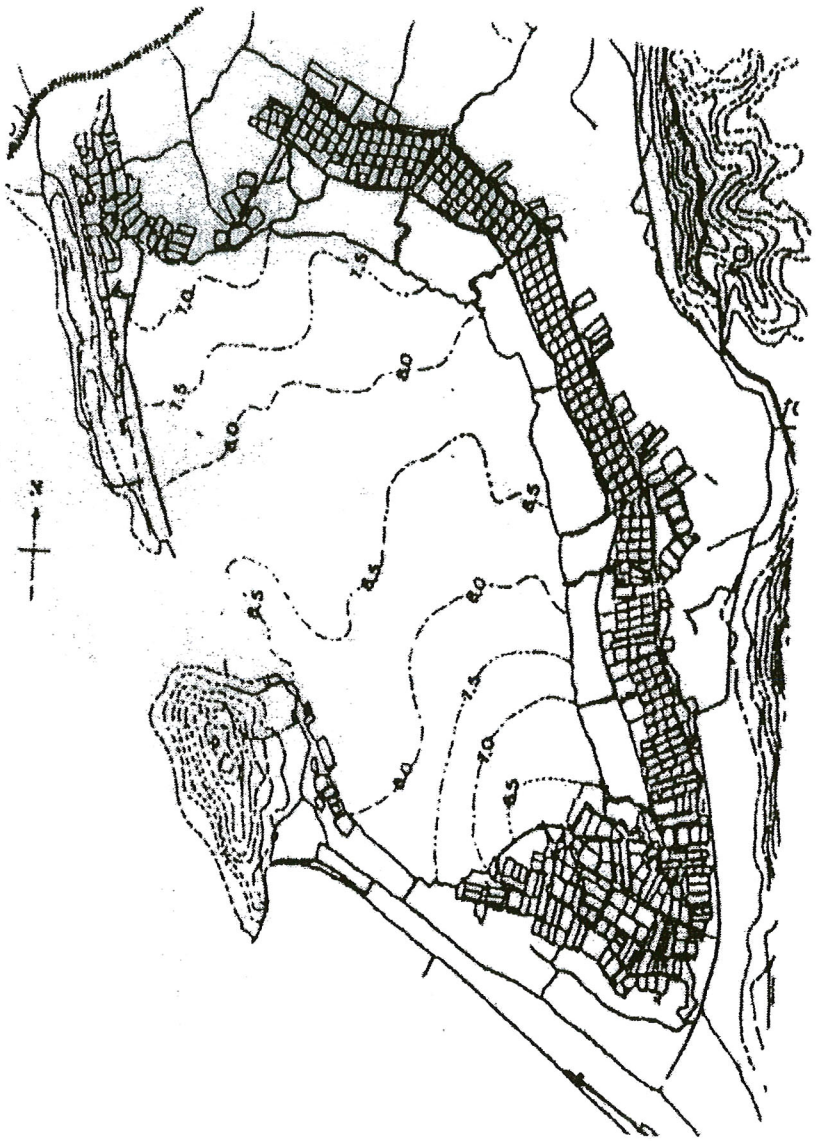
1. ประเมินกลุ่มประชากรปูม้า ปัจจัยทางนิเวศวิทยา และลักษณะทางสังคม-เศรษฐกิจที่มีผลกระทบต่อประชากรปูม้า ในบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี
2. ศึกษาการแบบรูปการอพยพ เส้นทางการอพยพ และแหล่งวางไข่ของประชากรปูม้า
3. วิเคราะห์สถานการณ์การทำประมงปูม้าในปัจจุบัน และนำเสนอแนวทางการจัดการทรัพยากรปูม้าอย่างยั่งยืน

วิธีการศึกษา

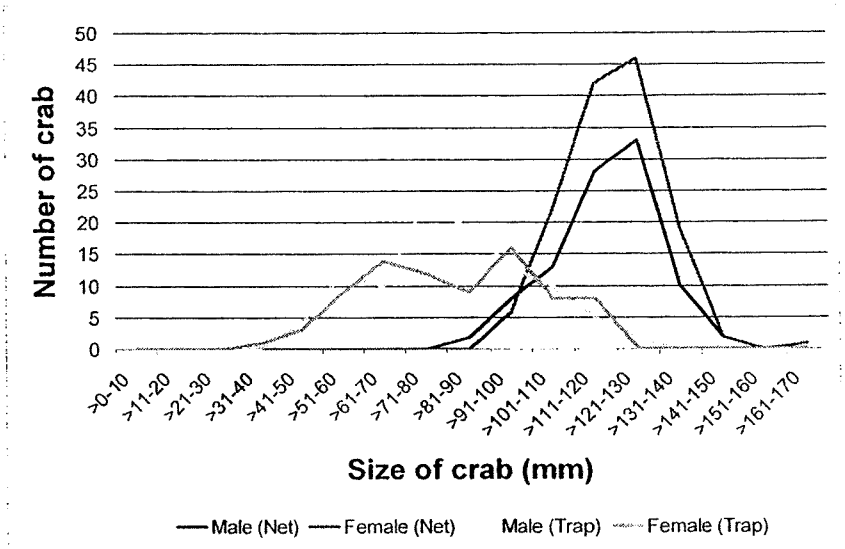
1. สำรวจค้นคว้าเอกสารทั้งภายใน และต่างประเทศ เอกสารที่เกี่ยวข้อง ข้อมูลทุติยภูมิ สำรวจภาคสนาม เพื่อหาข้อมูล
2. เก็บตัวอย่างปูม้าโดยใช้ลอบในอ่าว และอวนจมปูม้านอกบริเวณอ่าว รวมไปถึงสัตว์น้ำพลอยได้ในภาคสนาม โดยใช้ลอบปูม้าแบบพับได้ ขนาดตา 1.7 cm. จำนวน 45 ลูก 15 สถานี ซึ่งวางไว้ 24 ชั่วโมง ในอ่าวคุ้งกระเบน และอวนจมปูม้าขนาดตา 10 cm. 14 สถานี ความยาวแต่ละสถานี 200 เมตร ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2552 จากนั้นทำการวิเคราะห์
   - ความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างกระดองและน้ำหนักของประชากรปูม้า - อัตราส่วนเพศ
   - การกระจายของประชากรปูม้าในแต่ละสถานี
3. วิเคราะห์ข้อมูลจากการเก็บตัวอย่าง และจำแนกชนิดของสัตว์น้ำพลอยได้
4. การทดสอบประสิทธิภาพเครื่องหมาย (อยู่ในระหว่างการทดลอง)
5. การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมด และเขียนวิทยานิพนธ์

ผลการศึกษา

1. พบว่าลักษณะของพื้นทะเลในบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน เป็นดังนี้ บริเวณ 1,000เมตรจากชายฝั่ง มีปริมาณทรายเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 89.64% และบริเวณ 500 เมตรจากชายฝั่งมีปริมาณทรายรองลงมา เท่ากับ 80.93% ส่วนปริมาณทรายแป้ง (silt) พบว่าบริเวณคลองส่งน้ำมีปริมาณทรายแป้งมากที่สุด รองลงมาคือ บริเวณชายฝั่งที่ 500 และ 1,000 เมตรจากชายฝั่ง ตามลำดับ และปริมาณดินเหนียว (clay) มีการกระจายปริมาณในแต่ละบริเวณเช่นเดียวกับปริมาณทรายแป้ง โดยสรุปก็คือ องค์ประกอบส่วนใหญ่ของเนื้อดินในบริเวณอ่าวจะมีทรายเป็นองค์ประกอบหลัก โดยจะพบว่าทรายจะมีมากบริเวณกลางอ่าว (1,000 เมตร จากชายฝั่ง) ประมาณ 89.64% และค่อยๆ ลดลงมาจนถึงคลองส่งน้ำที่มีปริมาณทรายเท่ากับ 61.43% โดยปริมาณทรายได้รับอิทธิพลมาจากทรายที่มากับคลื่นลมภายนอก และจากการศึกษาของกองสมุทรศาสตร์ (2536) พบว่าบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทยตะกอนพื้นผิวเป็นพวก sandy clay ซึ่งมีทรายเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งถูกพัดพาเข้ามาบริเวณอ่าวคุ้งกระเบนในช่วงมรสุมตะวันตกของทุกปีในช่วงเดือนพฤษภาคม-กันยายน (ประสาท และคณะ, 2526) ส่วนค่าความเป็นกรดด่าง พบว่าที่บริเวณ 500 เมตร และ 1,000 เมตรจากชายฝั่ง มีค่าความเป็นกรดด่างสูงที่สุด ค่าเฉลี่ยที่ชายฝั่งมีค่า 7.56±0.77 ที่ระยะ 500 เมตรจากชายฝั่ง มีค่า 8.28±0.28 และที่ 1,000 เมตรจากชายฝั่ง มีค่า 8.48±0.09 ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงแนว Contour ของ pH ในดินพื้นอ่าวคุ้งกระเบน



รูปที่ 4 แสดงการกระจายความกว้างของกระดองปูม้า

- <u>การกระจายของประชากรปูม้าในแต่ละสถานี</u> จากการเก็บตัวอย่างประชากรปูม้า ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2552 โดยเครื่องมือประมง 2 ชนิด เวลา 24 ชั่วโมงเท่ากัน พบว่าตัวอย่างประชากรปูม้าที่ได้มีปริมาณที่แตกต่างกัน โดยปูม้าที่เก็บได้โดยลอบปูแบบพับได้นั้น พบปูม้าปริมาณน้อย และมีขนาดค่อนข้างเล็กมาก เมื่อทำการเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2548 พบว่าปริมาณของปูม้าลดลงเป็นอย่างมาก (เทียบกับช่วงเวลา และจำนวนของเครื่องมือประมงที่เท่ากัน) ในขณะที่การเก็บตัวอย่างประชากรปูม้าโดยใช้อวนนั้น พบว่าได้ตัวอย่างประชากรปูม้ามากกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับอวนจมปูม้าที่จับได้โดยชาวบ้าน พบว่ามีปริมาณน้อยกว่ามาก แต่ก็เป็นไปตามแนวโน้มเดียวกับชาวบ้าน โดยพบความสัมพันธ์ตามการรายงานของจินตนา จินดาลิขิตและคณะ (2545) ที่พบว่าประชากรปูม้าขนาดใหญ่นอกอ่าวจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเก็บตัวอย่างห่างออกจากชายฝั่งไปตั้งแต่ 3-10 กิโลเมตร

3. จากการศึกษาชนิดและปริมาณสัตว์น้ำพลอยได้ โดยออกเก็บตัวอย่างจากการทำประมงอวนจมปูม้า และลอบปูแบบพับได้ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2552 พบว่าในการทำประมงโดยใช้ลอบปูแบบพับได้นั้น พบสัตว์น้ำเป้าหมาย คือ ปูม้า *Portunus pelagicus* 3.94% และประกอบไปด้วยสัตว์น้ำพลอยได้ทั้งหมด 40 ชนิด ใน 24 ครอบครัว **ดังตารางที่ 1** ส่วนการทำประมงโดยใช้อวนจมปูม้าพบปูม้าเป้าหมาย 29.59% และประกอบไปด้วยสัตว์น้ำพลอยได้ทั้งหมด 36 ชนิด ทั้งหมด 32 ครอบครัว **ดังตารางที่ 2** ทั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสัตว์น้ำพลอยได้ที่สำรวจในแต่ละเดือน โดยใช้ค่า Species occurrence index (S_{occ}) พบว่าในการทำประมงปูม้าด้วยลอบนั้น มีองค์ประกอบของสัตว์น้ำชนิดที่หายาก (Rare species) ถึง 60.5% สัตว์น้ำที่ไม่ค่อยพบโดยทั่วไป Uncommon species) 10.07% และสัตว์น้ำที่พบได้โดยทั่วไป 29.43% ส่วนสัตว์น้ำที่พบได้ทั่วไปค่อนข้างมากนั้นไม่พบ (Very common species) ส่วนการทำประมงอวนจมปูม้านั้น พบว่ามีองค์ประกอบของสัตว์น้ำชนิดที่หายาก (Rare species) 59.73% สัตว์น้ำที่ไม่ค่อยพบโดยทั่วไป Uncommon species)

10.68% และสัตว์น้ำที่พบได้โดยทั่วไป 29.59% ส่วนสัตว์น้ำที่พบได้ทั่วไปค่อนข้างมากนั้นไม่พบ (Very common species) เช่นกัน

สรุปผลและวิจารณ์

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเพศผู้และเพศเมียมีความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างกระดอง และน้ำหนักของปูม้า ดังนี้ เพศผู้: $W = 0.00006CW^{3.0327}$ (รูปที่ 1) เพศเมีย: $W= 0.00007CW^{2.9978}$ อัตราส่วนเพศ ระหว่างเพศผู้และเพศเมียมีค่า 1: 1.13 ขนาดของปูม้ามีขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บตัวอย่างห่างจากชายฝั่งออกไป 3—15 กิโลเมตร ปูม้าที่เก็บได้จากลอบมีขนาดเฉลี่ยค่อนข้างเล็ก ส่วนปูม้าที่เก็บได้จากอวนนั้นมีขนาดใหญ่ การกระจายของประชากรปูม้าจากการเก็บตัวอย่างพบว่าปูม้าในบริเวณนอกอ่าว ในบริเวณแนวปะการัง พบความหนาแน่นของประชากรปูม้ามากกว่าในบริเวณอ่าว ซึ่งเป็นแหล่งอนุบาลปูม้าที่สำคัญตั้งแต่อดีต แต่เนื่องจากผลกระทบของการประมงทำให้ปูม้าบริเวณในอ่าวมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด จากในอดีต ทำให้ปูม้าจำนวนมากเมีการเคลื่อนย้ายแหล่งอาศัยหากินออกไปนอกชายฝั่งมากขึ้น การจับปูม้าโดยชาวประมงลอบปู และอวนจมปูม้า ไม่เพียงแต่มีผลกระทบโดยตรงต่อประชากรปูม้าที่มีจำนวนลดลงแล้ว ยังมีผลกระทบโดยอ้อมกับสัตว์น้ำพลอยได้หลายชนิดที่เคยอุดมสมบูรณ์ในบริเวณนี้ สัตว์น้ำหลายชนิดต้องถูกจับออกระบบนิเวศไป โดยไม่ได้ใช้ประโยชน์เป็นจำนวนมาก ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบสัตว์น้ำพลอยได้จากลอบปู ทั้งหมด 40 ชนิด ใน 24 ครอบครัว ส่วนการทำประมงโดยใช้อวนจมปูม้า พบสัตว์น้ำพลอยได้ ทั้งหมด 36 ชนิด ทั้งหมด 32 ครอบครัว โดยผลการศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งที่สำคัญต่อการจัดการทรัพยากรปูม้า และสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ในระบบนิเวศนี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เข้าใจสถานการณ์ของทรัพยากรชนิดนี้ และสามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปวางแผนเพื่อการจัดการใช้ทรัพยากรชนิดนี้อย่างยั่งยืนในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Kumar, M. 1997. Proceedings of the First National Workshop on blue swimmer crab *Portunus pelagicus*. SARDI Research Report Series 16. 129 pp.

Department of Fishery, Ministry of Agriculture and Cooperatives. 2007. Fishing community production survey in 2007. Technical paper No. 2/2007.

โครงการ CEB_D_18_2009

ชื่อ-นามสกุล นายบุญลือ คะเชนทร์ชาติ **เลขประจำตัว** 5073907723
หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตรชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

การปลดปล่อยไนตรัสออกไซด์จากการใช้ที่ดินแบบต่างๆ ในระบบนิเวศริมน้ำ กรณีศึกษา ลุ่มน้ำน่าน จังหวัดน่าน ภาคเหนือของประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Nitrous oxide emission from different land use in riparian ecosystem: a case study of in Nan river basin, Nan province, Northern Thailand.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนา คชเสนี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม Prof. Dr. Gareth Edwards-Jones

คำนำ

ก๊าซไนตรัสออกไซด์จากกิจกรรมของมนุษย์ ถูกปลดปล่อยออกสู่ชั้นบรรยากาศคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 7.9 ต่อปี เมื่อเปรียบเทียบกับ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และมีเทน กระบวนการที่ก่อให้เกิดก๊าซไนตรัสออกไซด์ ได้แก่ กระบวนการ Biological denitrification และ nitrification ระบบนิเวศริมน้ำอาจเป็นแห่งปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ที่สำคัญ ด้วยเหตุผล 3 ประการ คือ 1) ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดกระบวนการ denitrification และ nitrification ในระบบนิเวศริมน้ำ ที่ก่อให้เกิดสภาพที่มีไม่มีอากาศด้วยมีน้ำท่วมหลากและมีความชื้นสูง และมีการพัดพาอินทรีย์วัตถุมาทับถม ส่งผลห้อินทรีย์สารคาร์บอน (Organic Carbon) ไม่ใช่ปัจจัยจำกัดในระบบนิเวศริมน้ำ 2) การเปลี่ยนแปลงการใช้ที่ดิน จากสังคมพืชยืนต้นเป็นการปลูกพืชเชิงเดี่ยว และมีการใช้ปุ๋ยเคมี ซึ่งคาดว่ามี Inorganic nitrogen สะสมอยู่ในดินในปริมาณสูง และ 3) การชะล้างและการไหลของน้ำใต้ดินระดับตื้น จากตอนบนสู่ริมน้ำ จะเป็นเพิ่มปริมาณ Organic Carbon และ Inorganic nitrogen ในระบบนิเวศริมน้ำมากยิ่งขึ้น ปัจจัยดังกล่าวเป็นตัวเร่งกระบวนการ denitrification และ nitrification และผันแปรต่ออัตราการปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ด้วย

เป็นระบบนิเวศริมน้ำ ในพื้นที่ลุ่มน้ำสา จังหวัดน่าน การใช้ที่ดินส่วนใหญ่เป็นพื้นที่การเกษตรปลูกข้าวโพดและใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนในอัตราที่สูง ซึ่งคาดว่าจะเป็นแหล่งปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ ดังนั้นเป้าหมายของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อตรวจวัดปริมาณการปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ และศึกษากลไกและสภาพแวดล้อมที่เป็นสาเหตุการปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ออกสู่ชั้นบรรยากาศจากดินในระบบนิเวศริมน้ำ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจวัดการปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ จากการใช้ที่ดินต่างชนิด ในระบบนิเวศริมน้ำ
2. เพื่อศึกษากลไกการปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ จากกระบวนการ denitrification
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์

วิธีการศึกษา

1. การกำหนดพื้นที่ศึกษา

พื้นที่ศึกษากำหนดจาก การใช้ที่ดิน 3 ประเภท ได้แก่ พื้นที่ปลูกข้าวโพด, ป่าปลูกจามจุรี (*Samanea saman)* และพื้นที่ผสมระหว่าง พื้นที่ปลูกข้าวโพดและป่าปลูกจามจุรี ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 พื้นที่ศึกษา

Treatment	Lowland area (Riparian)	Upland area
C1	*Samanea saman*	*Samanea saman*
T1	*Samanea saman*	Corn field
C2	Corn field	Corn field

หมายเหตุ: Treatment ละ 3 ซ้ำ

2. การตรวจวัดอัตราปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ (Nitrous oxide emission rate)

ใช้ Closed chamber method จำนวน 5 ชุด ต่อ Treatment รวม 45 ชุด เพื่อเก็บตัวอย่างอากาศ ทุกๆ 0,10,20, และ 30 นาที ทำการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไนตรัสออกไซด์ ด้วยเครื่อง Gas Chromatography อัตราปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ คำนวณจากการอัตราเปลี่ยนแปลง (Slope) ของปริมาณก๊าซไนตรัสออกไซด์ต่อเวลา (dG/dt) โดยใช้สมการเส้นตรง

3. การศึกษาการผลิตก๊าซไนตรัสออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการ Denitrificaiton

เก็บตัวอย่าง Undisturbed Soil Core ใกล้ ๆ Chamber นำตัวอย่างดินใส่กระป๋อง Polyethylene ขนาด 1 ลิตร ดูดอากาศในกระป๋องออก และ Flush ด้วย N_2 เพื่อสร้างสภาวะไม่มีอากาศ ยับยั้งกิจกรรมของ Denitrifier ในกระบวนการเปลี่ยน N_2O เป็น N_2 ด้วยการเติม C_2H_2 ปริมาตร 10% ของ headspace ปรับความดันบรรยากาศภายในกระป๋องให้เท่ากับบรรยากาศปกติที่ 1 ATM ด้วยการใช้เข็มเจาะผ่าน Injection plug เก็บตัวอย่างอากาศภายในกระป๋องทุกๆ 1,2,4, และ 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณก๊าซไนตรัสออกไซด์ ด้วยเครื่อง Gas Chromatography อัตราปลดปล่อยก๊าซไนตรัสออกไซด์ คำนวณจาก Idea gas law และอัตราเปลี่ยนแปลง (Slope) ของปริมาณก๊าซไนตรัสออกไซด์ต่อเวลา (dG/dt) โดยใช้สมการเส้นตรง

4. พารามิเตอร์และวิธีการศึกษาปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์และวิธีการศึกษาปัจจัยทางสภาพแวดล้อม

Parameters	วิธีการ
Nitrification rate	วัดอัตราการเพิ่ม NO_3^- ณ วันที่ 0, 3, 7, 14, 21,28 ด้วยสมการเส้นตรง
Soil Texture	Hydrometer method
Soil pH	เตรียม สารละลายดิน ในอัตราส่วน ดิน 1 ส่วน ต่อ น้ำกลั่น 2 ส่วน วัดค่า Soil reaction ด้วย pH meter
Inorganic Nitrogen NO_3^-	สกัดสารละลายดินด้วย 0.5 M K_2SO_4 เปลี่ยน NO_3^- เป็น NO_2^- ด้วย VCl_3 วัดค่า Absorbance ที่เกิดจากปฏิกริยาระหว่าง Acidic Griess reaction กับ NO_2^-
Inorganic Nitrogen NH_4^+	สกัดสารละลายดินด้วย 0.5 M K_2SO_4 วัดค่า Absorbance ที่เกิดจากปฏิกริยา Berthelot reaction
Microbial biomass C	สกัดสารละลายดินที่ถูกรมและไม่รม $CHCl_3$ ด้วย 0.5 M K_2SO_4 ดิน วัดปริมาณ Total C โดยวิธี Dry combustion ด้วยเครื่อง TOC analyzer โดย Microbial biomass C คำนวณได้จาก ผลต่างของ Total C ดินที่ถูกรมและไม่รมด้วย $CHCl_3$
Organic Carbon (Solid phase)	Dry oxidation
Dissolved Organic Carbon (DOC)	สกัดสารละลายดินด้วย 0.5 M K_2SO_4 วัดปริมาณ DOC โดยวิธี Dry combustion ด้วยเครื่อง TOC analyzer
Soil water content	Gravimetric soil moisture content โดยอบดิน ที่ 105-110 °C นาน 24 ชั่วโมง Soil water content = (น้ำหนักดินก่อนอบ – น้ำหนักดินหลังอบ) / น้ำหนักดินหลังอบ
Soil bulk density (D_b)	Gravimetric soil core moisture content โดยอบ soil core ขนาด 350cm^3 ดิน ที่ 105 °C นาน 72 ชั่วโมง D_b = น้ำหนักดินหลังอบ / ปริมาตรดิน
Water Filled Pore Space (% WFPS)	WFPS = (%H_2O / S_t) * 100, Total porosity; S_t = 1 - (D_b / D_p) Soil particle density; D_p= 2.65 g cm^{-3} %H_2O คือ The percentage of volumetric soil water content จากสูตร Volumetric water content = Soil water content x Bulk density

ผลการศึกษา

1. พื้นที่ศึกษา

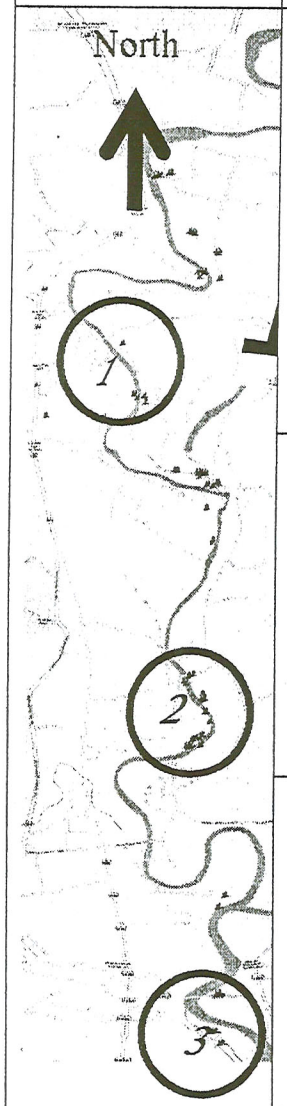
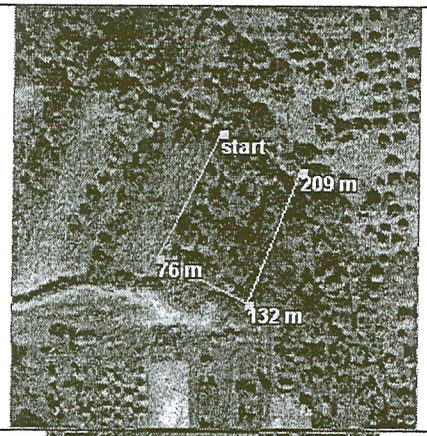
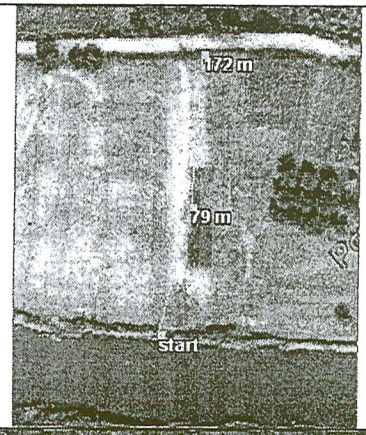
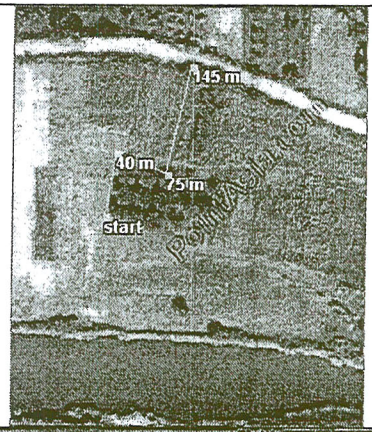
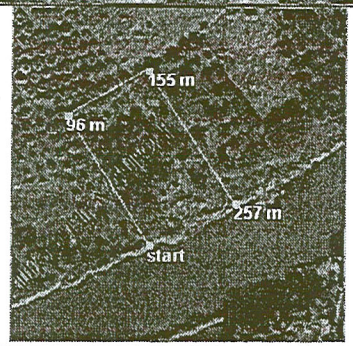
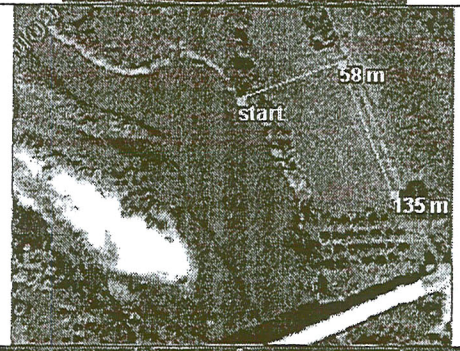
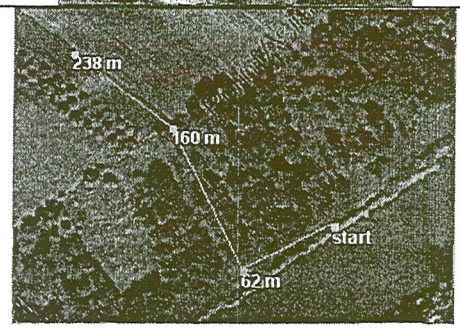
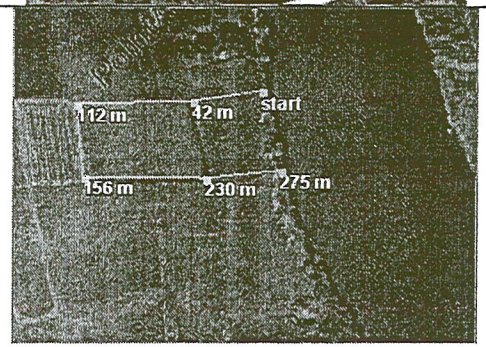
ครอบคลุม ละติจูด18.64809°N และ ลองติจูด 100.75989°E ถึง ละติจูด18.54459°N และลองตูจูด 100.76294°E เลียบลำน้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ลักษณะดินเป็นดินตะกอนแม่น้ำทับถม (Alluvial soil) แปลงศึกษากำหนดให้อยู่ติดแม่น้ำน่าน จะมีทั้งหมด 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำประกอบด้วย 3 การใช้ที่ดิน ได้แก่ ป่าปลูกจามจุรี (*Samanea saman*), ไร่ข้าวโพด และพื้นที่ติดต่อ ระหว่าง ป่าปลูกจามจุรี กับ ไร่ข้าวโพด รวม 3 transactions ระยะทางห่างระหว่าง แปลงศึกษาประมาณ 5 กิโลมตร

2. การเปลี่ยนแปลงการใช้ที่ดินและการเขตกรรม

พบการใช้ที่ดินประเภทเกษตรกรรม เช่น ข้าวโพด สวนผลไม้ ตลอดลำน้ำน่าน โดยเฉพาะข้าวโพด สวนลำไย และนาข้าว ในพื้นที่ริมน้ำ การปลูกข้าวโพดมีมานานกว่า 40 ปี และ พื้นที่ป่าปลูกจามจุรี มีน้อยมาก ซึ่งในอดีตการปลูกจามจุรี (*Samanea saman)* และเลี้ยงครั่งเป็นสินค้าสำคัญที่สร้างรายได้ให้ชาวบ้านและจังหวัดน่าน ด้วยว่าราคาครั่งตกต่ำ– ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด อีกทั้งต้องใช้เวลาในการปลูกจามจุรีและเลี้ยงครั่งกว่า 3 ปี จึงจะเก็บผลผลิตได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการใช้ที่ดินจาก พื้นที่ป่าปลูก เป็นไร่ข้าวโพด การปลูกข้าวโพดในพื้นที่ริมน้ำปลูก 2 ครั้งต่อปี ครั้งแรก ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึง กรกฎาคม และครั้งที่สอง ตุลาคม หรือ พฤศจิกายน ถึง มกราคม หรือ กุมภาพันธ์ ของทุกปี เกษตรกรใส่ปุ๋ย ครั้งแรก ด้วยสูตร 46-0-0 หลักจากต้นอ่อนข้าวโพดงอกประมาณ 7 วัน ในอัตรา 312.5 กิโลกรัม/เฮกเตร์ คิดเป็น 143.75 Kg N / เฮกเตร์ เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของต้นและใบ ครั้งที่สองช่วงเวลาระหว่างก่อนออกดอกและติดฝัก เกษตรกรใช้ปุ๋ย สูตร 15-15-15 ในอัตรา 156.25 กิโลกรัม/เฮกเตร์ หรือ คิดเป็น 23.43 Kg N / เฮกเตร์ รวมใช้ปุ๋ยต่อ 1 ฤดูกาลเพาะปลูก 167 23.43 Kg N / เฮกเตร์ รวมปริมาณการใช้ปุ๋ย 334 Kg N / เฮกเตร์ / ปี

เนื้อดินในพื้นที่ป่าปลูกเป็นเนื้อดิน Loam และ ในพื้นที่ข้าวโพด เนื้อดินเป็น ดิน Silt loam อันเนื่องมาจากการไถพรวน ทำให้เนื้อดิน Loam แตกตัว และมีอนุภาคดินเล็กลงเป็นทรายแป้ง ที่เรียกว่า Soil

ตารางที่ 3 The aerial photo of treatments to study N_2O emission across riparian zone.

Zone	Reforestation	Corn field	Reforestation and corn field
			
			
			

3. Nitrous oxide emission rate

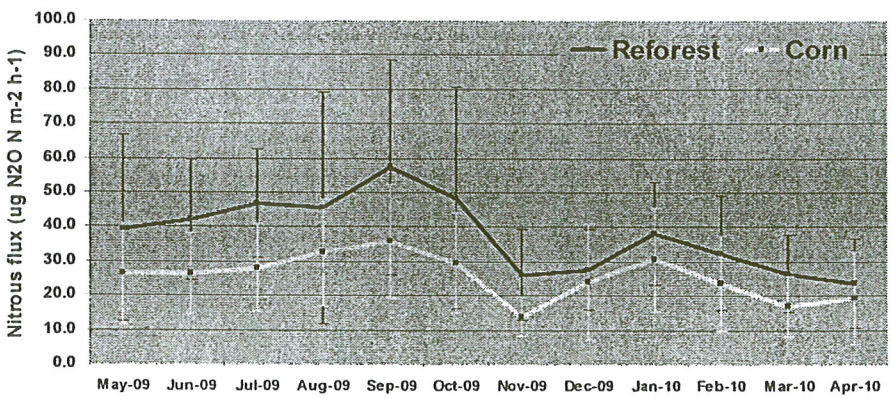
ผลการศึกษาพบว่า เดือนกันยายน ที่อัตราการปลดปล่อยไนตรัสออกไซด์เฉลี่ยสูงสุดในรอบปี ที่ 35.77 μg N_2O N m^{-2} h^{-1}

เมื่อพิจารณาตามการผันแปรตามช่วงฤดู (Seasonal variation) พบว่าฤดูฝนมีค่าเฉลี่ยรายเดือนอัตราการปลดปล่อย Nitrous oxide มากกว่าฤดูแล้ง (α = 0.05) เมื่อพิจารณาถึงการใช้ที่ดิน (Land use variation) พบว่า ในฤดูฝน พื้นที่ป่าปลูกมีค่าเฉลี่ยรายเดือนอัตราการปลดปล่อย Nitrous oxide มากกว่า พื้นที่ปลูกข้าวโพด (α = 0.05) และในฤดูแล้ง พื้นที่ป่าปลูกมีค่าเฉลี่ยรายเดือนอัตราการปลดปล่อย Nitrous oxide ไม่แตกต่างจากพื้นที่ปลูกข้าวโพด (α = 0.05)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยรายเดือนอัตราการปลดปล่อย Nitrous oxide (μg N_2O N m^{-2} h^{-1})

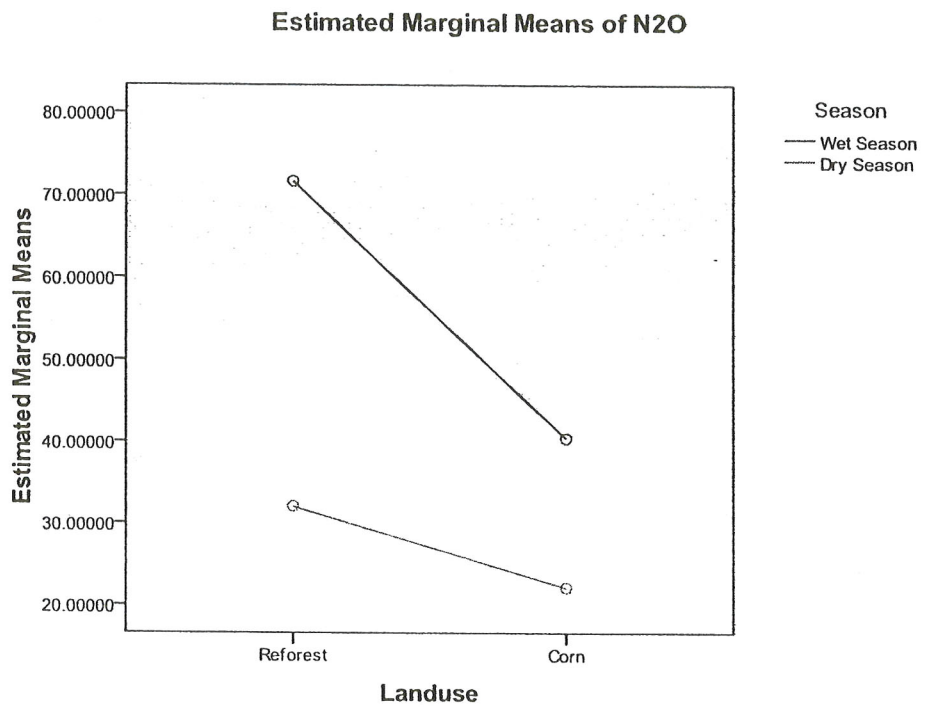
	May 09	Jun 09	Jul 09	Aug 09	Sep 09	Oct 09	Nov 09	Dec 09	Jan 10	Feb 10	Mar 10	Apr 10
Reforest												
Max	103.14	79.71	74.88	143.23	126.61	114.87	60.11	50.99	59.14	77.75	44.15	56.26
Min	6.57	18.28	14.07	10.14	3.49	5.04	9.62	6.91	13.61	10.07	11.70	4.63
Mean	39.48	41.93	46.70	45.63	57.43	48.36	26.18	27.49	38.09	32.43	26.57	23.64
SD	26.87	17.38	15.77	33.69	31.25	32.18	13.37	11.74	14.94	16.59	11.27	13.08
Corn												
Max	52.15	58.19	65.36	67.82	64.49	63.18	24.66	66.68	63.95	56.19	40.44	46.93
Min	1.87	1.28	14.07	10.14	3.49	7.74	2.62	4.80	12.13	10.13	3.62	2.42
Mean	26.23	26.36	28.13	32.49	35.77	29.70	13.85	23.97	30.53	23.69	16.80	19.34
SD	14.72	11.92	12.71	15.53	16.46	14.55	5.77	16.91	15.24	13.71	8.69	13.49

รูปที่ 2 Monthly average nitrous oxide fluxes



หากพิจารณาถึง อิธิพลร่วมของการผันแปรตามช่วงฤดูและการใช้ที่ดิน ที่มีต่ออัตราการปลดปล่อยไนตรัสออกไซด์ พบว่า ฤดูฝนและพื้นที่ป่าปลูก มีอิธิพลต่ออัตราการปลดปล่อยไนตรัสออกไซด์ มากกว่า ฤดูฝนและพื้นที่ปลูกข้าวโพด, ฤดูแล้งและพื้นที่ป่าปลูก, และ ฤดูแล้งและพื้นที่ปลูกข้าวโพด ตามลำดับ ดังรูปที่ 3 โดย

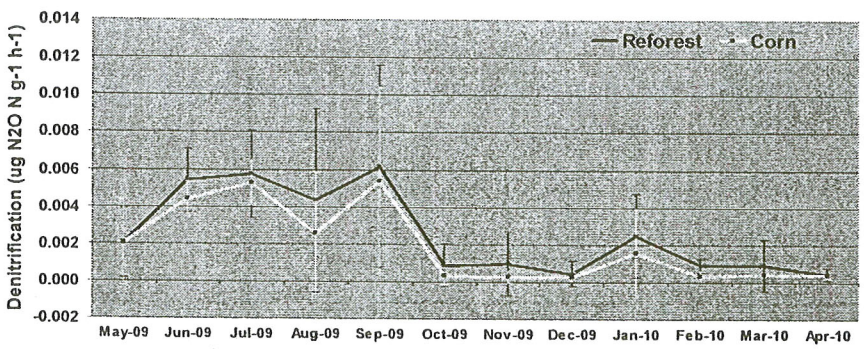
รูปที่ 3 Estimated marginal means of nitrous oxide emission



4. Denitrification

อัตราการเปลี่ยน Nitrate เป็น Nitrous oxide โดยกิจกรรมจุลินทรีย์ในดิน ในฤดูฝนมีค่าสูงกว่าฤดูแล้ง (α = 0.05) และ Denitrification อธิบายการผันแปรของ Nitrous oxide flux ในทิศทางบวก (R = 0.31)

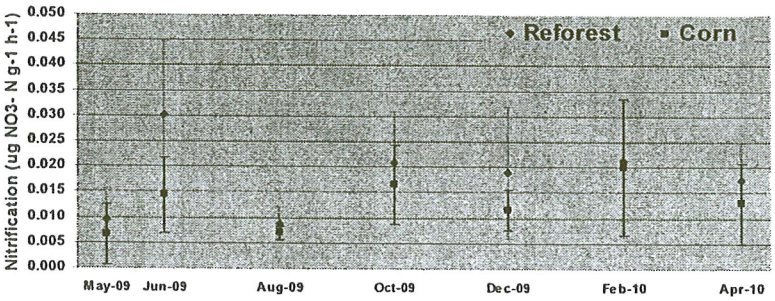
รูปที่ 4 Monthly average denitrification rate



5. Nitrification

อัตราการเปลี่ยน Ammonium เป็น Nitrate สูงสุดเดือน ตุลาคม และ ต่ำสุดในเดือน สิงหาคม โดยกระบวนการ Nitrification อธิบายการผันแปรของ Nitrous oxide flux ในทิศทางบวก ได้น้อยมาก (R = 0.034)

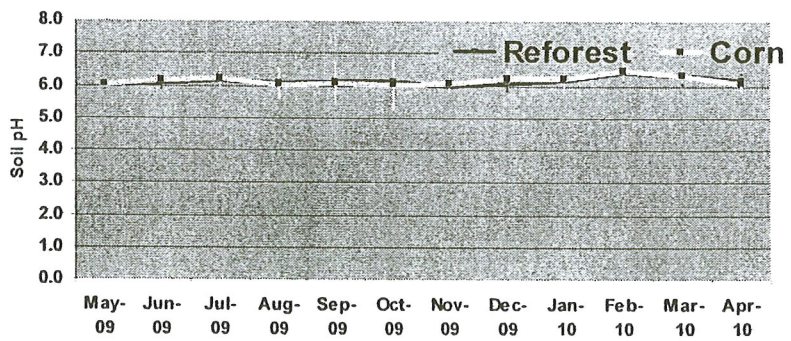
รูปที่ 5 Monthly average nitrification rate



6. Soil pH

Soil pH มีค่าเป็นกรดเล็กน้อย และการเปลี่ยนแปลงค่า pH ตามช่วงฤดูและการใช้ที่ดิน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α = 0.05)

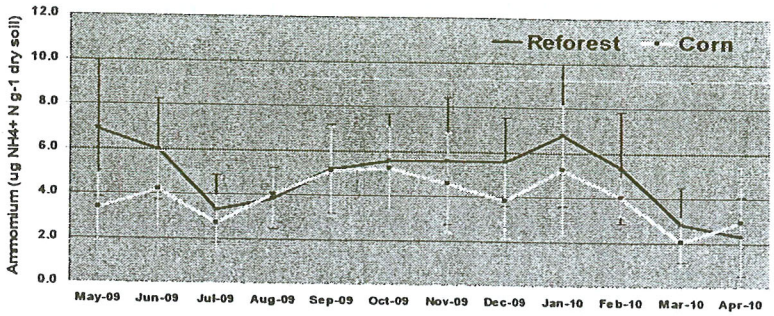
รูปที่ 6 Monthly average pH



7. Ammonium

ปริมาณแอมโมเนียม ในเดือนมิถุนายนมีปริมาณสูงสุด แต่ ไม่พบความแตกต่าง ระหว่างฤดูฝนและแล้ง (α = 0.05)

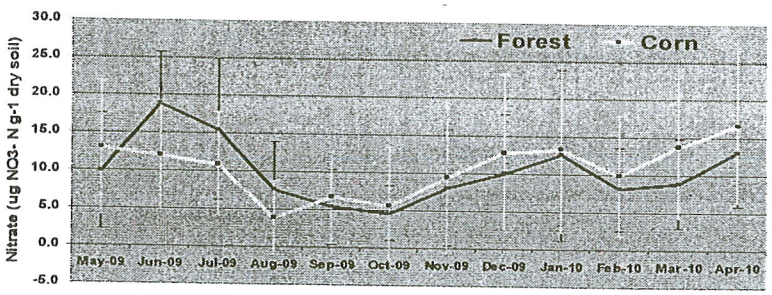
รูปที่ 8 Monthly average ammonium



8. Nitrate

ปริมาณไนเตรท ในเดือนมิถุนายนมีปริมาณสูงสุด แต่ ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างฤดูฝนและแล้ง ($\alpha = 0.05$)

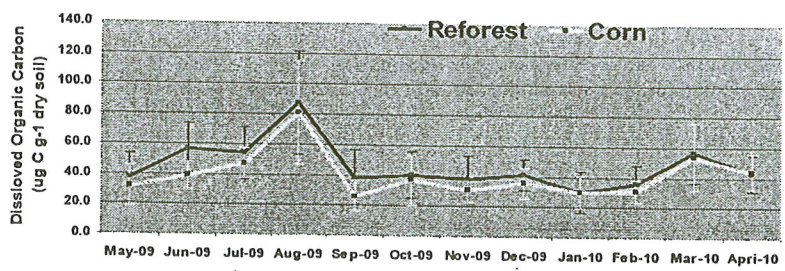
รูปที่ 9 Monthly average Nitrate



9. Dissolved Organic Carbon

ปริมาณไนเตรท ในเดือนสิงหาคมมีปริมาณสูงสุด พบความแตกต่างของปริมาณ DOC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha = 0.05$) ระหว่างฤดูฝนและแล้ง

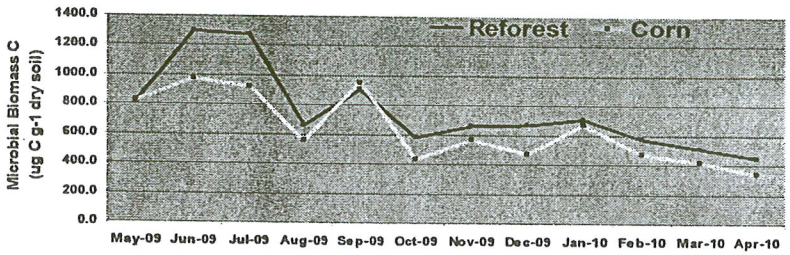
รูปที่ 10 Monthly average dissolved organic carbon



10. Microbial Biomass C

ปริมาณ ชีวมวล คาร์บอน ของจุลินทรีย์ในดิน มีค่าสูงในฤดูฝนและลดลงเป็นลำดับในฤดูแล้ง โดยปัจจัยที่มีผลการขึ้นลงของของ MBC คือ การไถกลบ ซากพืชในแปลงปลูกข้าวโพด โดยพบความแตกต่างของปริมาณ MBC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha = 0.05$) ระหว่างฤดูฝนและแล้ง

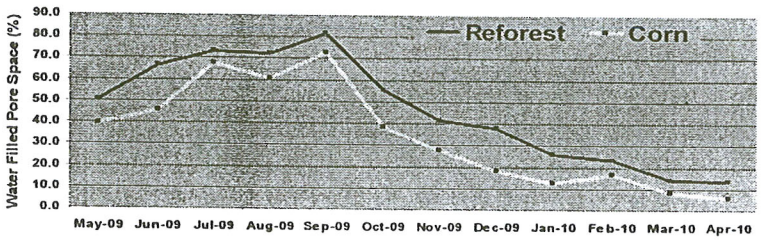
รูปที่ 11 Monthly averages dissolved organic carbon



11. Water Filled Pore Space

ปริมาณน้ำในช่องว่างของดิน มีค่าสูงในฤดูฝนและลดลงเป็นลำดับในฤดูแล้ง โดยปัจจัยที่มีผลการขึ้นลงของของ MBC คือ ปริมาณน้ำฝน โดยพบความแตกต่างของ WFPS ระหว่างฤดูฝนและแล้ง และการใช้ที่ดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($\alpha = 0.05$)

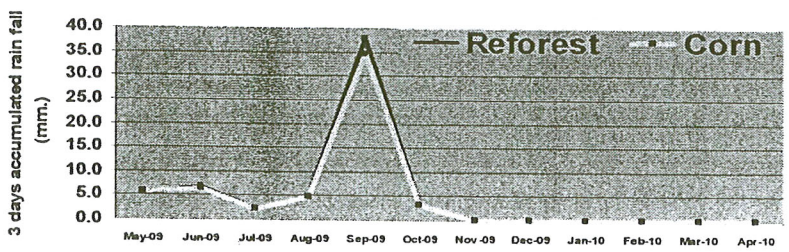
รูปที่ 12 Monthly averages water filled pore space



12. ปริมาณน้ำฝนสะสม 3 วันก่อนการวัดปริมาณ Nitrous oxide flux

ฤดูฝนในเดือน พ.ค. – ก.ย. มีฝนตก แต่ในฤดูแล้ง ไม่มีฝนตกเลย ปริมาณ ฝนมีความสัมพันธ์ต่อ WFPS และ การเกิดขึ้นของกระบวนการ Denitrification และ Nitrous oxide flux

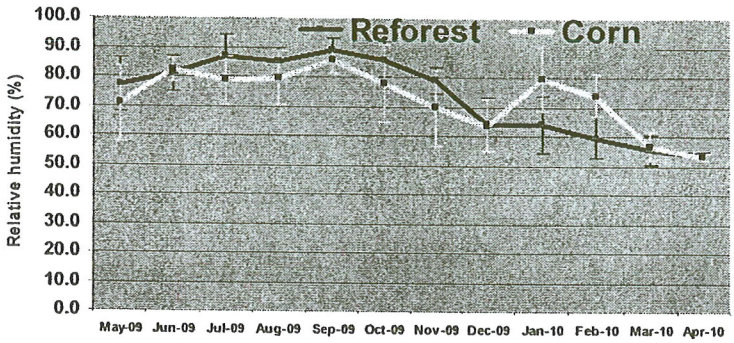
รูปที่ 13 Monthly rain fall accumulation 3 days before measured N_2O flux



13. **ความชื้นสัมพัทธ์ ณ พื้นที่ศึกษา**

ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ ในพื้นที่ศึกษามีความสัมพันธ์กับฤดูกาล และปริมาณน้ำฝน

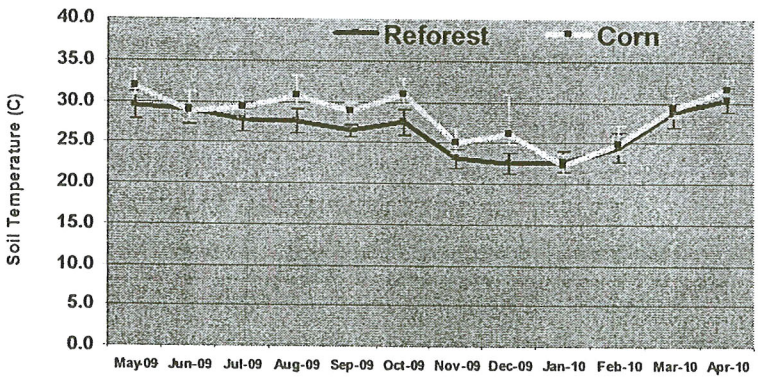
รูปที่ 14 Monthly average relative humidity of study area



14. Soil Temperature ณ พื้นที่ศึกษา

อุณหภูมิของดินขณะวัดการปลดปล่อยไนตรัสออกไซด์ พบว่า ในพื้นที่ปลูกข้าวโพด มีอุณภูมิดินเฉลี่ยสูงกว่าป่าปลูก เพราะว่าลักษณะการใช้ที่ดินที่เป็นพืชเชิงเดี่ยว ไม่มีสิ่งปกคลุมดิน

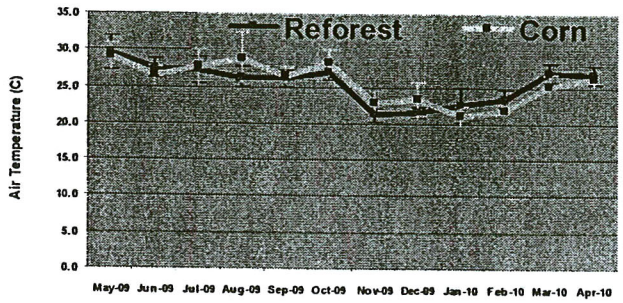
รูปที่ 15 Monthly average soil temperature of study area



15. Air Temperature ณ พื้นที่ศึกษา

อุณหภูมิอากาศขณะเก็บข้อมูลไนตรัสออกไซด์ พบว่า มีความผันแปรระหว่างพื้นที่ข้าวโพดและพื้นที่ป่า

รูปที่ 16 Monthly average air temperature of study area



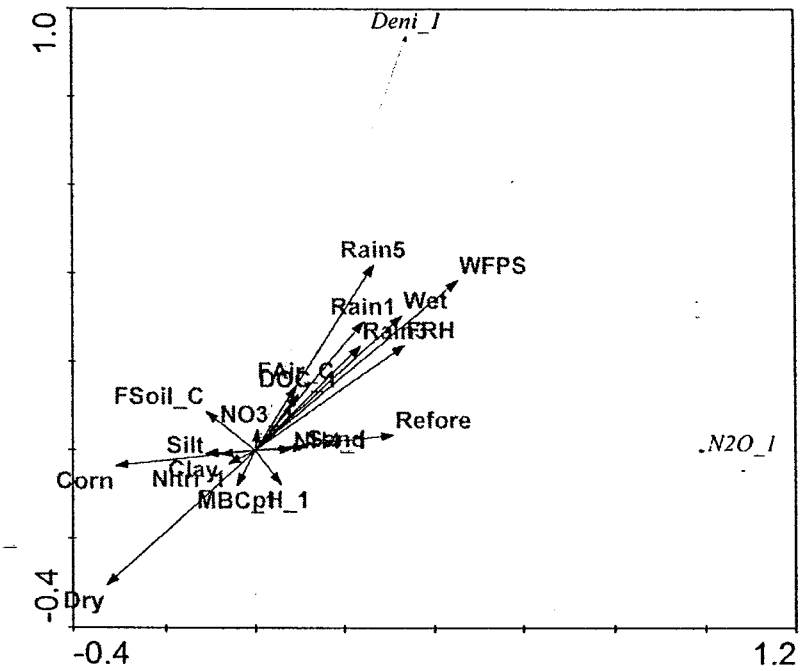
16. ความสัมพันธ์ระหว่าง Nitrous oxide emission rate และ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

แนวทางการวิเคราะห์ใช้เทคนิคการ Multivariate data analysis ด้วยโปรแกรม Canocal for Windows 4.5 ด้วยการกำหนดตัวแปรตาม ได้แก่ Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton และตัวแปรอิสระ 23 ตัวแปร ได้แก่ ฤดูกาล, การใช้ที่ดิน, Nitrification, Soil pH, Inorganic nitrogen, DOC, Microbial biomass C, ความชื้นดินโดยน้ำหนัก, Water Filled Pore Space, อุณหภูมิดิน ณ พื้นที่ศึกษา, อุณภูมิอากาศ ณ พื้นที่ศึกษา, ความชื้นสัมพัทธ์ ณ พื้นที่ศึกษา, อุณหภูมิอากาศ, ปริมาณน้ำฝนสะสม 1, 3 และ 5 วัน, ร้อยละของ Sand, Silt, Clay ดังผลการศึกษาต่อไปนี้

16.1 จากการวิเคราะห์ด้วย Detrended Canonical Correspondence Analysis พบว่า Lengths of gradient มีค่าน้อย (0.017) บ่งชี้ว่า ลักษณะข้อมูลมี continuous gradient ไม่กว้างนัก และมีค่าไม่มากกว่า 4.0 ดังนั้น สมการเส้นตรง จึงเหมาะสม ที่จะใช้อธิบาย ความผันแปรของปัจจัยทางสภาพแวดล้อม จำนวน 23 ตัวแปร ที่มีผลต่อ Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton rate

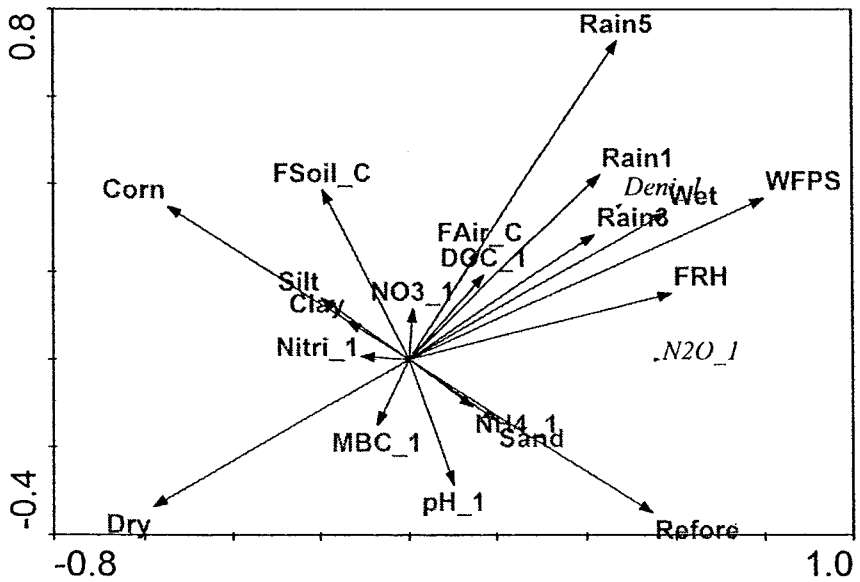
16.2 จากการวิเคราะห์ด้วย Principal Component Analysis ซึ่งเป็นเทคนิคเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรในการศึกษาโดยไม่มีการกำหนดว่าตัวแปรใดเป็นตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม พบว่า ตัวแปร 1) ความชื้นสัมพัทธ์และปริมาณน้ำในดิน 2) ฤดูกาล 3) การใช้ที่ดิน 4) % Sand ตามลำดับ โดย แกนหลักของ PCA อธิบายการผันแปรของตัวแปรที่ศึกษา ร้อยละ 100

รูปที่ 17 dependent-environment biplot diagram from the PCA



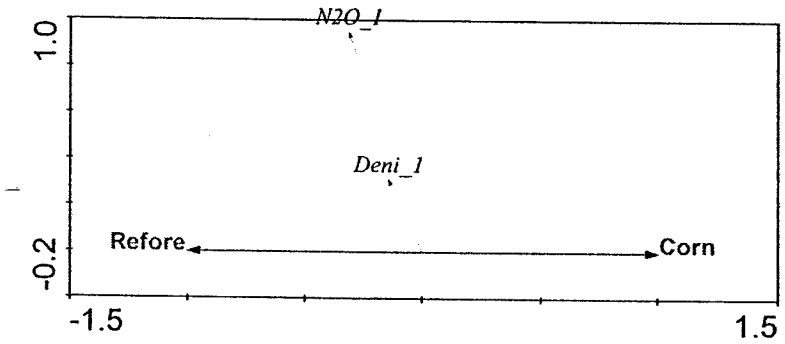
16.3 เมื่อทำการทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ เพื่ออธิบายความผันแปร ของ Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton rate กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ด้วยเทคนิค Redundancy analysis (RA) และทดสอบทางสถิติด้วย Monte Carlo permutation test พบว่า ตัวแปร จำนวน 23 ตัวแปร ใช้อธิบายความผันแปร Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton rate ได้ร้อยละ 32.1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.0020$)

รูปที่ 18 Dependent-environment biplot diagram from the RA



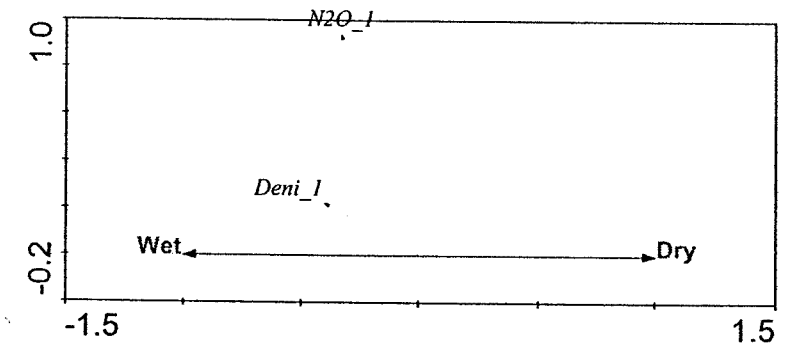
16.4 อิธิพลของการใช้ที่ดินต่อความผันแปร ของ Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton rate พบว่า แกนหลักสองแกนแรก อธิบายความผันแปรได้ ร้อยละ 9.6 และ 90.4 ผลการทดสอบ Monte Carlo permutation test มีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.0020) โดยป่าปลูกมีแนวโน้ม Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton rate สูงกว่า ข้าวโพด

รูปที่ 19 relations between land use and nitrous oxide flux and denitrificaiton rate



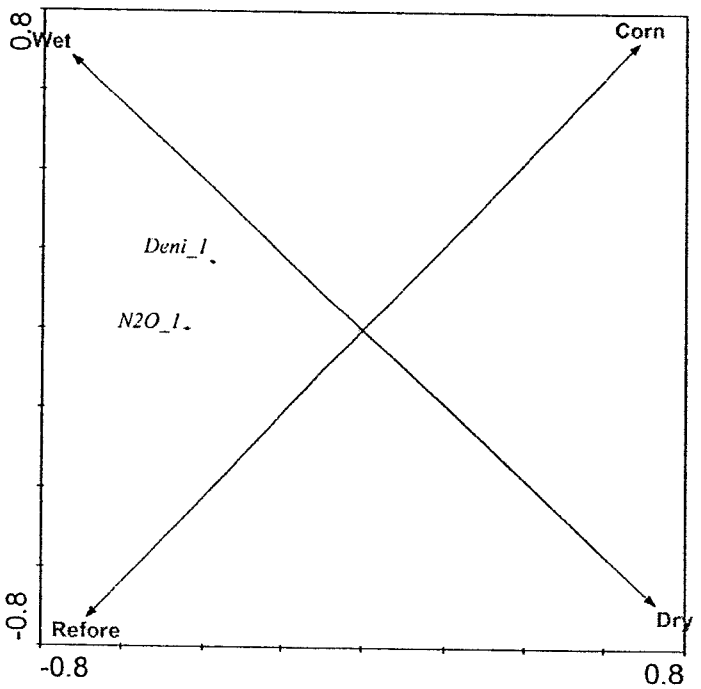
15.5 อิธิพลของฤดูกาลต่อความผันแปร ของ Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton rate พบว่าแกนหลักสองแกนแรก อธิบายความผันแปรได้ ร้อยละ 10.และ 89.2 ผลการทดสอบ Monte Carlo permutation test มีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.0020) โดยฤดูฝนมีแนวโน้ม Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton rate สูงกว่าฤดูแล้ง

รูปที่ 20 relations between seasons and nitrous oxide flux and denitrificaiton rate



15.6 อิธิพลของฤดูกาลและการใช้ที่ดินต่อความผันแปร ของ Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton rate พบว่าแกนที่ 1 และ 4 อธิบายความผันแปรได้ ร้อยละ 20.4 .และ 79.6 ผลการทดสอบ Monte Carlo permutation test มีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.0020) โดยฤดูฝนและป่าปลูกมีแนวโน้ม Nitrous oxide flux และ Denitrificaiton rate สูงกว่าฤดูแล้งและพื้นที่ปลูกข้าวโพด

รูปที่ 20 relations between seasons and land use and nitrous oxide flux and denitrificaiton rate



สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษา จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลอัตราการปลดปล่อยไนตรัสออกไซด์จากการใช้ที่ดินในระบบนิเวศริมน้ำ
2. กลไกและปัจจัยการปลดปล่อยไนตรัสออกไซด์จากกระบวนการ Denitrificaiton

เอกสารอ้างอิง

Drury, C. F., et al. 2008. Denitrification Techniques for Soils. In Carter, M. R. and Gregorich, E. G. (Eds.), Soil sampling and methods of analysis. NW, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Drury, C. F.,Hart, S. C. and Yang, X. M. 2008. Nitrification Techniques for Soils. In Carter, M. R. and Gregorich, E. G. (Eds.), Soil sampling and methods of analysis. NW, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Tiedje, J. M. 1982. Denitrification. In Page, A. L., Miller, R. H. and Keeney, D. R. (Eds.), Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties, part 2, PP. 1011–1026. Madison, Wiscosin: ASA–SSSA.

โครงการ CEB_D_20_2009

ชื่อ-นามสกุล นายรัชต โปชยะวณิช **เลขประจำตัว** 5173845523
หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตรชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ผลของฝายชะลอความชุ่มชื้นต่อการชุมนุมและการกระจายตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในบริเวณป่าผลัดใบในจังหวัดน่าน ประเทศไทย

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Effects of check dam on species assemblage and distribution of amphibian and reptile in a deciduous forest in Nan Province, Thailand

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฏฐ์ คนซื่อ

คำนำ

ปัญหาการจัดการทรัพยากรน้ำถือว่ามีความสำคัญตั้งแต่ในอดีตมาจนถึงปัจจุบัน การสร้างฝายชะลอความชุ่มชื้นเป็นการจัดการทรัพยากรน้ำรูปแบบหนึ่งซึ่งมีแนวโน้มว่าได้รับความสนใจมากขึ้นกว่าในอดีต เนื่องจากในปัจจุบัน ได้มีหน่วยงานจำนวนมากทั้งในส่วนของภาครัฐและเอกชนเข้ามามีส่วนร่วมในการสร้างฝายมากขึ้น การสร้างฝายที่ลำธารชั่วคราวในพื้นที่ที่แห้งแล้งจะช่วยชะลออัตราการไหลของน้ำ ช่วยให้น้ำบนผิวดินคงอยู่ในลำธารได้ยาวนานขึ้น และอาจช่วยให้ดินบริเวณพื้นที่โดยรอบมีความชุ่มชื้นมากขึ้น แม้ว่าผลของการสร้างฝายที่มีต่อปัจจัยทางกายภาพจะปรากฏค่อนข้างชัดเจน อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับผลของฝายชะลอความชุ่มชื้นที่มีต่อสิ่งมีชีวิตยังมีจำนวนน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลที่เกิดขึ้นกับสัตว์บกในบริเวณที่สร้างฝายนั้น

เนื่องจากข้อมูลด้านการชุมนุม (Assemblage) และรูปแบบการกระจาย (Distribution pattern) ของสัตว์ถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาด้านนิเวศวิทยา และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสัตว์ในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่บนบก สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานถือว่าเป็นกลุ่มสัตว์ที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของถิ่นที่อยู่อาศัยมาก การชุมนุมและรูปแบบการกระจายของสัตว์ในกลุ่มนี้จึงถูกนำมาใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมอย่างกว้างขวาง ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงใช้การชุมนุมและรูปแบบการกระจายของสัตว์กลุ่มนี้เป็นตัวติดตามผลของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการสร้างฝาย

ประกอบกับจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกำลังดำเนินโครงการสร้างฝายในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ณ บริเวณอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของฝายชะลอความชุ่มชื้นต่อการชุมนุมและการกระจายตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ดังกล่าว

ในรายงานความก้าวหน้าครั้งก่อนๆ ได้ใช้ผลจากการสำรวจในฤดูฝนในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยธรรมชาติของลำธารในพื้นที่ซึ่งเป็นลำธารชั่วคราว ลำธารจึงแห้งแล้งในฤดูแล้ง ถ้าพิจารณาปัจจัยเรื่องปริมาณน้ำที่ฝายสามารถกักเก็บไว้ได้เป็นหลัก จึงอาจถือได้ว่าฝายจะส่งผลต่อระบบนิเวศในฤดูแล้งได้น้อยกว่าในฤดูฝน ดังนั้นในรายงานความก้าวหน้าครั้งนี้จึงแบ่งการวิเคราะห์เป็นฤดูฝนกับฤดูแล้งเพื่อเปรียบเทียบผลระหว่างฤดูที่คาดว่าจะมีผลจากฝายมากกับฤดูที่คาดว่าจะมีผลจากฝายน้อย

วัตถุประสงค์

เพื่อเปรียบเทียบการชุมนุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานระหว่างพื้นที่ที่มีฝายและพื้นที่ที่ไม่มีฝาย

วิธีการศึกษา

1. สถานที่ศึกษาและการเลือกพื้นที่ศึกษา

สถานที่ศึกษาตั้งอยู่ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มหาวิทยาลัยได้รับอนุมัติให้เข้าใช้ประโยชน์ ณ บริเวณอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ซึ่งมีเนื้อที่โดยประมาณ 300 เฮกแตร์ (ประมาณ 2,000 ไร่) และพื้นที่ปกคลุมด้วยป่าผลัดใบ เนื่องจากขณะที่เริ่มทำการศึกษานี้ ฝายชะลอความชุ่มชื้นที่สร้างเสร็จแล้วส่วนใหญ่ตั้งอยู่ในลำธารสาย A ประกอบกับคุณลักษณะของลำธารสายนี้มีลักษณะเหมาะสำหรับการเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานดังนั้น จึงเลือกลำธารสายนี้เป็นตัวแทนของพื้นที่ศึกษาที่มีฝาย จากนั้นเลือกลำธารอีก 1 เส้นซึ่งเป็นลำธารที่ยังไม่ได้สร้างฝาย เนื่องจากลำธารสาย B มีลักษณะลำธารคล้ายกับลำธารสาย A อีกทั้งยังตั้งอยู่ไม่ห่างจากลำธารสาย A มากนัก จึงเลือกลำธาร B เป็นตัวแทนของพื้นที่ศึกษาที่ยังคงสภาพธรรมชาติอยู่ (ยังไม่ได้สร้างฝาย)

2. การสุ่มตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน

การศึกษานี้ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างโดยการสำรวจสัตว์ตามเส้นทางสำรวจถาวร ซึ่งแบ่งออกเป็นเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารเพื่อสำรวจถิ่นที่อยู่อาศัยบริเวณลำธาร และเส้นทางสำรวจบนบกเพื่อสำรวจถิ่นที่อยู่อาศัยบนบก

2.1 เส้นทางสำรวจตามแนวลำธาร

เส้นทางสำรวจตามแนวลำธารมีจำนวนทั้งสิ้น 20 เส้นทาง แบ่งเป็นเส้นทางสำรวจในลำธาร A และ B ลำธารละ 10 เส้นทาง เส้นทางสำรวจตามแนวลำธาร ในลำธารสาย A เริ่มตั้งแต่ฝายไปจนถึงฝายถัดไปหรือถึงจุดที่ระดับน้ำสูงสุดของฝายนั้น ส่วนในลำธารสาย B เส้นทางสำรวจตามแนวลำธารเริ่มตั้งแต่จุดที่คาดว่าจะสร้างฝายจนถึงจุดที่จะสร้างฝายจุดถัดไปหรือจุดที่ระดับน้ำสูงสุดของจุดที่คาดว่าจะสร้างฝายนั้น โดยเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารจะมีความกว้างเท่ากับความกว้างของลำธาร

2.2 เส้นทางสำรวจบนบก

เส้นทางสำรวจบนบกจะวางตัวขนานกับเส้นทางสำรวจตามแนวลำธาร โดยเส้นทางสำรวจตามแนวลำธาร 1 เส้นทาง มีเส้นทางสำรวจบนบกจำนวน 4 เส้นทาง วางตัวขนาน และห่างจากลำธารออกไปเป็นระยะ 5 10 25 และ 50 เมตรตามลำดับ เส้นทางสำรวจบนบกแต่ละเส้นทางมีความกว้าง 2 เมตร และมีความยาวเท่ากับระยะกระจัดระหว่างจุดเริ่มต้นและจุดสุดท้ายของเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารนั้นๆ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีเส้นทางสำรวจบนบกจำนวนทั้งสิ้น 80 เส้นทาง โดยอยู่ในลำธาร A และ B ลำธารละ 40 เส้นทาง

สำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในทุกเส้นทางสำรวจทุกเดือน เดือนละ 2 ครั้ง ซึ่งเป็นการสำรวจในเวลากลางวัน และกลางคืน ช่วงเวลาละ 1 ครั้ง บันทึกชนิดและจำนวนสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานที่พบขณะสำรวจ

3. การเก็บข้อมูลปัจจัยทางกายภาพ

ขอข้อมูลปริมาณน้ำฝนรวมรายเดือนจากสถานีวัดปริมาณน้ำฝนอัตโนมัติ ณ ที่ทำการ อบต. ไหล่น่าน อ. เวียงสา และอุณหภูมิอากาศเฉลี่ยรายเดือนจากสถานีอุตุนิยมวิทยา ณ อ. เมือง จ. น่าน

4. การวิเคราะห์ผลการศึกษา

รายงานความก้าวหน้าครั้งนี้ใช้ข้อมูลตั้งแต่เดือน เม.ย. 2552 ถึง เดือน มี.ค. 2553 ในการวิเคราะห์ผลการศึกษา โดยข้อมูลในส่วนของความหลากชนิดของสัตว์ที่พบ และความคล้ายคลึงกันขององค์ประกอบของชนิดสัตว์ที่พบ จะวิเคราะห์ตามฤดูกาล และกลุ่มเส้นสำรวจ

4.1 การแบ่งฤดูกาล

ใช้ข้อมูลปริมาณน้ำฝนรวม (มิลลิเมตร) และอุณหภูมิอากาศเฉลี่ย(องศาเซลเซียส) ในแต่ละเดือนเป็นเกณฑ์ โดยที่ถ้าเดือนใดมีค่าปริมาณน้ำฝนสูงกว่าสองเท่าของค่าอุณหภูมิอากาศในเดือนนั้นจะจัดให้เดือนนั้นเป็นฤดูฝน

4.2 ความหลากชนิด

ประเมินค่าความหลากชนิดในแต่ละกลุ่มเส้นทางสำรวจโดยใช้ดัชนีความหลากชนิดของ Simpson (Simpson's index of diversity) (Krebs, 1999) จากนั้นจึงใช้เปรียบเทียบระหว่างพื้นที่ที่มีฝายและไม่มีฝาย

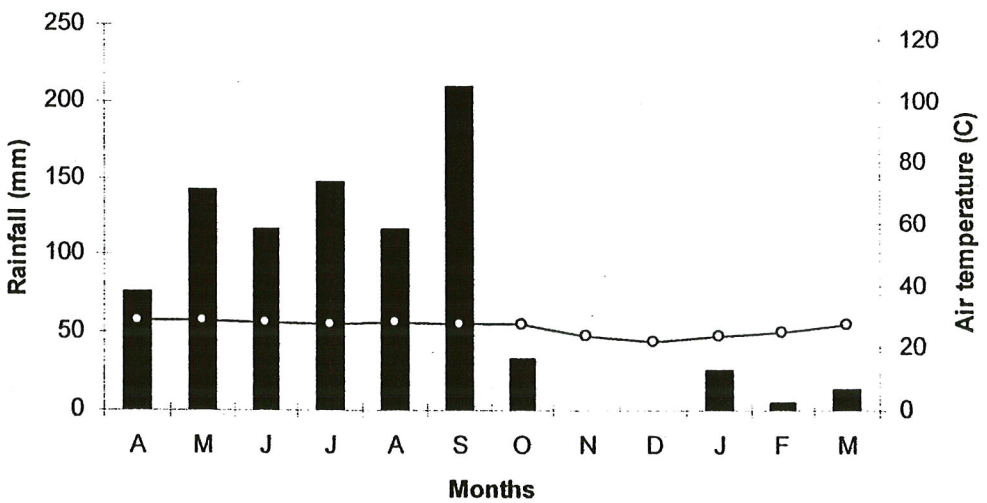
4.3 ความคล้ายคลึงกันขององค์ประกอบของชนิด

วิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันขององค์ประกอบของชนิดสัตว์ที่พบในแต่ละเส้นทางสำรวจโดยใช้การวิเคราะห์แบบ Cluster analysis with Euclidean distance measurements โดยใช้โปรแกรม PC-ORD vers. 4.25 (McCune and Mefford 1999)

ผลการศึกษา

1. การแบ่งฤดูกาล

เมื่อพิจารณาจากหลักเกณฑ์การแบ่งฤดูกาลพบว่า ฤดูฝนจะเริ่มตั้งแต่เดือน เม.ย. จนถึง เดือน ก.ย. 2552 ในขณะที่ฤดูแล้งจะเริ่มตั้งแต่เดือน ต.ค. 2552 จนถึง มี.ค. 2553 (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 กราฟเสดงปริมาณน้ำฝนและอุณหภูมิของพื้นที่ศึกษาซึ่งใช้ในการกำหนดฤดูกาล

2. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

2.1 ความหลากชนิด

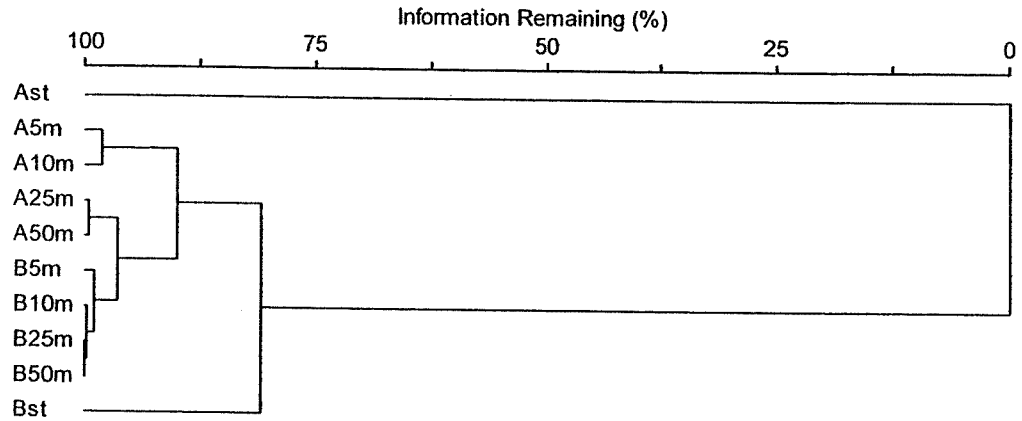
จากค่าดัชนีความหลากชนิดของ Simpson (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่า โดยในฤดูฝนค่าความหลากชนิดของพื้นที่ที่มีฝายและไม่มีฝายมีค่าใกล้เคียงกันในทุกๆ กลุ่มเส้นทางสำรวจ และในฤดูแล้งค่าความหลากชนิดของพื้นที่ที่มีฝายและไม่มีฝายมีค่าใกล้เคียงกันในทุกๆ กลุ่มเส้นทางสำรวจเช่นกัน ยกเว้น ที่กลุ่มเส้นทางสำรวจที่ห่างจากลำธาร 25 เมตร พบว่าค่าความหลากชนิดของพื้นที่ที่มีฝาย (0.74) มีค่ามากกว่าพื้นที่ที่ไม่มีฝาย (0.26)

ตารางที่ 1 แสดงค่าดัชนีความหลากชนิดของ Simpson เปรียบเทียบระหว่างพื้นที่ที่มีฝายและไม่มีฝาย

	พื้นที่ที่มีฝาย	**พื้นที่ที่ไม่มีฝาย**
ฤดูฝน		
กลุ่มเส้นสำรวจ		
ลำธาร	0.80	0.81
5 เมตรจากลำธาร	0.73	0.83
10 เมตรจากลำธาร	0.67	0.83
25 เมตรจากลำธาร	0.74	0.77
50 เมตรจากลำธาร	0.76	0.76
ฤดูแล้ง		
กลุ่มเส้นสำรวจ		
ลำธาร	0.78	0.81
5 เมตรจากลำธาร	0.80	0.79
10 เมตรจากลำธาร	0.69	0.6
25 เมตรจากลำธาร	0.74	0.26
50 เมตรจากลำธาร	0.71	0.68

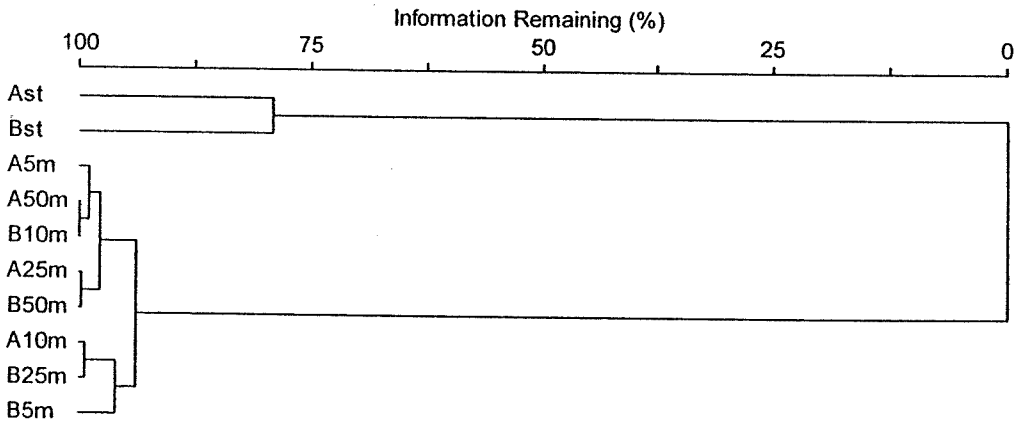
2.2 ความคล้ายคลึง

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มองค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในแต่ละกลุ่มเส้นสำรวจในฤดูฝนระหว่างพื้นที่ที่มีฝายและไม่มีฝายพบว่า สามารถแบ่งกลุ่มเส้นสำรวจออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย กลุ่มเส้นทางสำรวจบนบกทั้งของพื้นที่ที่มีฝายและไม่มีฝาย และกลุ่มเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารที่ไม่มีฝาย กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกลุ่มเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารที่มีฝายเพียงกลุ่มเดียว



รูปที่ 2 แสดงการวิเคราะห์การจัดกลุ่มองค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในฤดูฝนระหว่างลำธารที่มีฝายและไม่มีฝายในทุกกลุ่มเส้นสำรวจ

ในขณะที่ในฤดูแล้ง สามารถแบ่งกลุ่มเส้นสำรวจออกเป็น 2 กลุ่ม แต่มีองค์ประกอบของกลุ่มเส้นทางสำรวจต่างกัน คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย เส้นทางสำรวจบนบกทั้งหมด ทั้งในพื้นที่ที่มีฝายและไม่มีฝาย กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารทั้งที่มีฝายและไม่มีฝาย



รูปที่ 3 แสดงการวิเคราะห์การจัดกลุ่มองค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในฤดูแล้งระหว่างลำธารที่มีฝายและไม่มีฝายในทุกกลุ่มเส้นสำรวจ

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มองค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในฤดูฝนระหว่างพื้นที่ที่มีฝายและไม่มีฝายพบว่า องค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มเส้นทางสำรวจในลำธารที่มีฝายแตกต่างจากกลุ่มเส้นทางสำรวจในลำธารที่ไม่มีฝาย และยังแตกต่างจากกลุ่มเส้นทางสำรวจบนบกอื่นๆอีกด้วย ในขณะที่ในฤดูแล้งพบว่าองค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มเส้นทางสำรวจในลำธารทั้งที่มีฝายและไม่มีฝายมีความใกล้เคียงกัน และเส้นทางสำรวจในลำธารทั้งสองนี้ก็แตกต่างจากกลุ่มเส้นทางสำรวจบนบกอื่นๆ

3. สัตว์เลื้อยคลาน

3.1 ความหลากชนิด

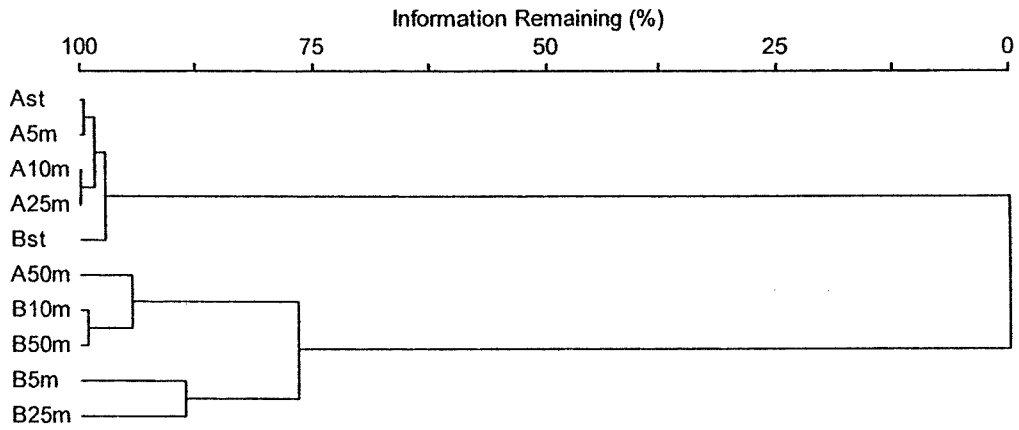
จากค่าดัชนีความหลากชนิดของ Simpson แสดงให้เห็นว่า ในฤดูฝนความหลากชนิดของสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่มเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารที่มีฝายมีค่าน้อยกว่าของที่ไม่มีฝาย ในขณะที่ค่าความหลากชนิดของกลุ่มเส้นทางสำรวจบนบกทั้งหมดในพื้นที่ที่มีฝายมีค่ามากกว่าในพื้นที่ที่ไม่มีฝาย ส่วนในฤดูแล้งพบว่าความหลากชนิดของกลุ่มเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารมีค่าใกล้เคียงกันระหว่างสองพื้นที่ ในขณะที่ค่าความหลากชนิดของกลุ่มเส้นทางสำรวจบนบกทั้งหมดในพื้นที่ที่มีฝายมีค่ามากกว่าในพื้นที่ที่ไม่มีฝาย

ตารางที่ 2 แสดงค่าดัชนีความหลากชนิดของ Simpson เปรียบเทียบระหว่างพื้นที่ที่มีฝายและไม่มีฝาย

	พื้นที่ที่มีฝาย	**พื้นที่ที่ไม่มีฝาย**
ฤดูฝน		
กลุ่มเส้นสำรวจ		
ลำธาร	0.47	0.66
5 เมตรจากลำธาร	0.73	0.47
10 เมตรจากลำธาร	0.64	0.33
25 เมตรจากลำธาร	0.66	0.14
50 เมตรจากลำธาร	0.45	0.23
ฤดูแล้ง		
กลุ่มเส้นสำรวจ		
ลำธาร	0.66	0.69
5 เมตรจากลำธาร	0.69	0.42
10 เมตรจากลำธาร	0.73	0.39
25 เมตรจากลำธาร	0.68	0.25
50 เมตรจากลำธาร	0.48	0.33

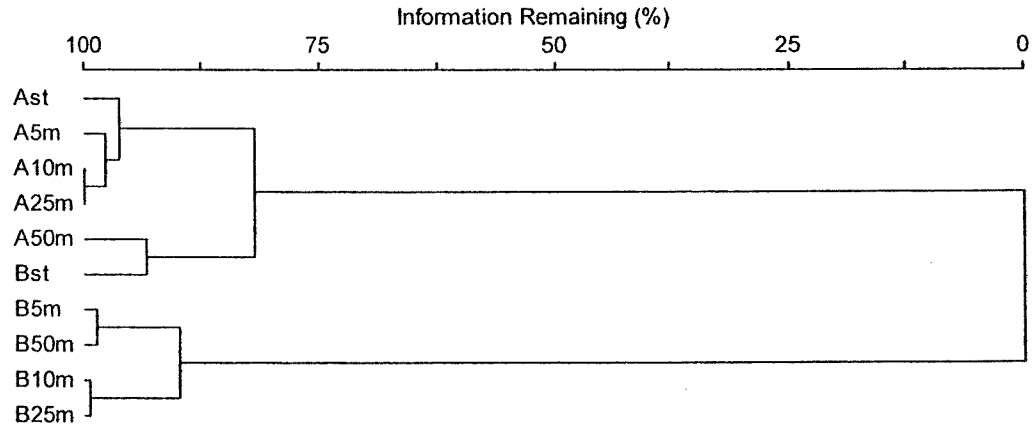
3.2 ความคล้ายคลึง

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มองค์ประกอบของชนิดของสัตว์เลื้อยคลานพบว่า ในฤดูฝนสามารถแบ่งกลุ่มเส้นทางสำรวจออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกลุ่มเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารทั้งที่มีฝายและไม่มีฝาย และกลุ่มเส้นทางสำรวจบนบกของพื้นที่ที่มีฝายที่อยู่ห่างจากลำธาร 5 10 และ 25 เมตร ในขณะที่กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย กลุ่มเส้นทางสำรวจบนบกทั้งหมดของพื้นที่ที่ไม่มีฝาย และเส้นทางสำรวจบนบกในพื้นที่ที่มีฝายที่ห่างจากลำธาร 50 เมตร



รูปที่ 4 แสดงการวิเคราะห์การจัดกลุ่มองค์ประกอบของชนิดสัตว์เลื้อยคลานในฤดูฝนระหว่างลำธารที่มีฝายและไม่มีฝายในทุกกลุ่มเส้นสำรวจ

ส่วนในฤดูแล้งสามารถแบ่งกลุ่มเส้นทางสำรวจออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกลุ่มเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารทั้งที่มีฝายและไม่มีฝาย และกลุ่มเส้นทางสำรวจบนบกของพื้นที่ที่มีฝายทั้งหมด ในขณะที่กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย กลุ่มเส้นทางสำรวจบนบกทั้งหมดของพื้นที่ที่ไม่มีฝาย



รูปที่ 5 แสดงการวิเคราะห์การจัดกลุ่มองค์ประกอบของชนิดสัตว์เลื้อยคลานในฤดูแล้งระหว่างลำธารที่มีฝายและไม่มีฝายในทุกกลุ่มเส้นสำรวจ

สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษา จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านกายภาพและชีวภาพที่เป็นผลมาจากการสร้างฝายชะลอความชุ่มชื้นในพื้นที่

2. ข้อมูลความเชื่อมโยงระหว่างการสร้างฝายชะลอความชุ่มชื้นกับการเปลี่ยนแปลงการชุมนุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานบริเวณลำธารนั้น

3. หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถยืนยันผลของการสร้างฝายชะลอความชุ่มชื้นที่มีต่อความหลากชนิดของสัตว์ในพื้นที่ ซึ่งสามารถใช้ในการสนับสนุนการใช้ฝายชะลอความชุ่มชื้นเป็นเครื่องมือสำหรับการจัดการทรัพยากรธรรมชาติต่อไป

4. แนวทางสำหรับการใช้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน ชนิดที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงถิ่นที่อยู่อาศัย ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์พื้นที่ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Krebs, C. J. 1999. Ecological methodology. 2nd ed. California: Welsey Educational.

McCune B, MJ Mefford. 1999. Multivariate Analysis of Ecological Data, Version 4.25. Gleneden Beach, Oregon: MjM Software.

โครงการ CEB_D_21_2010

CEB_D_21_2010

ชื่อ-นามสกุล นายปรัชญาพร วันชัย **เลขประจำตัว** 5173923823
หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

การใช้วิทยุติดตามในการศึกษาขนาดเขตอาศัยและกิจกรรมของเต่าเดือย *Manouria impressa* (Gunther, 1882)

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

RADIO-TELEMETRY STUDY OF HOME-RANGE SIZE AND ACTIVITIES OF THE IMPRESSED TORTOISE, *Manouria impressa* (Gunther, 1882)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. กำธร ธีรคุปต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม Professor Dr. Craig Stanford

คำนำ

ปัจจุบันการศึกษาข้อมูลทางด้านชีววิทยาโดยเฉพาะนิเวศวิทยาของเต่าบก ในประเทศไทยยังมีน้อย ที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะเน้นการศึกษาเกี่ยวกับด้านอนุกรมวิธาน และการกระจายของสัตว์เป็นส่วนใหญ่ ข้อมูลด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา ถิ่นที่อยู่อาศัย รวมทั้งรูปแบบกิจกรรมในธรรมชาติ ยังมีการศึกษาน้อยมาก ซึ่งปัญหาหนึ่งของการศึกษานิเวศวิทยาของสัตว์ในสภาพธรรมชาติ คือ การติดตามสัตว์ โดยเฉพาะเต่าซึ่งมักมีจำนวนประชากรน้อยและหลบซ่อนตัวได้ดี ทำให้ไม่สามารถที่จะติดตามและศึกษานิเวศวิทยาของสัตว์ชนิดนั้นๆได้ ฉะนั้น การใช้วิทยุติดตามจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะช่วยให้เรารู้ถึงตำแหน่งของสัตว์ และสามารถศึกษาข้อมูลการเคลื่อนที่ การใช้พื้นที่ เขตที่อยู่อาศัย รวมไปถึงปัจจัยสภาพแวดล้อมและอาหารที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของสัตว์นั้นๆได้

จากการจัดสถานภาพด้านการอนุรักษ์ของ IUCN ในปัจจุบันเต่าเดือย (*M. impressa*) ถูกจัดให้อยู่ในสัตว์ที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (Vulnerable-VU) และ CITES Appendix II เนื่องจากในปัจจุบันเต่าชนิดนี้ลดจำนวนลงอย่างมากเนื่องจากการล่าอย่างผิดกฎหมายเพื่อมาเป็นอาหารและนำมาเป็นสัตว์เลี้ยง การศึกษาครั้งนี้จะทำให้เราทราบถึงข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยาซึ่งอาจนำข้อมูลที่ได้บางส่วนไปใช้ประโยชน์ในด้านการวางแผนการอนุรักษ์และการขยายพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาอาณาเขตที่อยู่อาศัยของเต่าเดือย (*M. impressa*)
2. ศึกษากิจกรรมการดำรงชีวิตและพฤติกรรมในสภาพธรรมชาติของเต่าเดือย (*M. impressa*)
3. ศึกษาปัจจัยสภาพแวดล้อมรวมถึงอาหารที่มีผลต่อกิจกรรมการดำรงชีวิตของเต่าเดือย (*M. impressa*)

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาอาณาเขตที่อยู่อาศัยของเต่าเดือย (*M. impressa*)

1.1 สถานที่ศึกษา

ศึกษาขนาดของเขตอาศัย ของเต่าเดือย (*M. impressa*) ณ เขตรักษาพันธ์สัตว์ป่าภูหลวง จ.เลย

1.2 วิธีการสำรวจ

ทำการสำรวจโดยวิธีการเดินหา โดยสำรวจในบริเวณที่ใกล้แหล่งน้ำ บริเวณที่เจ้าหน้าที่เคยพบและบริเวณที่คาดว่าจะเป็นแหล่งอาหาร

1.3 วิทยุติดตาม

เต่าเดือย (*M. impressa*) ที่พบในข้อ 1.2 จะทำการติดตั้งตัวส่งสัญญาณวิทยุไว้ที่ด้านข้างของกระดอง โดยใช้กาวที่มีคุณสมบัติกันน้ำติดอยู่ได้นานและง่ายต่อการแกะออกด้วยมีด และไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ (Boarman et al., 1998) โดยวิทยุแต่ละตัวจะถูกตั้งความถี่ที่แตกต่างกัน

1.4 การติดตาม

เสาอากาศและตัวรับสัญญาณจะเป็นตัวบอกตำแหน่งของเต่าแต่ละตัวที่ทำการติดวิทยุ ทำการติดตามอย่างน้อยเดือนละ 3 ครั้ง โดยเริ่มติดตามจากบริเวณที่พบในครั้งล่าสุด ในแต่ละครั้งที่พบ จะทำการบันทึกวันและเวลาที่พบ ตำแหน่งของเต่าแต่ละตัวจะถูกบันทึกด้วย GPS ในระบบ UTM

วิเคราะห์ขนาดของเขตอาศัยของเต่าเดือย (*M. impressa*) แต่ละตัว ด้วย Minimum Convex Polygon method และเปรียบเทียบความแตกต่างของอาณาเขตที่อยู่อาศัยระหว่างเพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งความแตกต่างระหว่างฤดูฝนและฤดูแล้ง โดยใช้สถิติ Man-Whitney U-test

2. ศึกษากิจกรรมการดำรงชีวิตและพฤติกรรมในสภาพธรรมชาติของเต่าเดือย (*M. impressa*)

ศึกษากิจกรรมของเต่าเดือย (*M. impressa*) ณ เขตรักษาพันธ์สัตว์ป่าภูหลวง โดยทำการสำรวจและเก็บข้อมูลของเต่าเดือยโดยวิธีการเดินหาโดยใช้สัญญานวิทยุ การสำรวจจะกระทำในเวลากลางวัน เริ่มสังเกตพฤติกรรมด้วยกล้องส่องทางไกล บันทึกภาพ และบันทึกข้อมูลดังนี้

- กิจกรรมและพฤติกรรมที่ทำ เช่น ออกหากิน หลบซ่อน พฤติกรรมการป้องกันตัวและการสืบพันธ์ เป็นต้น
- ช่วงเวลาที่ทำกิจกรรม
- ระยะเวลาที่หากิน

เปรียบเทียบความแตกต่างของกิจกรรมระหว่างเพศโดยใช้สถิติ Mann-Whitney u test และเปรียบเทียบความแตกต่างของกิจกรรมระหว่างฤดูฝนและฤดูแล้ง ระหว่างเพศผู้และเพศเมียในแต่ละฤดู โดยใช้สถิติ Wilcoxon method pairs test

3. ศึกษาปัจจัยสภาพแวดล้อมรวมถึงอาหารที่มีผลต่อกิจกรรมการดำรงชีวิตของเต่า

ทำการบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับประเภทและลักษณะของที่อยู่อาศัย อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ความสูงของพื้นที่ ศัตรูในธรรมชาติ พืชอาหาร ในกรณีที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของพืชได้ อาจจำเป็นต้องมีการเก็บออกมาจำแนกในห้องปฏิบัติการ

เปรียบเทียบความแตกต่างอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ความสูงของพื้นที่ ที่มีผลต่อกิจกรรมของเต่าเดือย (*M. impressa*) โดยใช้สถิติ F-test ที่ความเชื่อมั่น 95 %

การดำเนินการในห้องปฏิบัติการ

- วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลความแตกต่างของเวลาในการดำเนินกิจกรรมแต่ละกิจกรรม และพฤติกรรมที่แสดงในแต่ละกิจกรรมระหว่างเต่าแต่ละตัวและระหว่างเพศ รวมทั้งเปรียบเทียบความแตกต่างของกิจกรรมระหว่างฤดูฝนและฤดูแล้ง และความสัมพันธ์กับปัจจัยสิ่งแวดล้อม
- จำแนกชนิดของพืชอาหาร

ผลการศึกษา

การติดตั้งตัวส่งสัญญาณวิทยุ

ติดตั้งสัญญาณวิทยุไปแล้วทั้งสิ้น 14 ตัว เป็นตัวเต็มวัยเพศผู้ 5 ตัว ตัวเต็มวัยเพศเมีย 6 ตัวและตัวที่ยังไม่เต็มวัย 3 ตัว

ขนาดของเขตอาศัย

ในส่วนของขนาดของเขตอาศัยของเต่าเดือยนั้นอยู่ในระหว่างการวิเคราะห์และเก็บข้อมูลเพิ่มเติม ในฤดูแล้ง ประกอบกับในบางจุดไม่สามารถทำการจับพิกัดในระบบ UTM ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการวิเคราะห์ข้อมูลได้ จึงต้องมีการกลับไปเก็บข้อมูลใหม่เพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้องมากที่สุด แต่จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเต่าเดือยตัวเต็มวัยมีแนวโน้มของขนาดเขตอาศัยที่กว้างกว่าตัวที่ยังไม่เต็มวัย

พืชอาหาร

จากการติดตามสามารถเก็บพืชอาหารทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง โดยเป็นเห็ดทั้งหมด สามารถจำแนกเห็ดถึงระดับสกุลได้ 4 สกุล ได้แก่ *Boletus* (เห็ดผึ้ง) *Amanita* (เห็ดระโงก) *Russula* (เห็ดไค, เห็ดน้ำหมาก, เห็ดถ่าน) *Aauricularia* (เห็ดหูหนู)

ลักษณะถิ่นอาศัยและกิจกรรมการดำรงชีวิต

จากการสำรวจสามารถจำแนกลักษณะถิ่นอาศัยของเต่าเดือยได้ 4 ลักษณะได้แก่ ป่าดิบเขา ป่าดิบเขาแคระ ป่าไผ่และในลำธารตื้นๆ

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าในช่วงฤดูฝนเต่าเดือยเลือกที่จะอยู่ในบริเวณป่าดิบเขาซึ่งเป็นบริเวณที่มีแหล่งอาหารคือเห็ดขึ้นอยู่ทั่วไป ในส่วนของพฤติกรรมพบว่าเต่าส่วนใหญ่จะมีพฤติกรรมการซุกซ่อนตัวโดยแหล่งซ่อนตัวของเต่าที่พบได้แก่ ใต้ใบไม้ กองไม้แห้ง ขอนไม้ ในโพลงดิน ใต้รากไม้ ใต้ก้อนหิน และลำธารตื้นๆ โดยระยะเวลาการซ่อนตัวอาจเพียงหนึ่งวัน หรือบางครั้งอาจจะนานเป็นเดือน นอกจากนี้ยังพบพฤติกรรมการสืบพันธุ์ 3 ครั้ง ในช่วงเดือนพฤษภาคมและมิถุนายน

สรุปผลและวิจารณ์

ยังต้องรอผลจากการศึกษาในช่วงฤดูแล้ง จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลพื้นฐานที่นำมาใช้ประโยชน์ในการวางแผนด้านการอนุรักษ์ของเต่าเดือย (*M. impressa*) การขยายพันธุ์ในที่เลี้ยง และการศึกษาวิจัยด้านอื่นๆต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Boardman, W. I.; Goodlett, T.; Goodlett, G.; and Hamilton, P. 1998. Review of radio transmitter attachment and techniques for turtle research and recommendations for improvement. Herpetological Review 29: 26-33

Chan-ard, T., K. Thirakhupt, and P. P. van Dijk. 1996. Observations on *Manouria impressa* at Phu Luang Wildlife Sanctuary, northeastern Thailand, Chelonian Conserv. Biol. 2(1): 109-113.

Pough, F. H.; Andrews, R.M.; Cadle, J.E.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H.; and Wells, K.D. 2004. Herpetology. 3rd ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA.

Thirakhupt, K., and van Dijk, P. P. 1994. Species diversity and conservation of turtles of western Thailand. Natural History Bulletin of the Siam Society 42: 207-259.

โครงการ CEB_D_22_2010

CEB_D_22_2010

ชื่อ-นามสกุล นางสาวนิตยา สมทรัพย์ **เลขประจำตัว** 5073833923

หลักสูตร วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาไทย)

ปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพและการเปลี่ยนแปลงแทนที่ในชุมชนแพลงก์ตอนพืช บริเวณชายฝั่งศรีราชา-สีชัง จังหวัดชลบุรี

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ)

Factors affecting biodiversity and succession in phytoplankton communities in the coastal area of Si Racha-Sichang, Chonburi province

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทนา คชเสนี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉราภรณ์ เปี่ยมสมบูรณ์

คำนำ

เกาะสีชังเป็นเกาะที่มีขนาดใหญ่ตั้งอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนใน เป็นเกาะที่มีความสำคัญทางด้านประวัติศาสตร์โดยเป็นที่ตั้งของโบราณสถาน คือ พระจุฑาธุชราชสถาน ซึ่งเป็นพระราชวังในรัชกาลที่ 5 และมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจโดยเป็นแหล่งท่องเที่ยวทางธรรมชาติ การประมง และการขนส่งทางทะเล

จากตำแหน่งที่ตั้งของเกาะสีชังซึ่งอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนใน จึงจำกัดการหมุนเวียนของน้ำออกสู่ทะเลภายนอก และทางตอนเหนือซึ่งติดกับแม่น้ำบางปะกงโดยเป็นแหล่งนำพาน้ำทิ้งและสารอินทรีย์จากกิจกรรมต่างๆ ในลุ่มน้ำมายังบริเวณนี้ จึงทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์และมวลสารในน้ำและตะกอนดิน ประกอบกับการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดินบนเกาะสีชัง การสร้างท่าเรือน้ำลึก การอพยพย้ายถิ่นของประชากรเข้ามาในเกาะสีชัง การขยายตัวของการขนส่งทางทะเล และการพัฒนาการท่องเที่ยว ทำให้เกิดปัญหาต่อสภาพแวดล้อมของเกาะสีชังและบริเวณใกล้เคียง เช่น ปัญหาจากการทิ้งขยะมูลฝอย การทิ้งน้ำเสีย การระบายน้ำจากห้องเครื่องในเรือ การปล่อยทิ้งน้ำมันเครื่องลงสู่ทะเล ปัญหาฝุ่นละอองจากการขนถ่ายแป้งมันสำปะหลังและถ่านหิน สิ่งเหล่านี้ได้ส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสื่อมโทรมของระบบนิเวศชายฝั่งและคุณภาพน้ำทะเล เช่น การเกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสี ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่แสดงให้เห็นถึงความไม่สมดุลย์ของความหลากหลายทางชีวภาพและความอุดมสมบูรณ์ของแพลงก์ตอนพืช

ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของแพลงก์ตอนพืช จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้เข้าใจถึงผลกระทบจากกิจกรรมของมนุษย์ต่อระบบนิเวศชายฝั่งทางทะเล เพื่อจะได้นำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการจัดการทรัพยากรทางธรรมชาติ ตลอดจนการฟื้นฟูสภาพความเสื่อมโทรมของทรัพยากรทางทะเลในบริเวณดังกล่าวต่อไป

วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและการเปลี่ยนแปลงแทนที่ในชุมชนแพลงก์ตอนพืชบริเวณชายฝั่งศรีราชา-สีชัง จังหวัดชลบุรี

2.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแพลงก์ตอนพืชและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

2.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์แบบอัลเลโลพาธีระหว่างแพลงก์ตอนพืช

วิธีการศึกษา

1. ความหลากหลายและความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช

1.1 พื้นที่ศึกษาและระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง

ได้ทำการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชบริเวณชายฝั่งศรีราชา-สีชัง จังหวัดชลบุรี จำนวน 11 สถานี ในเดือนตุลาคม 2551 เดือนธันวาคม 2551 เดือนมีนาคม 2552 และเดือนพฤษภาคม 2552

1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้กระบอกเก็บน้ำ Van Dorn 20 ลิตร โดยเก็บตัวอย่างสถานีละ 2-3 ระดับความลึก (ขึ้นอยู่กับความลึกของน้ำ) โดยที่ผิวน้ำประมาณ 0.5 เมตร กลางน้ำประมาณ 2-2.5 เมตร และที่ท้องน้ำประมาณ 10-15 เมตร โดยแต่ละระดับความลึกจะเก็บตัวอย่าง 2 ซ้ำ และนำไปกรองด้วยถุงกรองแพลงก์ตอนพืชขนาดตา 20 ไมครอน และนำไปรักษาสภาพด้วยฟอร์มาลิน 1 % โดยปริมาตร

1.3 การจำแนกและคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช

จำแนกตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชในระดับสกุล และคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช โดยนับจำนวนแพลงก์ตอนพืชโดยใช้ Sedgewick Rafter slide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

– 1.4 ค่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

ในแต่ละสถานี จะวัดความลึก การส่องผ่านของแสง อุณหภูมิ ความเค็ม การละลายของออกซิเจนในน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง และจะเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อไปวิเคราะห์หาค่า แอมโนเนีย ไนไตร์ท ไนเตรท ฟอสเฟต และซิลิเกต โดยใช้วิธีสเปคโตรโฟโตรเมทรี

1.5 ความสัมพันธ์ระหว่างแพลงก์ตอนพืชและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

ข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพและความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช จะนำไปหาความสัมพันธ์กับค่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

2. การเปลี่ยนแปลงแทนที่ของแพลงก์ตอนพืช

2.1 พื้นที่ศึกษาและระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง

จะได้ทำการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชในช่วงฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ ในเดือนตุลาคม 2553 - เดือนมกราคม 2554 และในช่วงฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ในเดือนพฤษภาคม 2554 – เดือนสิงหาคม 2554 โดยจะเก็บตัวอย่างในบริเวณที่ใกล้กับแหล่งชุมชนบนเกาะสีชังและเป็นบริเวณที่มักเกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสี จำนวน 1 สถานี โดยจะเก็บสัปดาห์ละหนึ่งครั้ง ยกเว้นในกรณีที่เกิดปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสีจะเก็บตัวอย่างทุกวัน

2.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง การจำแนกและคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช ค่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และความสัมพันธ์ระหว่างแพลงก์ตอนพืชและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม จะได้ดำเนินการเหมือนในข้อ 1

3. ความสัมพันธ์แบบอัลเลโลพาธีระหว่างแพลงก์ตอนพืช

จะได้ทำการทดลองเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาถึงผลของสารอาหารและความสัมพันธ์แบบอัลเลโลพาธีระหว่างแพลงก์ตอนพืช ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแทนที่ในชุมชนของแพลงก์ตอนพืช ซึ่งจะทำการศึกษาโดย

3.1 แยกและเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช

ตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชจะถูกเก็บจากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง เพื่อมาแยกแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นและชนิดรอง และเพาะเลี้ยงเพื่อเตรียมไว้เป็นหัวเชื้อสำหรับทำการทดลองต่อไป

3.2 ทดลองความสามารถในการแข่งขันของแพลงก์ตอนพืช

จะทำการทดลองเพื่อหาอัตราการดูดซึมสารอาหารสูงสุดของแพลงก์ตอนพืชแบบชนิดเดี่ยว โดยทดลองเลี้ยงด้วยไนเตรท ฟอสเฟต และซิลิเกตที่มีความเข้มข้นต่างกัน

3.3 ทดลองความสัมพันธ์แบบอัลเลโลพาธีระหว่างแพลงก์ตอนพืช

จากข้อมูลในข้อ 3.2 จะนำไปใช้ทดลองเลี้ยงแพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นและชนิดรองร่วมกัน เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของแพลงก์ตอนพืชทั้งสองชนิด โดยการเปรียบเทียบความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชทั้งสองชนิด

ผลการศึกษา

1. การจำแนกและนับตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช ประจำเดือนตุลาคม 2551

1.1 จากการจำแนกและนับตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช พบแพลงก์ตอนพืช 2 ไฟลัม คือ Cyanophyta = 48.34% และ Chromophyta = 51.66%

1.2 Cyanophyta สกุลที่พบมากที่สุด คือ *Oscillatoria* = 45.71%

1.3 Chromophyta พบกลุ่ม Dinoflagellate = 1.51% และกลุ่ม Diatom = 50.1 %

1.4 Diatom ที่พบเป็นสกุลเด่น คือ *Thalassionema* ชนิด *T. frauenfeldii* = 22.89 % และ *T. nitzschioides* = 11.36 % และสกุล *Bacteriastrum* ชนิด *B. hyalinum* = 6.03 % และ *B. delicatulum* = 1.67 %

1.5 เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชจากแต่ละสถานี พบว่าสถานีที่มีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชสูงสุด คือ สถานีที่ 4 รองลงมา คือ สถานีที่ 2 ส่วนบริเวณที่มีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชต่ำสุด คือ สถานีที่ 1

1.6 จากการคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช พบว่ามีความหนาแน่นเฉลี่ย = 90,274.86 เซลล์/ลิตร

2. การจำแนกและนับตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช ประจำเดือนธันวาคม 2551

2.1 จากการจำแนกและนับตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช พบแพลงก์ตอนพืช 2 ไฟลัม คือ Cyanophyta = 52.89 % และ Chromophyta = 47.11%

2.2 Cyanophyta สกุลเด่น คือ *Oscillatoria* = 40.97 % รองลงมา คือ *Pseudanabaena* = 11.14 %

2.3 Chromophyta พบกลุ่ม Diatom = 46.41 % และกลุ่ม Dinoflagellate = 0.7 %

2.4 Diatom สกุลเด่น คือ *Thalassionema* ชนิด *T. frauenfeldii* = 7.59 %, *T. nitzschioides* = 7.02 %, *Pseudo-nitzschia* = 8.22 %, *Chaetoceros* = 6.16 % และ *Gyrosigma / Pleurosigma* = 4.81 %

2.5 เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชจากแต่ละสถานี พบว่า สถานีที่มีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชสูงสุด คือ สถานีที่ 6 รองลงมา คือ สถานีที่ 11 และสถานีที่มีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชต่ำสุด คือ สถานีที่ 3 และสถานีที่ 5

2.6 จากการคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช พบว่ามีความหนาแน่นเฉลี่ย = 9,691.74 เซลล์/ลิตร

3. การจำแนกและนับตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช ประจำเดือนมีนาคม 2552

3.1 จากการจำแนกและนับตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช พบแพลงก์ตอนพืช 2 ไฟลัม คือ Cyanophyta = 41.58 % และ Chromophyta = 58.42%

3.2 Cyanophyta สกุลเด่น คือ *Oscillatoria* = 34.57 % รองลงมา คือ *Pseudanabaena* = 7.01%

3.3 Chromophyta พบกลุ่ม Diatom = 50.41 % และกลุ่ม Dinoflagellate = 7.97 %

3.4 Diatom สกุลเด่น คือ *Pseudo-nitzschia* = 19.56 %, *Chaetoceros* = 6.39 %, *Thalassionema* ชนิด *T. frauenfeldii* = 2.3 %, *T. nitzschioides* = 3.32 %

3.5 เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชจากแต่ละสถานี พบว่า สถานีที่มีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชสูงสุด คือ สถานีที่ 3 รองลงมา คือ สถานีที่ 11 ซึ่งทั้ง 2 สถานีเป็นสถานีที่อยู่ใกล้กับชายฝั่งศรีราชา สำหรับสถานีที่มีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชต่ำสุด คือ สถานีที่ 5 ซึ่งเป็นสถานีที่อยู่ใกล้เกาะสีชัง

3.6 จากการคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช พบว่ามีความหนาแน่นเฉลี่ย = 26,405.47 เซลล์/ลิตร

4. การจำแนกและนับตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช ประจำเดือนพฤษภาคม 2552

4.1 จากการจำแนกและนับตัวอย่างแพลงก์ตอนพืช พบแพลงก์ตอนพืช 2 ไฟลัม คือ Cyanophyta = 84.03 % และ Chromophyta = 15.97%

4.2 Cyanophyta สกุลเด่น คือ *Oscillatoria* = 82.83 %

4.3 Chromophyta พบกลุ่ม Diatom = 13.24 % และกลุ่ม Dinoflagellate = 2.73 %

4.4 Diatom สกุลเด่น คือ *Thalassionema* ชนิด *T. frauenfeldii* = 2.53 %, *T. nitzschioides* = 3.12 % และ *Chaetoceros* = 3.88 %

4.5 เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชจากแต่ละสถานี พบว่า สถานีที่มีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชสูงสุด คือ สถานีที่ 2 รองลงมา คือ สถานีที่ 1 สำหรับสถานีที่มีความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชต่ำสุด คือ สถานีที่ 4

4.6 จากการคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืชพบว่ามีความหนาแน่นเฉลี่ย = 142,420.71 เซลล์/ลิตร

สรุปผลและวิจารณ์

จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชในรอบฤดูมรสุมเป็นเวลา 1 ปี พบแพลงก์ตอนพืช 2 ไฟลัม คือ Cyanophyta และ Chromophyta โดย Cyanophyta สกุลเด่น คือ *Oscillatoria* ส่วน Chromophyta สกุลเด่น คือ *Thalassionema* และจากการคำนวณความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช พบว่าในเดือนพฤษภาคม 2552 ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้เป็นเดือนที่มีความหนาแน่นเฉลี่ยของแพลงก์ตอนพืชสูงสุด และในเดือนธันวาคม 2551 ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือเป็นเดือนที่มีความหนาแน่นเฉลี่ยของแพลงก์ตอนพืชต่ำสุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและความหนาแน่นของแพลงก์ตอนพืช ทำให้ทราบถึงสถานการณ์ด้านความหลากหลายทางชีวภาพและความอุดมสมบูรณ์ของแพลงก์ตอนพืชบริเวณชายฝั่งศรีราชา-สีชัง ในปัจจุบัน ซึ่งเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในอดีต จะทำให้ทราบถึงแนวทางการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชในบริเวณดังกล่าว และเมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างแพลงก์ตอนพืชและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม อาจจะทำให้สามารถทำนายสถานการณ์ด้านความหลากหลายทางชีวภาพของแพลงก์ตอนพืชในอนาคตได้

เอกสารอ้างอิง

Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, ARRI. 2009. Sichang Project. Available from: http://sichang.topcities.com/ [2009, August 1]

Aubry, F.B., Berton, A., Bastianin, M., Socal, G., and Acri, F. 2004. Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990-1999). Continental Shelf Research 24: 97-115.

Baek, S.H., Shimode, S., Kim, H., Han, M., and Kikuchi, T. 2009. Strong bottom-up effects on phytoplankton community caused by a rainfall during spring and summer in Sagami Bay, Japan. Journal of Marine Systems 75: 253-264.

Benjatheprasamee, P. 2008. Study of fishery: case study in human community at Sichang, Chonburi province in 2008. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

Casas, B., Varela, M., and Bode, A. 1999. Seasonal succession of phytoplankton species on the coast of A Coruna (Galicia, northwest Spain). Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 15: 413-429.

Chen, C., Shiah, F., Chung, S., and Liu, K. 2006. Winter phytoplankton blooms in the shallow mixed layer of the South China Sea enhanced by upwelling. Journal of Marine Systems 59: 97-110.

Cloern, J.E., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. Mar. Ecol. Prog. Ser. 210: 223-253.

Domingues, R.B., Barbosa, A., and Galva, H. 2005. Nutrients, light and phytoplankton succession in a temperate estuary (the Guadiana, south-western Iberia). Estuarine, Coastal and Shelf Science 66: 249-260.

Graneli, E., and Hansen, P.J. 2006. Ecology of harmful algae. Springer.

Graneli, E., and Pavia, H. 2006. Allelopathy: Allelopathy in marine ecosystems. Springer.

Graneli, E., Weberg, M., and Salomon, P.S. 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. Harmful Algae 8: 94-102.

International Allelopathy Society, IAS. 1996. First world congress on allelopathy. A science for the future. Available from: http://www-ias.uca.es/bylaws.htm#CONSTI. [2009, August 1]

Junkaew, A. 2009. Biodiversity of phytoplankton in the area of Had Thum Pang, Sichang, Chonburi province. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

Kaewngen, R. 2008. Study of phytoplankton (diatom) and water quality in human community, traveling and natural areas at Sichang, Chonburi province. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

Late, S. 2007. Study of plankton in coastal ecosystem at Tha Wang, Sichang, Chonburi province. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

Liu, D., Sun, J., Zou, J., and Zhang, J. 2005. Phytoplankton succession during a red tide of *Skeletonema costatum* in Jiaozhou Bay of China. Marine Pollution Bulletin 50: 91-94.

Lobban, C.S., Chapman, D.J., and Kremer, B.P. 1988. Experimental Phycology: a laboratory manual. Cambridge University Press.

Lopes, C.B., Lillebo, A.I., Dias, J.M., Pereira, E., Vale, C., and Duarte, A.C. 2006. Nutrient dynamics and seasonal succession of phytoplankton assemblages in a Southern European Estuary: Ria de Aveiro, Portugal. Estuarine, Coastal and Shelf Science 71: 480-490.

Onkol, C. 2007. Total petroleum hydrocarbon and oil in the sea around Sichang, Chonburi province. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

Parsons, T.R., Maita, Y., and Lalli, C.M. 1984. A Manual of chemical and Biological methods for seawater analysis. Pergamon Press.

Paul, J.T., Ramaiah, N., and Sardessai, S. 2008. Nutrient regimes and their effect on distribution of phytoplankton in the Bay of Bengal. Marine Environmental Research 66: 337-344.

Pielou, E.C. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. Journal of Theoretical Biology 13: 131–144.

Purgsaard, S. 2007. Study of phytoplankton and zooplankton in marine ecosystem in the area of Leam Ngu, Sichang, Chonburi province. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

Puttarn, P. 2007. Study of plankton in coastal ecosystem in the area of Had Tha Bon, Sichang, Chonburi province. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

Ratanamongkon, S. 2007. Study of phytoplankton and zooplankton in marine ecosystem at Had Sai Kaew, Sichang, Chonburi province. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

Shannon, C.E., and Weaver, W., 1963. The Mathematical Theory of Communications. University of Illinois Press.

Shipe, R.F., Leinweber, A., and Gruber, N. 2008. Abiotic controls of potentially harmful algal blooms in Santa Monica Bay, California. Continental Shelf Research. 28: 2584-2593.

Sournia, A. 1978. Phytoplankton Manual. UNESCO.

Tameishi, M., Yamasaki, Y., Nagasoe, S., Shimasaki, Y., Oshima, Y., and Honjo, T. 2009. Allelopathic effects of the dinophyte *Prorocentrum minimum* on the growth of the bacillariophyte *Skeletonema costatum*. Harmful Algae 8: 421-429.

Tomas, C.R. 1996. Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. Academic Press.

Wichairahad, W. 2007. Study of phytoplankton and zooplankton in marine coastal ecosystem in the area of Had Thum Pang, Sichang, Chonburi province. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

Wongsuwan, P. 2008. Study of physical factors on phytoplankton diversity in the area of Assadang bridge and Tha Panurungsi, Sichang, Chonburi province. Karuvichai TRF. The Thailand Research Fund.

The final report

Title

The Development of Graduate Researchers in Biodiversity (part 2)

Research Program on the Conservation and Utilization of Biodiversity (2005 - 2010)

by

The Center of Excellence in Biodiversity, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

October 2009 – September 2010

ภาคผนวก ช

ลำดับที่ 1



บทคัดย่อ :
โครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2552

Abstracts : Research and Thesis 2009

BIOTEC
NSTDA

Relationships between the population dynamics of the blue-swimming crab and seagrass beds in Khung Krabaen Bay, Chantaburi province

Kusol Raungprataungsuk*, Nantana Gajaseni and Nittharatana Paphavasit
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
**E-mail:geosesarma@hotmail.com*

Seagrass beds in coastal ecosystems play an important role as nursery grounds and habitat for marine animals, particularly the blue-swimming crab *(Portunus pelagicus)* which is an economic species in this country. Currently, the crab population is decreasing rapidly due to many factors particularly the degradation of seagrass beds. Khung Krabaen Bay was selected as a study site because two species of seagrasses, namely *Enhalus acoroides* and *Halodule pinifolia*, grow there. This bay historically has had a high blue-swimming crab fishery production and provides economic returns to the local fishermen. Therefore, this study aims to explore relationships for further setting up a sustainable management plan. Samples were collected monthly between April 2008 and March 2009. A total of 42 collapsible crab traps (mesh size equal to 1 and 2 cm) were used to collect crabs in both the daytime and the night-time in 4 patches of *E. acoroides*, 2 patches of *H. pinifolia*, and 1 area without seagrass cover as a control station. Crabs were sexed and weighed and carapace widths were measured. Thereafter, they were separated into 2 development stages as juvenile and mature. The sex ratio of males to females was 1:0.50. Carapace width ranged from 10-130 mm. The relationships between carapace width and weight were $W_{male} = 0.0001CW^{2.8264}$ and $W_{female} = 0.0002CW^{2.7859}$. Moreover, the juvenile crab had a correlation with *H. pinifolia* in the daytime at $P < 0.05$. In conclusion, this bay is facing a declining blue-swimming crab population.

ลำดับที่ 2



บทคัดย่อ :
โครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2552

Abstracts : Research and Thesis 2009

BIOTEC
สวทช NSTDA

Assessment of stock and movement patterns for sustainable management of the blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): A case study in Kung Krabaen bay, Chantaburi province, Thailand

Chutapa Kunsook*, Nantana Gajaseni and Nitharat Paphavasithi
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
**E-mail: chutapa9@hotmail.com*

The blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758), an important economic species for domestic consumption and export, is now in crisis due to a combination of fishing pressure and coastal nursery habitat destruction. Data from the Fishery Department showed that, between 2000 and 2007, total crab production was reduced from 40,000 to 20,000 tonne/year. Kung Krabaen Bay, one of the important blue swimming crab habitats that acts as a nursery ground area, is now facing this crisis. Unfortunately, the local government has no policy to solve this crisis. In terms of scientific study, there has been little research conducted on stock structure and movement patterns of the crab. Therefore, there is a need to explore conflict resolution by using the scientific method to allow better understanding among stakeholders. This study aims at: i) assessing stock of this crab; ii) studying movement patterns and spawning habitat using a marking technique; and iii) analysing current management of the crab fishery in order to propose an appropriate sustainable management strategy for the bay. Field study and laboratory experiments will be designed and conducted based on:

i) biological and ecological study including stock assessment, reproductive biology, natural diet, population structure, abundance and distribution, especially movement patterns. Laboratory experiments will be set up to study tagging effectiveness. Then crabs will be tagged, released and recaptured at the study site. Socio-economic data relating to the crab fishery will be collected.

ii) A workshop will be conducted with stakeholders for exploring the collective action for appropriate sustainable management of the crab in the bay.

ลำดับที่ 3



บทคัดย่อ :
โครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2552
Abstracts : Research and Thesis 2009

โครงการพัฒนาบุคลากรด้านการวิจัยและวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาด้านเทคโนโลยีชีวภาพ
การวิจัยการพัฒนาและนวัตกรรมด้านเทคโนโลยีชีวภาพในประเทศไทย

Genetic diversity of the rice field frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiengmann, 1835), in natural habitats in Thailand by mitochondrial DNA (12S rRNA and cytochrome-b sequences)

Anusorn Pansook*, Wichase Khonsue, Sanit Piyapatanakorn and Putsatee Pariyanonth
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
**E-mail: amphibianchula@yahoo.com*

The rice Field Frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) belongs to the family Ranidae, genus *Hoplobatrachus*. It can be found from East Asia to throughout the Thai-Malay peninsula. Recently, the population of this frog in its natural habitat has been found to be decreasing because of habitat destruction, pollution, pesticide usage, hunting and climate change. To study the genetic diversity, we sampled rice field frogs from 4 regions in Thailand: 1) the Northeastern montane region (Nan and Tak provinces), 2) the Thai-Lao dry plateau (Sakhon Nakhon, Udon Thani, Mukdahan, Nakhon Ratchasima and Ubon Ratchathani provinces), 3) the Southeast Asian lowlands (Chonburi, Sa-Kaew, Chanthaburi, Trad, Nakhon Nayok and Phetchaburi provinces) and 4) Tenasserim and the Malay peninsula (Chumphon, Phang-nga and Songkhla provinces). DNA was extracted from each sample. Segments of mitochondrial 12S rRNA and cytochrome-b genes were amplified and the nucleotide sequences of these genes were analyzed. Comparisons of the 12S rRNA and cytochrome-b sequences indicates that the rice field frog population in Thailand can be grouped into two major clades: 1) those from the Southeast Asian lowlands, Tenasserim-Malay peninsula and the Northeastern montane region (Tak province), and 2) those from the Thai-Lao dry plateau, Southeast Asian lowlands (Trad, Sa-Kaew and Chathaburi Provinces), Tenasserim-Malay peninsula (Chumphon province) and Northeastern montane region (Nan province).

ลำดับที่ 4



บทคัดย่อ :

โครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2552

Abstracts : Research and Thesis 2009

โครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ด้านไบโอเทค
ภายใต้แผนการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ

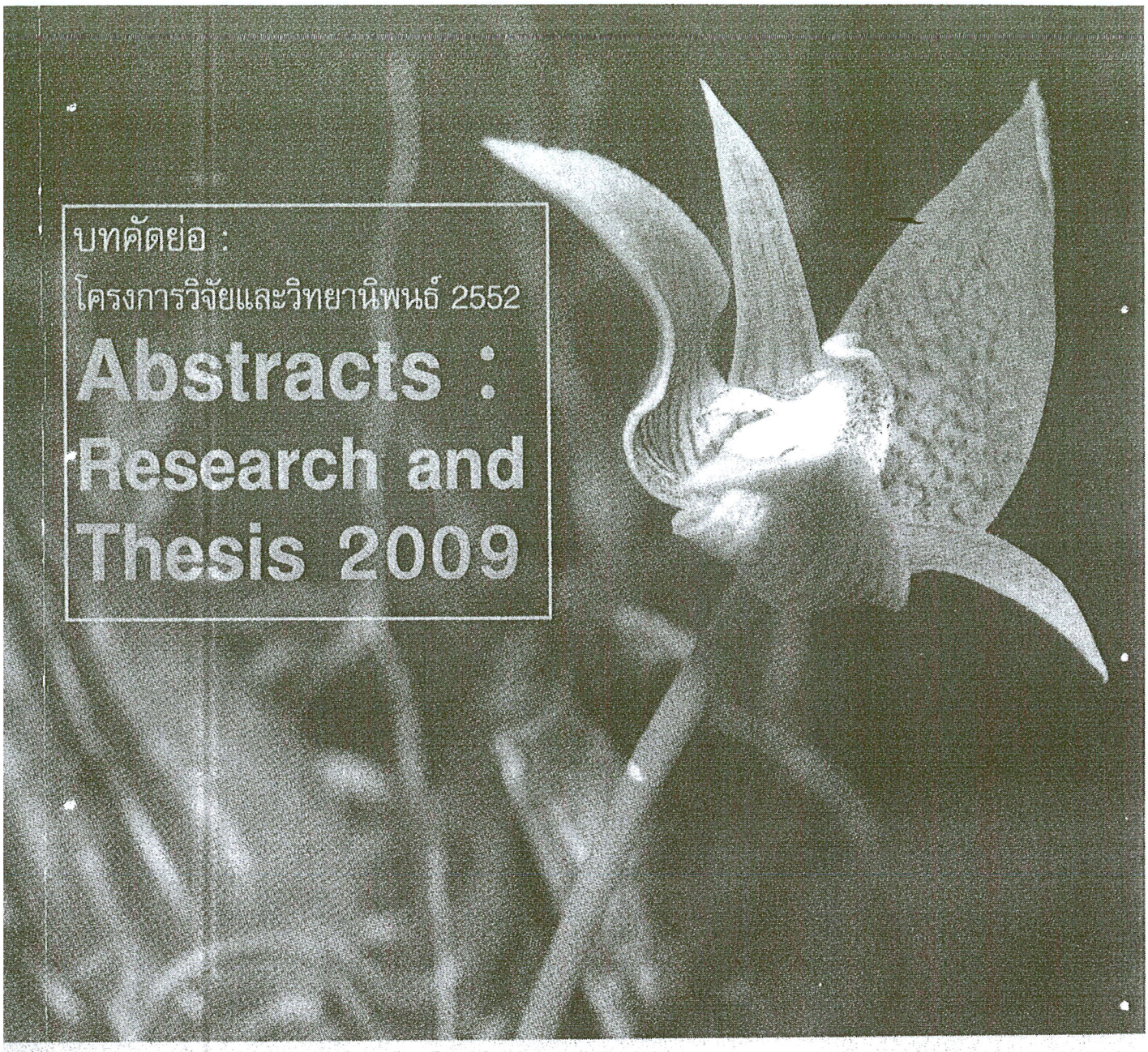
Vertical distribution and diets of the Median-striped bullfrog, *Kaloula mediolineata* (Smith, 1917), in Sam Ngao district, Tak province

Kan Nitiroj* and Wichase Khonsue
*Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, *E-mail: nitiroj_k@yahoo.com*

The vertical distribution and diet composition of the Median-striped bullfrog, *Kaloula mediolineata* (Smith, 1917), were studied in Sam Ngao district, Tak province, Thailand, from July 2006 to June 2007. The results show that the average depth of frog burrows in the dry months (December 2006 to March 2007, average = 56.60 mm, N = 75) was significantly deeper than wet months (July to November, 2005 April to June, 2006, average = 31.59 mm, N = 140). Significantly negative correlations were observed when comparing the vertical distribution to the following physical factors: soil surface moisture (R = -0.298; p = 0.000), relative humidity (R = -0.249; p = 0.000) and air temperature (R = -0.213; p = 0.002).

Moreover, diet composition was analyzed. The results show that only empty stomachs were observed during the dry months, whereas during the wet months, empty stomachs were observed in 42.9% of specimens. The main food items were ants (Order Hymenoptera, Family Formicidae), termites (Order Isoptera) and beetles (Order Coleoptera). The stomach contents were similar in both female and male frogs (Simple Similarity Index between 0.91-0.99). Furthermore, a relationship between diet and prey availability was observed (tau = 0.469, p = 0.046). In conclusion, the results suggest that the Median-striped Bullfrog is a generalist predator which is active in the wet months, and that ants, termites and beetles are the main food-sources of the frog.

ลำดับที่ 5



บทคัดย่อ :
โครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2552

Abstracts : Research and Thesis 2009

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศักยภาพในการ
การจัดการความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพไทย

BIOTEC
สวทช NSTDA

Effects of atrazine on the early development and gonad development of the rice field frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (wiegmann, 1834)

Kritsada Katawutpoonphan* and Orawan Satayalai
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, E-mail: kbubio@hotmail.com

Agrochemical and chemical contamination of the environment are considered to be disastrous causes of amphibian declines. Atrazine is generally applied in the rainy season when amphibians are congregating; therefore, frogs either in agricultural fields or adjacent wetlands could be exposed to atrazine. This study was designed to determine the effects of atrazine on the embryonic and larval development of the rice field frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834), a common frog species in Thailand. The first part was to determine the normal embryonic and larval developmental of *H. rugulosus* to find out the time period of each developmental stage for the following experiments. The second part was to determine the effects of atrazine on early development of *H. rugulosus*. The early embryos at the mid-blastula stage were treated with ecologically relevant nominal concentrations, *i.e.*, 0.001, 0.01, 0.1, 10, 100, and 1,000 ppb, using the FETAX protocol. The results showed that the nominal concentrations of atrazine used in this experiment did not cause significant statistical effects ($p<0.05$) on mortality rate, snout-vent length and developmental abnormalities, even though certain abnormalities, *i.e.*, tail flexure and abdominal edema, were found in all treatment groups (except 0.01 ppb). The last part was to determine the effects of atrazine on gonad development and later developmental stages. The early embryos were treated with nominal concentrations of atrazine, *i.e.*, 0.001, 0.01, 0.1, 10, 25, 100, and 1,000 ppb, respectively. The embryos were treated with atrazine until the animal completed metamorphosis. The results showed that nominal concentrations of atrazine did not cause any effects on metamorphosis and gonad development of *H. rugulosus* ($p<0.05$). In conclusion, it is suggested that pure atrazine at ecologically relevant concentrations was not capable of causing direct effects on *H. rugulosus* development under laboratory conditions.

ลำดับที่ 6



บทคัดย่อ :
โครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2552

Abstracts : Research and Thesis 2009

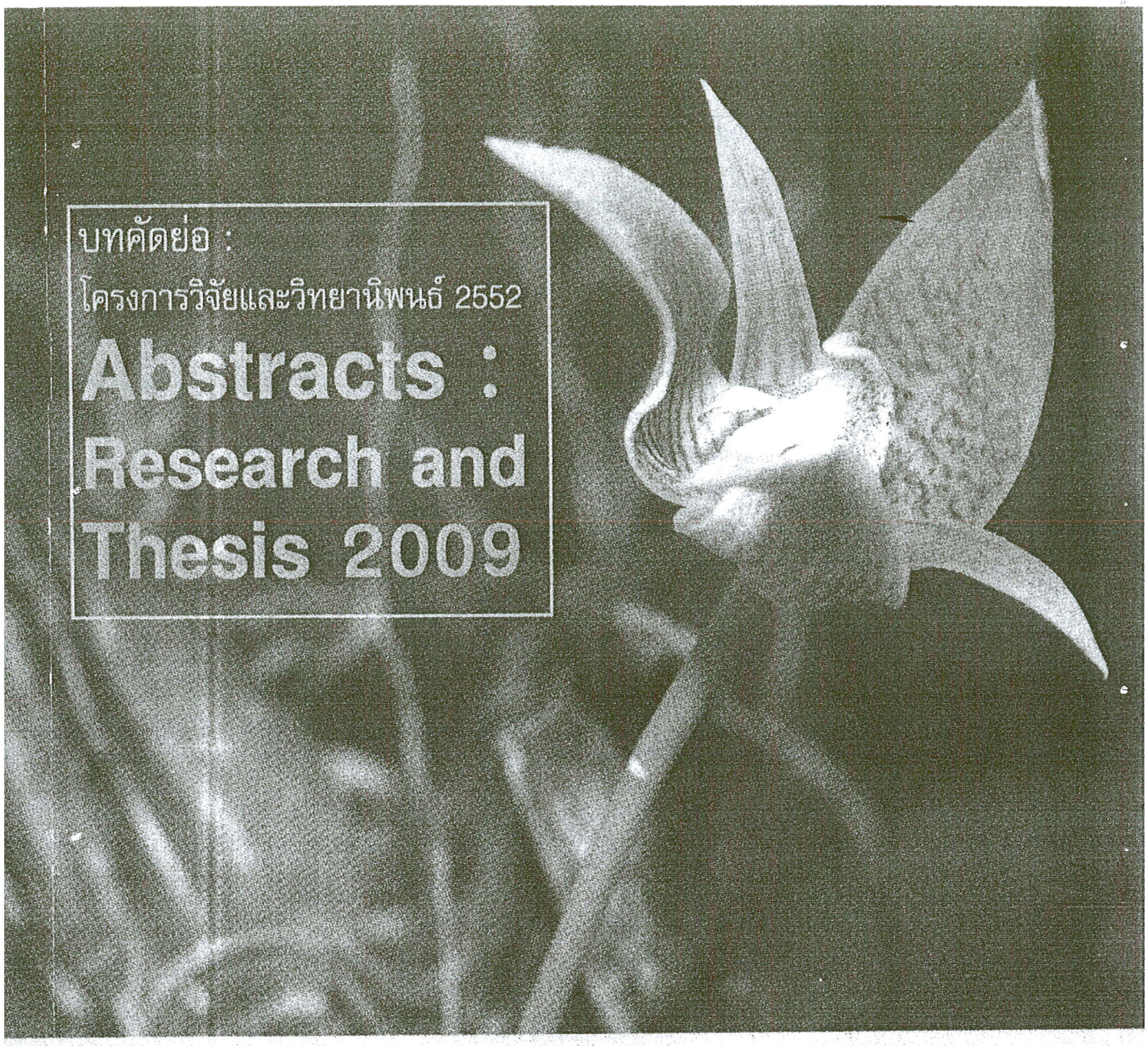
BIOTEC NSTDA

Seasonal activity of amphibians in Nam San Noi stream, Phuluang wildlife Sanctuary

Ratchata Phochayavanich[1,*], *Harold K. Voris*[2] *and Kumthorn Thirakhupt*[1]
[1]*Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
[2]*Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois, U.S.A.*
**E-mail: rphochayavanich@yahoo.com*

Seasonal activity of amphibians in Nam San Noi stream, Phuluang Wildlife Sanctuary, was studied from May 2006 to May 2007. Night visual encounter surveys were conducted on three 100 m stream transects at each of three elevations, 800, 950, and 1250 m. Each stream transect was surveyed once a month. Species and numbers of amphibians found in each survey were recorded. A total of 22 species was found during the survey period. The species diversity in the wet season was higher than in the dry season at all three elevations. The similarity index indicated that species composition between seasons at 1250 m were similar, whereas at 800 and 950 m they differed. The total abundance of all species and abundances of the 6 most common species had significant differences between the wet and dry seasons. The abundances of *Odorrana aureola* and *Odorrana chloronota* were high during the wet season while the numbers of *Limnonectes gyldenstolpei, Hylarana nigrovittata, Aquixalus bisacculus,* and *Microhyla berdmorei* and total abundance of all species peaked in the dry season. The highest abundances of the most common species were found to be associated with breeding activity. Canonical Correspondence Analysis (CCA) indicated that the year-round abundances of most amphibians at different elevations were associated with stream size, water temperature, and substrate temperature whereas the variations in amphibian abundance between seasons at each elevation were associated with relative humidity, water temperature, air temperature, substrate temperature, and stream width.

ลำดับที่ 7



บทคัดย่อ :

โครงการวิจัยและวิทยานิพนธ์ 2552

Abstracts : Research and Thesis 2009

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และสื่อการเรียนการสอนเพื่อการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

BIOTEC

สวทช NSTDA

A recent survey of the big–headed turtle, *Platysternon megacephalum*, Gray 1831 in Thailand

***Kruewan Pipatsawasdikul*[1,*], *Harold Knight Voris*[2] *and Kumthorn Thirakhupt*[1]**
[1]*Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*
[2]*Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois, U.S.A.*
**E-mail: kwanwongkom@yahoo.com*

Platysternon megacephalum Gray, 1831was recently surveyed in Thailand from December 2006 to April 2009. The study confirms the occurrence of *P. megacephalum* in ten river basins in northern, northeastern, central and western Thailand. Among these, many new localities with elevations between 430–1,350 m asl were reported. *P. megacephalum* was mostly found in small flowing mountain streams in dry dipterocarp forest and montane rain forest. Its populations face serious threats from habitat loss, human consumption and commercial harvest of turtles. This species urgently needs a proper conservation action.

ลำดับที่ 8

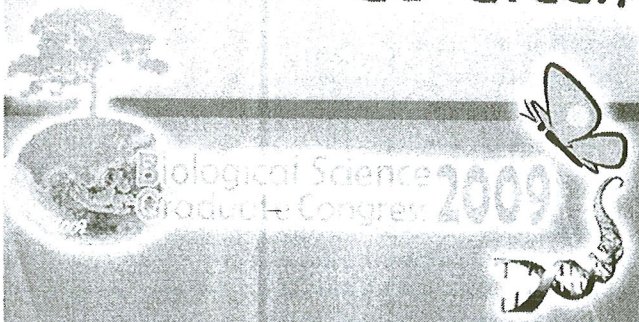
Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUS National University of Singapore

UNIVERSITY OF MALAYA
KUALA LUMPUR

The 14th Biological Sciences Graduate Congress

" Go Green ,Grow Science Together "



Program and Abstracts

December 10-12, 2009

Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

Hosted by :

Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

In Collaboration with :

Department o Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA

Sponsored by :

สวทช NSTDA *National Science and Technology Development Agency, THAILAND*

BDV-OR 07

Relationships between population dynamics of blue swimming crab and seagrass bed in Khung Krabaen Bay, Chanthaburi Province

Raungprataungsuk, K.[1], Gajaseni, N.[1], Paphavasit, N.[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

E-mail: geosesarma@hotmail.com

Seagrass bed in a coastal ecosystem plays an important role as a nursery ground and a habitat of marine animals particularly the blue swimming crab *(Portunus pelagicus)* as an economic species of the country. Nowadays, this crab population is decreasing rapidly due to many factors particularly the degradation of seagrass bed. Khung Krabaen Bay was selected as a study site because two species of seagrasses, namely *Enhalus acoroides* and *Halodule pinifolia*, have grown there. This bay historically has a high blue-swimming crab fishery production and provides economic value to the local fishermen. Therefore, this study aims to explore relationships for further setting up the sustainable management plan. Samples were collected monthly between April 2008 and March 2009. Total of 42 collapsible crab traps (mesh size equal to 1 and 2 cm) were used to collect crab in both daytime and nighttime in 4 patches of *E. acoroides*, 2 patches of *H. pinifolia*, and 1 area without seagrass cover as control station. Crabs were also identified sex and measured carapace width and weight. Thereafter, they were separated into 2 development stages as juvenile and mature. The sex ratio of male to female was 1:0.50. It also found that the carapace width ranged from 10-130 mm. The relationships between carapace width and weight were $W_{male} = 0.0001CW^{2.8264}$ and $W_{female} = 0.0002CW^{2.7859}$. Moreover, the juvenile crab has a correlation with *H. pinifolia* on daytime at $P < 0.05$. In conclusion, this bay is facing a declining of blue-swimming crab population.

ลำดับที่ 9

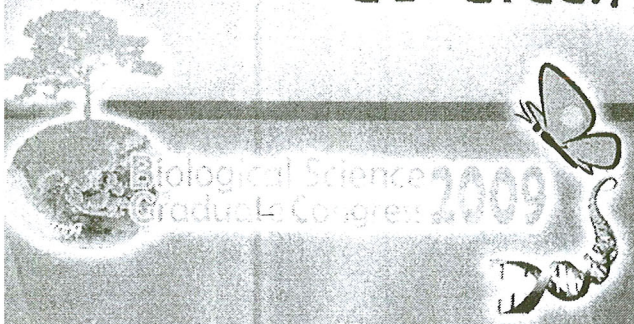
Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUS National University of Singapore

UNIVERSITY OF MALAYA
KUALA LUMPUR

The 14th Biological Sciences Graduate Congress

" Go Green ,Grow Science Together "



Program and Abstracts

December 10-12, 2009

Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

Hosted by :

Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

In Collaboration with :

Department o Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA

Sponsored by :

สวทช NSTDA *National Science and Technology Development Agency, THAILAND*

BDV-OR 33

Preliminary report on influences of check dam on amphibian assemblage along distance gradient from the stream edges in the deciduous forest in Nan province, Thailand

Ratchata Phochayavanich[1, 2], Wichase Khonsue[2], Noppadon Kitana[2, *]

[1]Biological Science Ph.D. Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Bangkok 10330, Thailand. **E-mail: voice_of_anura@hotmail.com**

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Bangkok 10330, Thailand. *Corresponding author: noppadon.k@chula.ac.th

Recently, numerous check dams constructed across stream have been built in Thailand to extend the hydroperiod and allow more moisture to be dissipated from the stream to the adjacent area. Many environmental factors are known to be changed after the construction, especially soil moisture content along edges of the stream. However, there are few reports on the vertebrate assemblage and distribution near the check dam. Among terrestrial vertebrate, amphibian is regarded as the most sensitive animal to moisture changes. Therefore, in this study, we aim to compare amphibian assemblage patterns along the distance gradient from the stream edges between the check dam and non-check dam areas. Eleven check dams or planned check dam construction sites were selected from two ephemeral streams in a deciduous forest at the Chulalongkorn University Forest and Research Station, Nan Province. Stream transects located between the check dams or the planned construction sites and four strip-transects located parallel to each stream transect with the perpendicular distance from the stream transect of 5, 10, 25, and 50 m were used for visual encounter surveys during May to October 2009. The amphibian assemblage patterns including the species diversity and composition will be presented. Pair-wise comparison in each transect groups along the distance gradient from the stream edges will be performed to examine check dam-related difference in amphibian assemblage. The overall effect of the check dam on amphibian assemblage pattern will be discussed.

ลำดับที่ 10

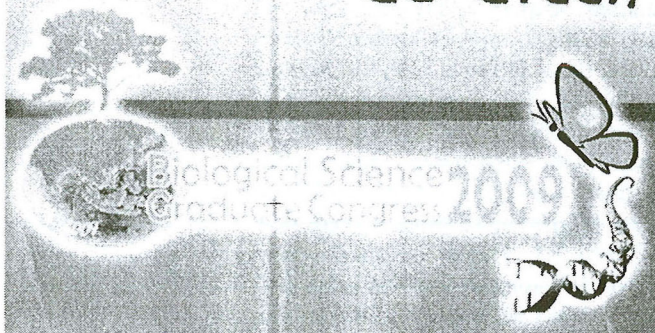
Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUS National University of Singapore

UNIVERSITY OF MALAYA
KUALA LUMPUR

The 14th Biological Sciences Graduate Congress

" Go Green ,Grow Science Together "



Program and Abstracts

December 10-12, 2009

Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

Hosted by :

Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

In Collaboration with :

Department o Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA

Sponsored by :

สวทช NSTDA *National Science and Technology Development Agency, THAILAND*

BDV-OR 24

Diversity of Mosses in Khew Mae Pan and Ang Ka Areas, Doi Inthanon National Park, Chaing Mai Province

Nathi, Y.[1], Seelanan, T.[1]

[1]Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand **E-mail: Nathi.yosita@gmail.com**

The investigation of diversity of mosses in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai province, was carried out in two representative areas, namely Khew Mae Pan and Ang Ka, during July 2007-July 2008. In total, 810 specimens of mosses were collected, comprising of 101 species in 59 genera 27 families. The moss families with the highest species was Sematophyllaceae (16 species), followed by Fissidentaceae and Meteoriaceae (10 species). Most taxa found belong to Indochines flora elements while the rest are of common Asian flora with two are worldwide distributed. One species enlisted in the ICUN red list was also found, namely *Distichophyllum carinatum* Dixon & W. E. Nicholson. It had been found that as many as 16 species of mosses were new records to Thailand, namely *Clastobryopsis brevinervis* M. Fleisch.,*Clastobryopsis planula* (Mitt.) M. Fleisch. var. *planula*, *Clastobryopsis planula* var. *delicata* (M. Fleisch.) B. C. Tan & Y. Jia, *Clastobryopsis robusta* (Broth.) M. Fleisch., *Didymodon maschalogena* (Renauld & Car-dot) Broth., *Distichophyllum carinatum* Dixon & W. E. Nicholson, *Distichophyllum collenchymatosum* Cardot., *Distichophyllum maibarae* Besch., *Distichophyllum wanianum* B. C. Tan & P. J. Lin, *Fissidens obscurus* Mitt., *Glossadelphus prostratus* (Dozy & Molk.) M. Flesich., *Meteorium subpolytrichum* (Besch.) Broth., *Oligotrichum obtusatum* Mitt., *Oligotrichum semilamellatum* (Hook. F.) Mitt, *Rhizomnium striatulum* (Mitt.) T. J. Kop., and *Warburgiella bistrumosa* (Müll. Hal.) M. Fleisch. In addition, it is suggested that *Warburgiella bistrumosa* may have wilder geographic distribution, and may no longer be an endemic to the Philippines.

ลำดับที่ 11

Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUS National University of Singapore

UNIVERSITY OF MALAYA
KUALA LUMPUR

The 14th Biological Sciences Graduate Congress

" Go Green ,Grow Science Together "

Biological Sciences Graduate Congress 2009

Program and Abstracts

December 10-12, 2009

Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

Hosted by :

Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

In Collaboration with :

Department o Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA

Sponsored by :

สวทช NSTDA *National Science and Technology Development Agency, THAILAND*

BDV-PO 06

Morphological variation of garden fence lizard, *Calotes versicolor* (Daudin, 1802) between Northern and Southern Thailand

Prakobkarn, A.[1*], Zug G. R.[2], Ngamprasertwong, T.[1], and Thirakhupt, K.[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
E-mail: *arpa_1jan@hotmail.com

[2]Department of Vertebrate Zoology, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC 20560, USA

The garden fence lizard, *Calotes versicolor* is widely distributed throughout Thailand. It was reported that the garden fence lizard had variations in mensural character, scalation and color pattern among populations. Therefore, the mensural and scalation traits of 120 adult garden fence lizards, collected from northern (n=60, i.e. Chiang Mai, Nan and Mea Hong Son Provinces) and southern Thailand (n=60, i.e. Songkhla, Ranong and Krabi Provinces), were analyzed using t-test and Principal Component Analysis (PCA). All mensural characters were transformed using Snout Vent Length (SVL) as divisor. Significant differences (t-tests, $p<0.05$) in 20 of 43 morphological characters were found between females from northern and southern Thailand and significant differences in 19 of 43 morphological characters were found between males. These characters were selected for principal component comparisons. However, PCA of males and females using the selected morphological characters showed no distinct separation between northern and southern populations.

ลำดับที่ 12

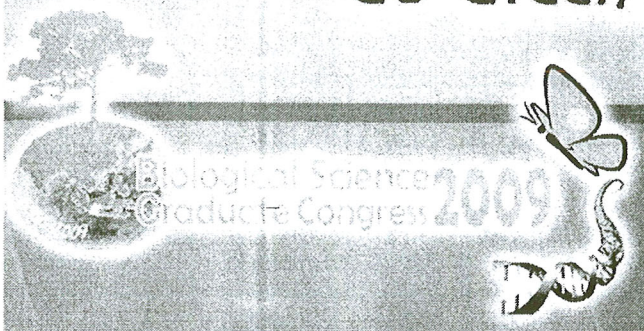
Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUS National University of Singapore

UNIVERSITY OF MALAYA
KUALA LUMPUR

The 14th Biological Sciences Graduate Congress

" Go Green ,Grow Science Together "



Program and Abstracts

December 10-12, 2009

Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

Hosted by :

Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

In Collaboration with :

Department o Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA

Sponsored by :

สวทช NSTDA *National Science and Technology Development Agency, THAILAND*

BDV-PO 02

Diet of the invasive red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) at Pathum Thani Province, Thailand

Intaraprapong, C., Aranyavalai, V. and Thirakhupt, K.
Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
E-mail: the_petaker@hotmail.com and kumthorn.t@chula.ac.th

The red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) is a popular pet. As a result, it is often released into natural or man-made aquatic habitats. At present, it establishes in many parts of the world and is considered an invasive species in many countries. In Thailand, it has been considered as an invasive animal since 2008 by the Office of Environmental Policy and Planning. To date, its dietary information in Thailand is less known. Therefore, it is necessary to study its diets for proper management in the future. It was found that the red-eared slider turtle can consume a variety of aquatic plants and animals. Adult turtles consume at least 17 species from a total of 31 aquatic plant species found in the study area. Some of the preferable species are yellow velvetleaf (*Limnocharis flava*), clover fern (*Marsilea crenata*) and water spinach (*Ipomoea aquatica*) Besides, this species consumes both aquatic invertebrates e.g heteropteran water bug (Diplonychus rusticus), water scorpion (*Ranatra sp.*) and Lanchester's freshwater prawn (*Macrobrachium lanchesteri*) and vertebrates e.g. croaking gourami (*Trichopsis vittatus*) and snakehead murrell (*Channa striata*). The result indicates that the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*) is a highly competitive animal.

ลำดับที่ 13

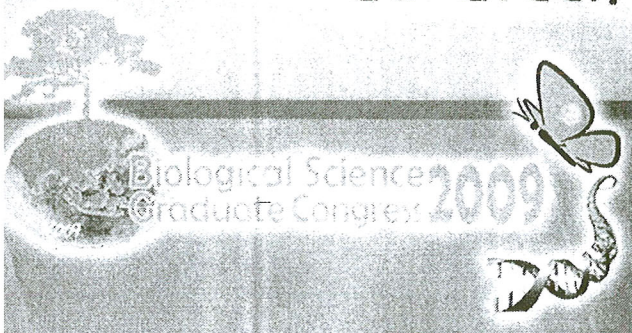
Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUS National University of Singapore

UNIVERSITY OF MALAYA
KUALA LUMPUR

The 14th Biological Sciences Graduate Congress

" Go Green ,Grow Science Together "



Program and Abstracts

December 10-12, 2009

Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

Hosted by :

Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

In Collaboration with :

Department o Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA

Sponsored by :

สวทช NSTDA *National Science and Technology Development Agency, THAILAND*

BDV-PO 05

Species diversity, distribution and habitat of the webspinners (Insecta: Embiidina) family oligotomidae in Thailand

[1]Poolprasert, P., [2]Sitthicharoenchai, D., [2]Butcher, B.A. and [2]Lekprayoon, C.

[1]Biological Science Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
E-mail: g4761008@hotmail.com

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

The species diversity, distribution and habitat of the webspinners in family Oligotomidae had been studied covering 20 provinces throughout Thailand. A total of 150 collected specimens were identified by morphological characteristics into 5 species and 2 morphospecies. *Aposthonia ceylonica*, *Oligotoma humbertiana* and *O. saundersii* are new records in Thailand found in this study. *Oligotoma humbertiana* was found only a locality at Prachuap Khiri Khan Province. The most common species which distributed over 10 provinces was *Eosembia auripicta*. Of all studied localities, the highest numbers of species (*Aphosthonia borneensis, A. ceylonica, Eosembia auripecta* and *Oligotoma saundersii*) of Oligotomidae were collected from Chiang Mai Province. Besides the common habitat of webspinners in tree bark, some were found on the rocks covered with mosses and lichens, and soils and leaves litter. This research is the first extensive study on species diversity of webspinners in Thailand. The results indicated the high diversity of this kind of insect throughout the country. Further studies on systematics and ecology need to be investigated.

ลำดับที่ 14

Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUS National University of Singapore

UNIVERSITY OF MALAYA
KUALA LUMPUR

The 14th Biological Sciences Graduate Congress

" Go Green ,Grow Science Together "





Program and Abstracts

December 10-12, 2009

Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

Hosted by :

Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

In Collaboration with :

Department o Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA

Sponsored by :

สวทช NSTDA *National Science and Technology Development Agency, THAILAND*

PHS-PO 06

The effect of exogenous ABA related to *Pro* accumulation and the role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* on salt stress in rice (*Oryza sativa* L.)

Siriporn Sripinyowanich[1,2], Teerapong Buabucha[2,3], Hongya Gu[4,5], and Supachitra Chadchawan[2]

[1]Biological Sciences Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand **E-mail: wanich_s@hotmail.com**

[2]Environment and Plant Physiology Research Unit, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

[3]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

[4]National Laboratory for Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking-Yale Joint Research Center for PlantMolecular Genetics and AgroBiotechnology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, People's Republic of China

[5]National Plant Gene Research Center (Beijing), Beijing 100101, People's Republic of China

Abscisic acid (ABA) applied exogenously at 100 μM prior to and during the salt stress period induced salt tolerance in both the salt-susceptible (LPT123) and the genetically related salt-resistant (LPT123TC171) rice lines, triggered proline (*Pro*) accumulation earlier than that by salt-stress alone, supporting a role for *Pro* as an osmoprotectant. In both rice lines, salt stress induced *OsP5CS1* gene expression, suggesting that proline accumulation occurs via *OsP5CS1* gene expression during salt stress. Under salt stress, topical ABA application induced *OsP5CS1* gene expression only in the salt-resistant line, which suggested the mode of ABA perception and/or signal transduction may play an important role in salt tolerance in rice, but up-regulated *OsP5CR* gene expression in both rice lines, suggesting that the increased proline accumulation and salt resistance induced by topical ABA application may result from the up-regulation of *OsP5CR* and not, directly at least, from *OsP5CS1*.

ลำดับที่ 15

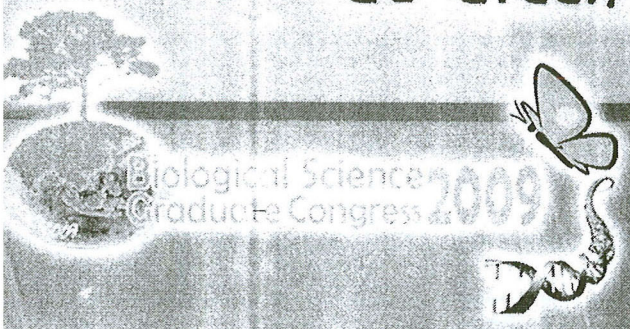
Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUS National University of Singapore

UNIVERSITY OF MALAYA
KUALA LUMPUR

The 14th Biological Sciences Graduate Congress

" Go Green ,Grow Science Together "



Program and Abstracts

December 10-12, 2009

Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

Hosted by :

Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

In Collaboration with :

Department o Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA

Sponsored by :

สวทช NSTDA *National Science and Technology Development Agency, THAILAND*

PHS-PO 07

Relationship between abscisic acid and calmodulin gene expression under salt stress in rice *Oryza sativa* L.

Saeng-ngam, S.[1,3], Warintra, T.[2], Buaboocha, T.[2,3], and Chadchawan, S.[3]

[1]Biological Science Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

[2]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

[3]Environment and Plant Physiology Research Unit, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand 10330, Thailand

E-mail: Sukhumaporns@yahoo.com

Involvement of the salt-inducible calmodulin gene, *OsCam1-1*, in the abscisic acid (ABA) biosynthesis during salt stress was studied in 'Khoa Dok Mali 105' (KDML105) rice (*Oryza sativa* L. cv. *Khoa Dok Mali 105*). The isogenic salt-resistant line of the KDML105 rice, FL530-IL, was found to accumulate three times higher level of ABA content in leaf tissues after salt stress treatment than the KDML105 rice. A twenty-four-time higher level of the *OsCam1-1* transcript was detected in the FL530-IL rice leaf after 30 minutes of salt stress, while only about seven times of the *OsCam1-1* transcript at the non-stress level was found in the KDML105 cultivar at the same period of time, when it was subjected to salt stress. The transgenic rice lines with the over-expression of *OsCam1-1* was found to up-regulate the genes involving in the ABA biosynthesis, *ABA aldehyde oxidase* (*AAO*) gene, resulting a higher level of ABA content in the transgenic lines, when compared to the wild type and the control transgenic lines without the over-expression construct. In addition, the over-expressing *OsCam1-1* transgenic plants were more tolerant to salt stress than the control plants as they exhibited better ability in maintaining the shoot and the root dry weights during salt stress. These data indicate that the *OsCam1-1* signaling has an important role in the ABA biosynthesis, and the level of both *OsCam1-1* gene expression and the ABA accumulation contribute to salt resistance in rice.

ลำดับที่ 16

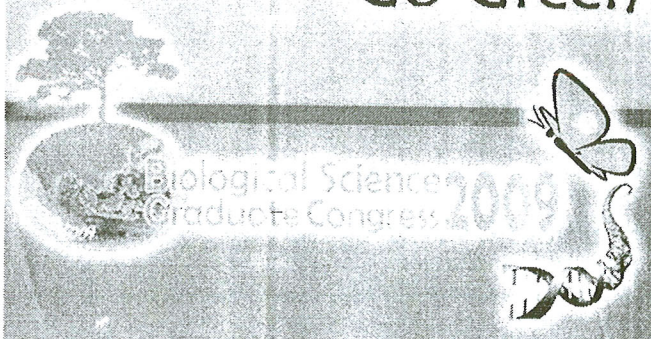
Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NUS National University of Singapore

UNIVERSITY OF MALAYA
KUALA LUMPUR

The 14th Biological Sciences Graduate Congress

" Go Green ,Grow Science Together "



Program and Abstracts

December 10-12, 2009

Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

Hosted by :

Faculty of Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, THAILAND

In Collaboration with :

Department o Biological Sciences,
National University of Singapore, SINGAPORE

Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya, MALAYSIA

Sponsored by :

สวทช NSTDA *National Science and Technology Development Agency, THAILAND*

BT-PO 18

Decolorization of pulp mill wastewater using a thermotolerant white rot fungus *Pycnoporus sanguineus*

Thikhumporn Raya[1,2], Sehanat Prasongsuk[2], Aniwat Chalermpong[2], Pongtharin Lotrakul[2], Hunsa Punnapayak[2]

[1]Biotechnology Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. **E-mail: pally_0001@hotmail.com**

[2]Plant Biomass Utilization Research Unit, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

A white rot fungus, *Pycnoporus sanguineus,* previously isolated from its habitat in Chiang Mai province, Thailand was found to be a thermotolerant strain. This fungus could produce laccase with significant activity up to 1.65 U/ml. In this investigation, *P. sanguineus* was assessed for its ability to decolourize pulp mill wastewater. The cell pellets of *the fungus* obtained from Potato Dextrose Broth were filtrated through Whatman No.1 paper and then 10 g (wet weight) of the cell pellets were aseptically transferred into 50 ml of wastewater medium supplemented with 1 % (w/v) glucose and 0.12 % (w/v) NH_4Cl in 125 ml flask. The culture was incubated for 24 hours at room temperature under shaking condition (150 rpm).Treated pulp mill wastewater was sampled every 3 hours for color detection. It was found that *P. sanguineus* was capable of decolourizing pulp mill wastewater with the highest percent decolourization at 76 % within 21 hours. Moreover, *P. sanguineus* could also reduce Chemical Oxygen Demand (COD) of pulp mill wastewater down to 13.6 %.

ลำดับที่ 17

Program & Abstracts



Commission on Higher Education Congress III

University Staff Development Consortium

(CHE - USDC Congress III)

9-11 September, 2010

Royal Cliff Grand Hotel and Spa

Species diversity, distribution and habitat of the webspinners (Embiidina: Oligotomidae) in Thailand

Pisit Poolprasert[1], Duangkhae Sitthicharoenchai[1], Buntika B. Areekul[1], and Chariya Lekprayoon[1*]
[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330*

Introduction: The webspinners are a relatively small insect order, comprised of some 300 known species, whose members mainly occur in the tropical and subtropical regions. They are interesting because of their unique features including neoteny in females and silk spinning expressed by all individuals. They have uniquely enlarged foretarsi with silk glands which are used to spin silk galleries within which the insects live gregariously. To date, very few species have been collected from Thailand, but with its biodiversity hot spot status, including the evolutionarily related Orthoptera and Plecoptera, it is plausible that a rich fauna exists.
Objectives:
To study the species diversity of webspinners in Thailand
To plan for future in systematic studies of webspinners in Thailand
Methods: The specimens were collected from various provinces in Thailand. Adult specimens were preserved in the vial with 95% ethyl alcohol whilst the nymphal stages were brought back and reared in the laboratory until they developed into adults. The male adult forms are required for species identification.
Results: To this end we surveyed and recorded webspinners in the Oligotomidae family from different localities in Thailand and revealed a total of 8 species and 6 morphospecies. (*Aposthonia borneesis*, *A. ceylonica*, *A.* sp1, *A.* sp2, *A.* sp3, *Bulbosembia thailandica*, *Eosembia auripiceta*, *E.* sp1, *E.* sp2, *E.* sp3, *Lobosembia mandibulata*, *Oligotoma humbertiana*, *O. nigra*, and *O. saundersii*).
Discussion and Conclusion: All collected specimens were identified by morphological characteristics into 8 species and 6 morphospecies. *Oligotoma humbertiana*, *O. nigra*, and *O. saundersii* are new records in Thailand found in this study. *Oligotoma humbertiana* was found only at a locality in Prachuap Khiri Khan Province. The most common species which is distributed over 10 provinces was *E. auripicta*. Of all studied localities, the Chiang Mai Province is where highest numbers of species (*A. borneensis*, *A. ceylonica*, *E. auripecta* and *O. saundersii*) were collected. Besides the common habitat of webspinners in tree bark, some were found on the rocks covered with mosses, lichens, and soils. This research is the first extensive study on species diversity of webspinners in Thailand. The results indicated the high diversity of this kind of insect throughout the country. Further studies on systematics and ecology need to be investigated.

Keywords: Embiidina, Oligotomidae, Webspinners, Thailand

ภาคผนวก ซ

ลำดับที่ 1

Pak. J. Bot., 42(1): 97-109, 2010.

MORPHOMETRIC AND GENETIC VARIATION IN *PUERARIA MIRIFICA* CULTIVARS ACROSS THAILAND

TRIN SUWANVIJITR[1], JIRATTIKARN KAEWMUANGMOON[1], WICHAI CHERDSHEWASART[2] AND CHANPEN CHANCHAO[2]*

[1]*Program of Biotechnology and* [2]*Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand,*
**Corresponding address: chanpen@sc.chula.ac.th*

Abstract

Pueraria mirifica is a leguminous herbal plant whose tuberous roots are used in estrogen replacement. Leaves were collected for 39 locations across Thailand with seed pods and flowers also collected when available from a subset of 14 and 11 of these locations respectively. Morphometric analysis revealed a low level of variation between cultivars. Linear regression analysis suggested that leaves trended to decrease in size from the West to the East whilst pods trended to increase in size from the South to the North and also the West to the East. Genetic analysis was conducted by direct sequencing of one nuclear (rDNA ITS region) and one chloroplast (*trn*LF) region, and also by random genome analysis by RAPD-PCR using five primers. All chloroplast sequences obtained revealed a low level of variation between isolates although the rDNA ITS sequences displayed a divergence of up to 25.2 %. All of 93 bands generated by the five RAPD primers were polymorphic. The average genetic distance varied from 0 to 42. NJ based phylogenies derived from ITS and RAPD data revealed poor resolution. In summary, both analyses indicate low variation amongst cultivars.

Introduction

Pueraria mirifica Airy Shaw et. Suvatabandhu or White Kwao Krua is a tropical perennial herbal plant of the family Fabaceae (Suvatti, 1978). The root or tuber extract of *P. mirifica* contains a relatively large amount of several phytoestrogen constituents, that is chemicals whose structure and effect are similar to the female sex hormone, estrogen. It is closely related to *P. lobata* Willd (Kudzu), the native species in southern Japan and southeastern China (Smitasiri & Wungjai, 1986).

P. mirifica is distributed in deciduous or dry forest areas and in mountainous forests with sandy soils at roughly 80-800 meters above the sea level. Interestingly, morphometric diversity exists within and between these different Thai cultivars. For example, cultivars from Kanchanaburi possess darker blue flowers than those from Chiang Mai (Cherdshewasart *et al.*, 2007). However, whether this morphometric polymorphism underlies a true genetic biodiversity between cultivars or merely reflect environmental plasticity effects remains unknown, it is important, in the selection of optimal cultivars and best cultivation regimes to yield optimal levels of phytoestrogens as medical dietary supplements.

Morphometric variation has been widely used in determining potential plant diversity. For example, at the visible level in the sea grass *Halodule wrightii* (Creed, 1997) and at the microlevel using SEM on epiphytic orchid seeds (Swarmy *et al.*, 2004).

Genetic variation has been widely used in determining plant diversity including the selection of plant varieties for cultivation. Typically the genetic loci for the desired trait(s) are unknown and thus such approaches require random sampling across the whole genome. Given the cost and time of developing and characterizing a set of comprehensive polymorphic microsatellite (SSR) markers, it is common to employ the more random,

dominant, AFLP or RAPD based approaches and with somewhat related ISSR approach. For example, RAPD have been used in the identification of South African soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) for commercial seed production and crop certification (Cherdshewasart *et al.*, 2007), with just 14 primers being able to distinguish all 37 cultivars.

In order to determine the genetic diversity in plants, conserved regions of chloroplast DNA ribulose-bisphosphate carboxylase (large subunit) (*rbc*L), chloroplast DNA transfer RNA-Leucine and phenylalanine (*trn*L-F), nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) and mitochondrial DNA can be used (Ellison *et al.*, 2006). However, despite the clear use of morphometric and genetic analysis in many cultivated plants, to the best of our knowledge, no morphometric or genetic analysis within the genus *Pueraria*, let alone the species *P. mirifica*, has been evaluated despite the potential economic importance of *P. mirifica* as a source of natural phytoestrogens.

There are many cultivars of *P. mirifica* distributed throughout Thailand, and that they apparently differ in their morphology, studies were carried out to characterize the degree of morphological and genetic variation between and, especially within cultivars. For morphological analysis, leaf, seed pod and flower morphometrics were analyzed by cluster and linear regression analyses. For genetic analysis, sequence analysis of the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) and cPCR-RAPD analysis with five primers were used to characterize the genetic variation and to perform phylogenetic analyses by the neighbor-joining method.

Materials and methods

Sampling collection: *Pueraria mirifica* (39 cultivars for leaves, 14 cultivars for pods and 11 cultivars for flowers) were collected from 5 parts of Thailand (i.e., the North, the Northeast, the Center, the West and the South) (Fig. 1 and Table 1). *P. lobata* (Kudzu) was collected from Japan. Cultivar names were ascribed from the locality they were collected from and a sequential number of more than one cultivar (location) within that locality.

Morphometric analysis: Mature leaves (50 leaves/cultivar), plus old brown seed pods (10 pods/cultivar) and blooming flowers (10 flowers/cultivar) where available were collected. Not all the cultivars were in flower or had old seed pods at the time of collection (Table 1). Leaf morphology was measured at nine parameters; the petiole length (PL) and diameter (PD), rachis length (RL), petiolet length (PLL), terminal leaflet length (TLL) and breadth (TLB), stipule length (SPL), angle of first leaf border (A^B)° and the number of pairs of primary veins (NPV). Seed pods were assayed as pod length (PodL) and width (PodW) and the number of seeds per pod (SNP). Flowers were assayed as pedicel length (PdcL), petal width (PetW) and length (PetL), stamen length (StmL), pistil length (PisL), ovary diameter (OvrD) and calyx length (ClxL). In all cases, numeric data were recorded and used for further statistical analysis.

Morphometric data analysis: The morphometric parameters analyzed were largely similar to other researches (Creed, 1997). However, in order to reduce the morphometric characters or parameters, the data from all the parameters were first analyzed by Principal Component Analysis (PCA) on the raw data of each morphometric character from all the sampled cultivars (Factor; SPSS program for Windows). Factor loading scores were obtained from the output and used to select characters, based upon an Eigen value that was higher than 1.0, to provide a parsimonious reduction in the number of parameters. The selected parameters were then used for between-groups linkage cluster analysis to calculate the relationship between groups and to classify clusters.

Table 1. The plant organs collected and analyzed for each cultivar of *P. mirifica* in Thailand (Nos. 1-39) and *P. lobata* (Japan; No. 40), and those samples for which the chloroplast *trn*L-F (*trn*L-F) and rDNA ITS region (ITS) were sequenced or RAPD-PCR was performed (RAPD). The √ symbol represents a collected and analyzed sample.

No.	Cultivar	Leaf	Pod	Flower	*trn*L-F	ITS	RAPD
1	CM1	√	√		√	√	√
2	CM2	√					
3	CM3	√	√	√	√	√	√
4	CM4	√	√	√	√	√	√
5	CR	√			√		√
6	LPang	√	√		√	√	√
7	MHS	√				√	√
8	LPoon	√			√	√	√
9	Nan	√				√	
10	PY	√	√			√	√
11	P1	√			√	√	√
12	P2	√			√	√	√
13	P3	√	√		√	√	
14	UTRD	√					√
15	KPP	√	√		√	√	√
16	LBR	√	√		√	√	
17	NKSW	√					
18	PBoon	√			√	√	√
19	PSNL	√				√	
20	SR1	√	√		√	√	√
21	SR2	√		√	√	√	√
22	SKHT1	√			√	√	√
23	SKHT2	√			√	√	√
24	UTTN	√			√	√	√
25	KC1	√	√	√	√	√	√
26	KC2	√	√	√	√	√	√
27	KC3	√			√	√	√
28	PCHBR	√	√	√	√	√	√
29	PJKRK	√	√	√	√	√	√
30	RB1	√		√	√	√	√
31	RB2	√		√	√	√	√
32	RB3	√			√	√	√
33	RB4	√					√
34	Tak	√	√		√	√	√
35	CHYP	√		√	√	√	√
36	NKRSM	√			√	√	√
37	SKNK	√			√		√
38	CHPn	√		√	√	√	√
39	SRTN	√			√	√	√
40	*P. lobata*	√	√		√	√	√
Total		**40**	**15**	**11**	**32**	**34**	**34**

No.	Province	Code name
1-4	Chiang Mai	CM1-4
5	Chiang Rai	CR
6	Lampang	LPang
7	Mae Hong Son	MHS
8	Lamphun	Lpoon
9	Nan	Nan
10	Phayao	PY
11-13	Phrae	P1-3
14	Uttaradit	UTRD
15	Kamphaeng Phet	KPP
16	Loeburi	LBR
17	Nakhon Sawan	NkSW
18	Phetchabun	PBoon
19	Phitsanulok	PSNL
20-21	Saraburi	SR1-2
22-23	Sukhothai	SKHT 1-2
24	Uthai Thani	UTTN
25-27	Kanchanaburi	KC1-3
28	Phetchaburi	PCHBR
29	Prachuap Khiri Khan	PJKRK
30-33	Ratchaburi	RB1-4
34	Tak	Tak
35	Chaiyaphum	CHYP
36	Nakhon Ratchasima	NKRSM
37	Sakon Nakhon	SKNK
38	Chumphon	CHPn
39	Surat Thani	SRTN

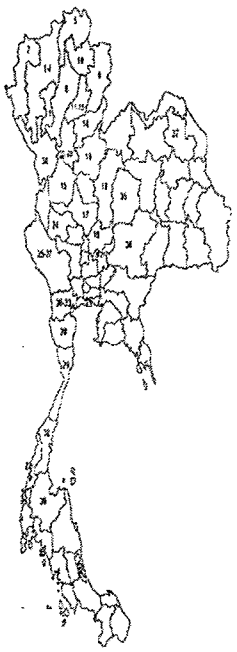


Fig. 1. Map of Thailand showing the Provinces, with those from where *P. mirifica* samples were collected from being shown by numbers and sample code.

DNA extraction: DNA extraction was performed by using a DNeasy plant mini kit (Qiagen) and Nucleospin® DNA plant kit (Machinery-Nagel) as per the manufacturer's protocol. Eluted DNA was stored at -20°C.

Primer conditions: Primers for PCR amplification of the nuclear rDNA ITS region and the intergenic spacer of transfer RNA-Leucine-Phenylalanine region (*trn*L-F region) in the chloroplast DNA were as reported by (White *et al.*, (1990). Each PCR mixture contained 1x PCR master mix (Fermentas Life Science), 2 µM of each forward and reverse primer, 100 ng genomic DNA and d-H_2O to reach a total volume of 20 µl. PCR amplification conditions were as follows: 94°C for 2 min 30 sec and 40-45 cycles of 94°C for 1 min., 55-60°C for 1 min and 72°C for 3 min., with a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were resolved by 0.8-1.0% (w/v) agarose TBE gel electrophoresis.

RAPD PCR was performed as above except each reaction contained 20 ng of genomic DNA and one of the primers from OPA-07, OPA-12, OPD-02, OPD-16 and OPE-01 (Taberlet *et al.*, 1991), in a total volume of 10 µl and was cycled for 94°C for 2 min., 30 sec., followed by 45 cycles of 94°C for 1 min., 36°C for 1.5 min., and 72°C for 3 min., and resolved through 2 % (w/v) agarose TBE gels.

Sequencing: PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and sent to the Bioservice Unit (BSU), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, for direct DNA sequencing.

RAPD amplicon analysis: For the RAPD analysis for each of the five primers used the amplicons attained from each sample were analyzed by scoring the presence (1) or absence (0) of each clear band, defined as reproducible and easily and reliably discriminated from other bands. These were recorded and subsequently used for phylogenetic analysis.

Phylogenetic analysis: All sequences obtained were aligned using the multiple sequence alignment program Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/clustalw), and further analyzed by neighbor-joining (NJ) using the Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP*4.0b10) program (Swofford, 2000). The genetic distance calculations were based on the K2P distance (for sequencing) and Nei-Li distances (for RAPD) and were performed before generating the phylogeny. Bootstrapping with 1000 replicates was conducted in order to indicate the robustness of the phylogenetic trees, with values as % displayed above each node if > 50%. *P. lobata* (Kudzu) was used as the out-group in order to determine the intra-specific relationships within *P. mirifica* cultivars.

Results and Discussion

Pueraria mirifica were more widely distributed in the Northern, Central and Western Thailand than in other parts of Thailand, because the habitat is most suitable for this species (deciduous or dry forested mountainous areas) mainly located in these three regions. In contrast, *P. mirifica* was rarely found in the East and the South which are mainly composed of evergreen forests. In this study, 39 cultivars were collected from within 27 provinces of Thailand (Fig. 1 and Table 1). Leaves were found throughout the year (Cherdshewasart *et al.*, 2007), but *P. mirifica* are usually distinguished by their distinctive flowers which are not always evident. If the flowers were not available, tuberous roots were obtained and cut to investigate the species. The distribution of *P. mirifica* found in this survey (Fig. 1) concurs with that in a previous report (Cherdshewasart *et al.*, 2007).

Morphometric factor analysis of leaf, pod and flower morphometry: Factor analysis using the data of selectable morphometric parameters and scatter plots of two factor scores generated by Principal Component Analysis (PCA) revealed that there was no grouping structure within *P. mirifica* in Thailand. However, considering flower morphometry, the KC1 cultivar from Thongphaphum district in Kanchanaburi province was clearly separated from the rest as an outlier but this was not mirrored in the other characters analyzed from this cultivar.

Three dendrograms were constructed using the Between-groups linkage method of Cluster analysis on Squared Euclidian distance. The factor score values from Factor analysis were used for leaf and flower morphometrics whilst the standardized data were used for pod morphometry. All three dendrograms revealed that all the *P. mirifica* cultivars could be clustered differently. For leaf morphometrics (Fig. 2), the 39 cultivars of *P. mirifica* were classified into 5 groups comprised of one large (24 cultivars) and four small (5, 4, 5 and 1 cultivar) groups. The sole cultivar of the last group, Uthai Thani, may reflect the small leaf size due to the local climate which was a rather high humidity location in contrast to the other sites where *P. mirifica* was found in its more typical low humidity habitats.

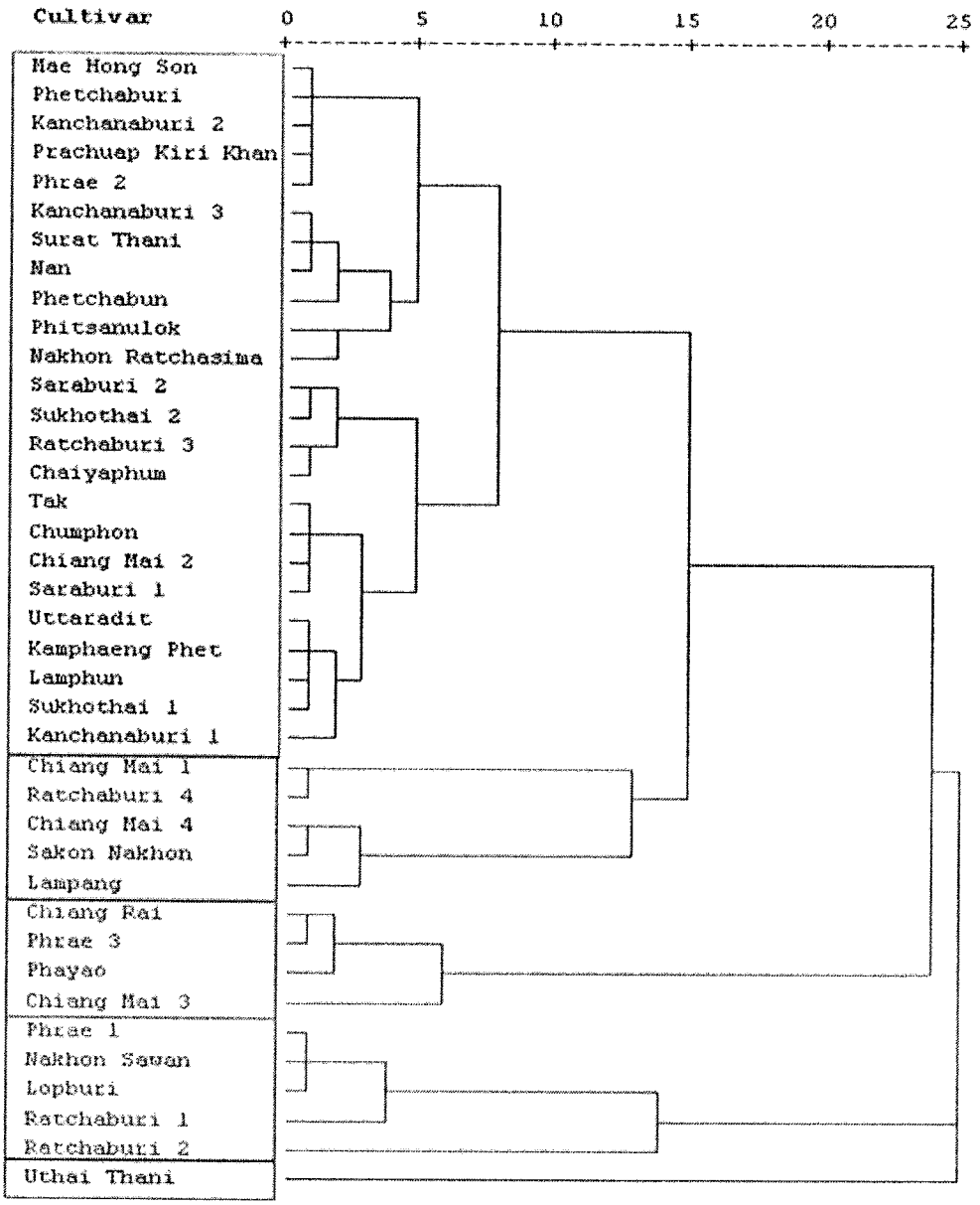


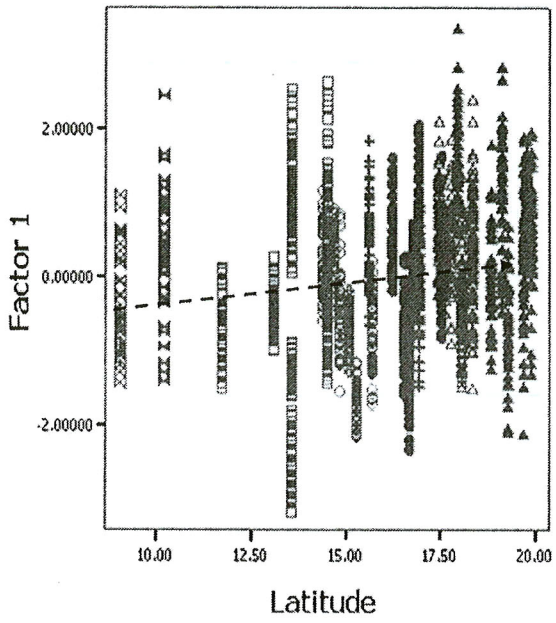
Fig. 2. Leaf morphometric dendrogram created by the Between-groups linkage method of Cluster analysis. *P. mirifica* is classified by the province of collection and sequential number (See Fig. 1).

Characterization of *P. mirifica* in Thailand: An apparent clinal pattern of morphological characterization of *P. mirifica* cultivars in Thailand was revealed when the factor scores for leaf or flower morphometrics and the standardized data of pod morphometry were plotted against latitude and longitude.

Considering first leaf morphometrics, there were statistically significant correlations between both factors 1 (PD, TLB, PL, RL, TLL, PLL and A^B parameters) and 2 (NPV and SPL parameters) with both latitude and longitude (Fig. 3). Thus a clinal pattern of leaf characterization for *P. mirifica* in Thailand is suggested with the inference that *P. mirifica* leaf characters (PD, TLB, PL, RL, TLL, PLL and A^B parameters) tend to increase in size from the South to the North of Thailand (R = 0.229). This may reflect the colder weather and reduced light availability in the forested mountainous terrain in the North which is more suitable for the growth of *P. mirifica*. On the other hand, the other two *P. mirifica* leaf characters (NPV and SPL parameters) decreased in size from the South to the North (R = -0.097), although these do not statistically correspond to the above seven parameters. Moreover, the trend of all nine parameters was to decrease in size from the West to the East of Thailand (R = -0.175 and -0.169, respectively), which is also in keeping with the change in topology (the decrease in altitude and mountainous terrain) and associated light availability and temperature. Again, the dry weather and deciduous forest of the West may be more suitable for the growth of *P. mirifica* resulting in larger stems and leaves.

Seed pod morphometrics was analyzed from a smaller sample size (at 14 *P. mirifica* cultivars compared to 39 for leaves) and lacked samples from the more easterly points (samples 35-37), but still revealed a statistically significant correlation in the Z score of PodL ($p \leq 0.05$), with significant correlations to latitude and longitude (R = 0.209 and -0.096, respectively). *P. mirifica* pods (PodL) tend to increase in length from the South to the North, and decrease in length from the West to the East of Thailand, again as with leaves, in agreement with the change in topology (altitude and mountainous terrain). It is conceivable that the dry, cold climate and deciduous, mountainous forests of the North and the West might lead to a higher metabolic storage in the seeds of pods and to a larger size of seeds and length of pods. However, unlike the PodL Z score, there were no significant correlations for both latitude and longitude ($p \geq 0.05$) for PodW and SNP. Thus, the pod shape and size of *P. mirifica* in Thailand are either not significantly different or the three pod parameters used in this study do not reveal the morphometric variation.

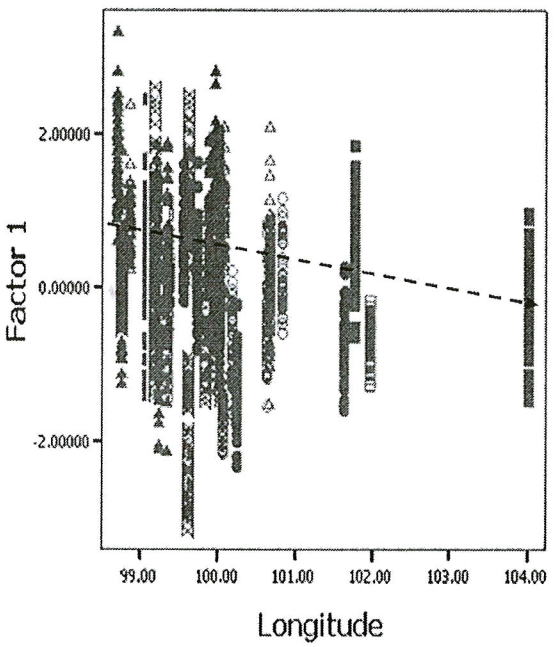
Finally, flower morphometric analysis was restricted to only 11 cultivars and lacked all bar one (sample 35) of the likely informative easterly to north easterly locations as well as having only Chiang Mai to represent the north. Thus, although the analysis revealed no statistically significant correlations between latitude for factors 1 (PetL, StmL, PisL, ClxL, PetW and OvrD parameters) and 2 (PdcL), nor for longitude for factor 2 ($p \geq 0.05$), it is less clear if this is due to the reduced resolution following the limited sampling or from an actual trend. Only factor 1 was significantly correlated to longitude (R = -0.468). Scatter plots of factor scores (1 and 2) against latitude and longitude suggested that the size of factor 1 (PetL, StmL, PisL, ClxL, PetW and OvrD) of the flower tended to decrease from the West to the East of Thailand, and coincided with the flower morphometric dendrogram. The eleven cultivars could be classified into three clusters, although, remarkably, the Kanchanaburi 1 cultivar (Thongphaphum district) could be separated from the others having distinctively larger sized flowers. Other than that, *P. mirifica* cultivars have a low apparent morphometric variation.



$y = 0.0898x - 1.4392$

$R^2 = 0.0525$

Fig. 3a



$y = -0.173x + 17.3$

$R^2 = 0.0305$

Fig. 3b

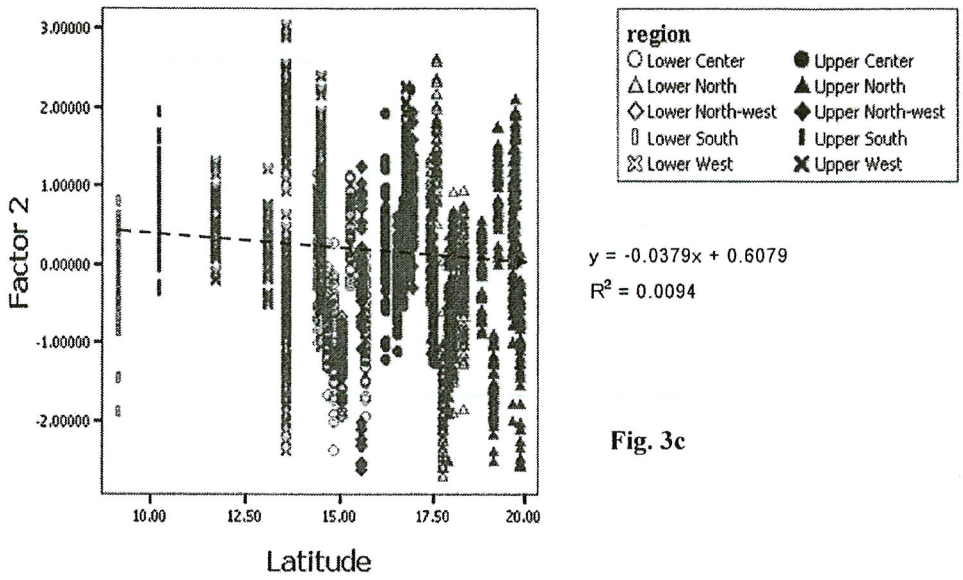


Fig. 3c

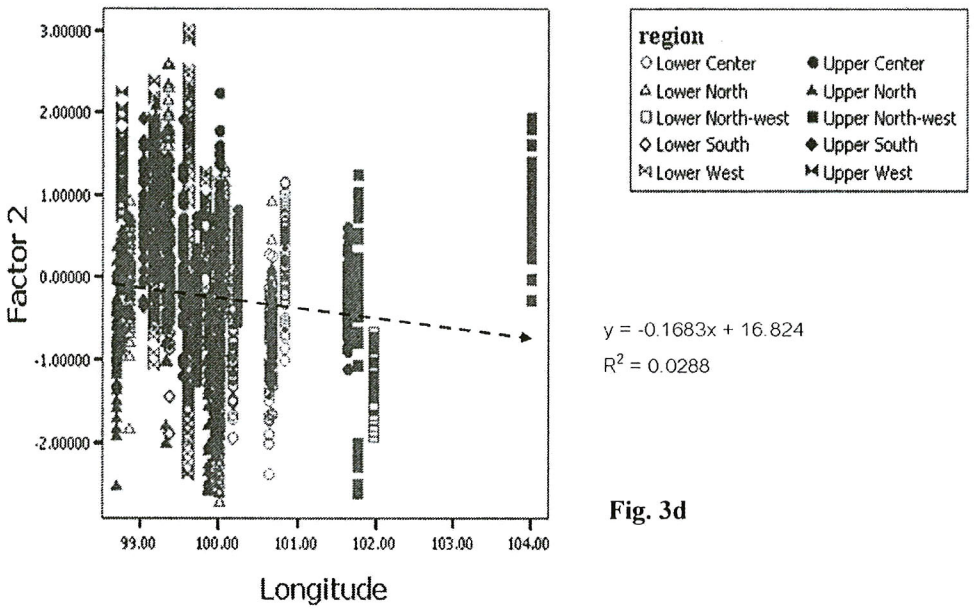


Fig. 3d

Fig. 3. Geographic trends in leaf morphometry of *P. mirifica* in Thailand. Latitude (A & C) and Longitude (B & D) against the factor score 1 (A & B) or 2 (C & D) derived from PCA. Value labels refer to regions.

Genetic variation: All desired amplicons from the PCR amplification of the ITS and *trn*L-F gene fragments of *P. mirifica* from 33 collected sites in Thailand, and *P. lobata* from Japan as an out-group, were purified and directly sequenced. For each cultivar the sequences were completely trimmed aligned and the consensus was kept yielding 687 and 731 bp for the ITS and *trn*L-F regions, respectively. Pairwise and multiple sequences alignment comparisons for the *trn*L-F regions were highly similar (93-100% across all 39 *P. mirifica* samples and 93-98% between the *P. mirifca* samples and *P. lobata*) with a low sequence divergence (0-5.4% across all 39 *P. mirifica* samples and 1.0-4.7% between the *P. mirifica* samples and *P. lobata*), as expected given the highly conserved nature (slow mutation rate) of this chloroplast gene. However, given the inability to discriminate between *P. lobata* and *P. mirifica* samples the *trn*L-F sequences cannot be used to support the identification of all *P. mirifica* samples as likely to be valid, since it clearly does not discriminate between related species. With respect to the ITS sequences of each cultivar of *P. mirifica*, a fair degree of polymorphism was observed with similarity percentage (72-100%) and sequence divergence (0-25.2%) values within the range typically seen within a species but suggestive of a fair degree of cultivar dependent genetic variation. However, very oddly and almost inexplicably, no discrimination between *P. lobata* and *P. mirifica* was noted, questioning how far diverged these two species really are ITS sequence variation is typically representative of only one locus (due to concerted evolution across tandem repeats and loci), and often does not show equal mutation rates across isolates (patterns that are not in accord with the molecular clock). Therefore to sample a larger representation of the genome we used PCR-RAPD analysis with five random primers (Cherdshewasart *et al.*, 2007). The five selected primers all successfully amplified *P. mirifica* DNA and revealed polymorphic banding patterns between some *P. mirifica* cultivars as well as the out-group (*P. lobata*), allowing discrimination of individual cultivars (Fig. 4).

In total 93 easily distinguished RAPD bands were reliably amplified and resolved by the 5 primers under these conditions. Of these, none were monomorphic across all 33 *P. mirifica* cultivars. A representative example of amplicons derived from some *P. mirifica* samples with one primer is shown in Fig. 4, whilst a summary for each primer is displayed in Table 2. Interestingly, as can clearly be seen in the summary table, all primers amplified only polymorphic bands meaning not a single amplicon was conserved across all the 39 cultivars.

Phylogenetic analysis: The sequences of PCR products (ITS) and RAPD patterns of *P. mirifica* from the 33 different Thai *P. mirifica* cultivars assayed (Table 1) and from the one isolate of *P. lobata* from Japan (as the out-group) were used for phylogenetic analysis.

Considering the ITS sequence derived NJ tree, although there are many minor groups of with minor bootstrap support, there is no clear resolution except for one group comprised of two apparent sister clades (Fig. 5). The former group is comprised of cultivars of Lamphun and Phrae 3 (Wang Chin district), firmly paired and grouped together with Phrae 2 (Song district), Ratchaburi 2 and Kamphaeng phet whilst the sister clade to this, comprised of Kanchanaburi 2 (Sai Yok district) and Chumphon cultivars also has good support (91%). However, of unclear reason and some cconcern, the out-group (*P. lobata*) failed to out-group but instead was resolved within the *P. mirifica* samples and especially cultivar Phrae 1.

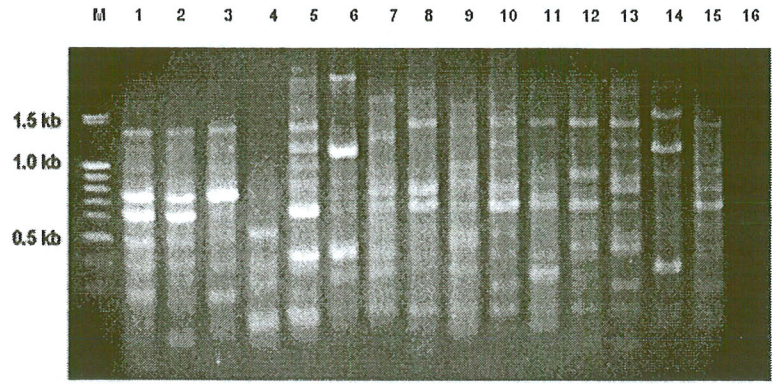


Fig. 4. RAPD patterns amplified by OPA-12 primer and resolved on 2.0 % (w/v) agarose gel. Lane M; 100 bp ladder as DNA marker. Lanes 1-15; the resolved OPA-12 RAPD amplicons from 15 different cultivars of *P. mirifica* in Thailand. Lane 16; the RAPD product of *P. lobata* as an out-group.

Table 2. Total number of distinctive (reliably scored) and reproducible RAPD bands scored for the five RAPD primers using *P. mirifica* genomic DNA as template. Polymorphic bands are scored from across the 33 cultivars of *P. mirifica* in Thailand.

RAPD primer	Number of total band	Number of polymorphic band	Amplicon size range (bp)
OPA-07	21	21 (100 %)	250-1500
OPA-12	20	20 (100 %)	250-1500
OPD-02	17	17 (100 %)	250-1300
OPD-16	20	20 (100 %)	250-1500
OPE-01	15	15 (100 %)	250-1300
Total	**93**	**93 (100 %)**	**250-1500**

As expected for a highly conserved gene within a species, phylogenies based upon the *trn*LF gene fragments revealed no significant discrimination, including between the *P. mirifca* samples and the out-group *P. lobata* (not shown).

For the RAPD derived data the genetic distances (pairwise distances between taxa based on Nei-Li distance in PAUP program), which were further used in NJ phylogenetic construction, varied from 0 to 0.4381 (Mean = 0.1861), suggesting that the 5 primers used in this study could provide moderate information on the genetic variation of *P. mirifica* cultivars. This is not inconsistent with data from the related species, *P. montana*, where RAPD analysis revealed a high degree of genetic variation [17]. The NJ derived phylogram from the RAPD data (Fig. 6) was separated into many inconsistent branches with some weakly supported branches. As with the ITS based phylogeny, again no consistent geographical pattern was evident and cultivars from the same Province often varied from each other as much as those from other Provinces. Again of concern was the lack of separate resolution of the out-group (*P. lobata*) from the *P. mirifica* cultivars, although this time it grouped close to the *P. mirifica* Sukhothai 1 and 2 cultivars and not Phrae 1. Although the RAPD results presented only moderate genetic differentiation and revealed no clear phylogenetic pattern, they were potentially efficient enough for genetic classification among cultivars.

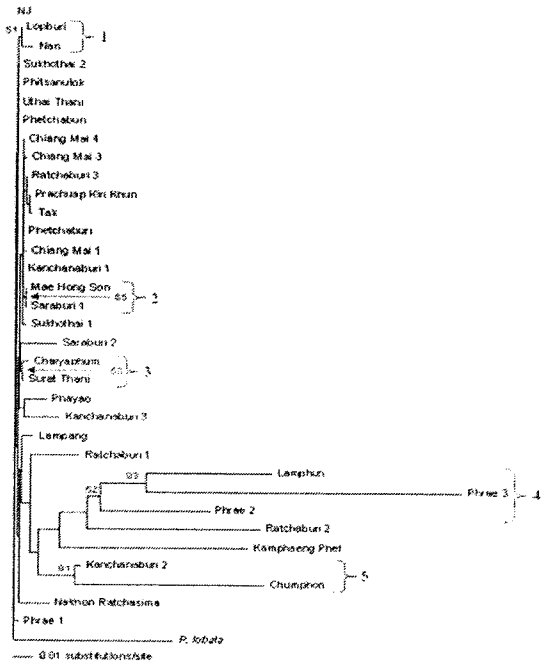


Fig. 5. Rooted NJ tree of the ITS region (33 cultivars of *P. mirifica* plus the out-group *P. lobata*) based on K2P genetic distance. Numbers above the branches indicate bootstrap values of more than 50 % derived from 1000 replicates.

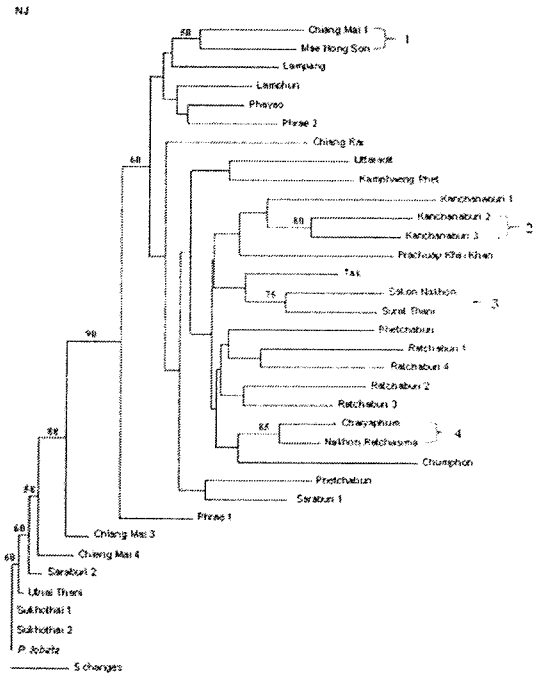


Fig. 6. Rooted NJ tree based on Nei-Li genetic distances among 33 cultivars of *P. mirifica* and 1 cultivar of *P. lobata* as an out-group derived from RAPD patterns. Bootstrap values are shown above the nodes when > 50 %.

Conclusions

Although *P. mirifica* cultivars have a low overall morphometric variation (Fig. 2), potential clinal patterns were still observed by linear regression analysis (Fig. 3) with latitude and longitude changes having an apparent influence on the leaf, seed pod and flower morphologies of this species. In addition, the low level of genetic variation amongst cultivars of *P. mirifica* was supported by sequence analysis of the rDNA ITS region and by RAPD analysis. Although some cultivars clearly differed from the others, such as Kanchanaburi 2, no clear geographical or isolation by distance was observed.

Morphometric and genetic analyses revealed different patterns, as also did genetic analysis derived from the ITS sequence data and the RAPD derived data. Since RAPDs can amplify genomic DNA randomly and assay any genetic variation more apparently, the five primer sets utilized could detect high levels of variation in *P. mirifica*.

Acknowledgements

This research was financially supported by following grants: Thailand Research Fund, grant # RMU5180042, the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity of Chulalongkorn University, Asia Research Center, and TRF/ BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training grant which is gratefully acknowledged.

References

Cherdshewasart, W., S. Subtang and W. Dahlan. 2007. Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43: 428-434.

Creed, J.C. 1997. Morphological variation in the seagrass *Halodule wrightii* near its southern distributional limit. *Aquat. Bot.*, 59: 163-172.

Ellison, N.W., A. Liston, J.J. Steiner, W.M. Williams and N.L. Taylor. 2006. Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*-Leguminosae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 39: 688-705.

Smitasiri, Y. and C. Wungjai. 1986. Some biological aspects of *Pueraria mirifica*: flower, pod, and seed. *J. Sci. Fac. CMU.*, 14(1): 67-74.

Swamy, K.K., H.N.K. Kumar, T.M. Ramakrishna and S.N. Ramaswamy. 2004. Studies on seed morphometry of epiphytic orchids from western Ghats of Karnataka. *Taiwania.*, 49(2): 124-140.

Swofford, D.L. 2000. *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) Version 4.0.* Sinauer Associates, Massachusetts.

Suvatti, C. 1978. *Flora of Thailand.* Kurusapha Press, Bangkok.

Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, 17: 1105-1109.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications.* (Eds.): M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.

(Received for publication 20 November 2008)

ลำดับที่ 2

RESEARCH ARTICLE
doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.180

ScienceAsia 36 (2010): **180–186**

Leaf morphometric and genetic variation of *Butea superba* in Thailand

Jirattikarn Kaewmuangmoon[a], Trin Suwanvijitr[a], Wichai Cherdshewasart[b], Chanpen Chanchao[b,*]

[a] Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand
[b] Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

*Corresponding author, e-mail: chanpen@sc.chula.ac.th

Received 23 Jul 2009
Accepted 28 Jul 2010

ABSTRACT: Red kwao krua, *Butea superba* Roxb., is a herbal leguminous plant endemic in Thailand whose tuberous roots are used for male rejuvenation and the prevention of erectile dysfunction. Different populations from different provinces vary in their bioactivities, raising the need to evaluate the causes prior to optimal population selection and growth. Morphometric analysis of leaves collected from 34 populations from 24 provinces throughout Thailand using nine parameters for factor and cluster analyses were correlated with latitude and longitude revealing a clinal pattern. From the North to the South, leaf length increased in size in factor 1 but decreased in size in factor 2. Genetic analysis on the same samples, using DNA sequence analysis from the chloroplast *rbc*L, *trn*LF-cd, and *trn*LF-cf regions and maximum parsimony and neighbour-joining phylogenetic analysis, revealed essentially no genetic variation in the *rbc*L region, as expected. However, some between-population genetic variation was revealed by *trn*LF-cd and *trn*LF-cf sequences, suggesting potentially considerable genetic polymorphism. This was supported by preliminary RAPD analyses using five primers which indicated high genetic variation within and between populations.

KEYWORDS: clinal pattern, phylogeny, red kwao krua, chloroplast

INTRODUCTION

Butea superba Roxb. (Leguminosae: Papilionoideae (Faboideae)) is a large twining wood endemic in many parts of Thailand and is locally known as red kwao krua. Its tuberous roots have long been used in traditional medicine for male rejuvenation and the prevention of erectile dysfunction[1]. Morphometric and genetic analyses are almost always used to determine the differences between populations. They can be used to evaluate both fixed genetic and environmental plasticity effects upon traits. Previous morphometric studies have successfully used several plant organs such as leaf, seed, fruit, and flower. For example, Moreno-Sánchez used three parameters of leaf shape to compare plants in the genus *Archaeopteris*[2].

Geographic distance combined with habitat locality and terrain imposes both restricted gene flow and different biotic and abiotic selection pressures. This often leads to both fixed and population level genetic variation of organisms. The variation may further affect the bioactivity, characteristics, and classification of the organisms. Thus the evaluation of the genetic diversity is the first stage in understanding the different biotypes or characteristics within a population. To this end, many molecular techniques have been applied, ranging from those which do not require any specific sequence information (random screening of dominant markers), such as the somewhat unreliable rapid amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, the more informative amplified fragment length polymorphism analysis, and PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis, through to the analysis of homologous DNA sequences using conserved region primers and PCR amplification, or codominant markers based upon known loci such as microsatellites, insertion sequences, and SNPs.

RAPD analysis has revealed a high level of genetic polymorphism both within and between five taxonomic groups of *Stylosanthes guianensis* which coincided with the pattern of morphological-agronomic characteristics such as seed protein pattern and pollen stainability[3]. In addition, variation in the DNA sequence of genes and intergenic regions of the chloroplast and mitochondria genome are widely used. For example, the large subunit of ribulose 1, 5 bisphosphate carboxylase/oxygenase (*rbc*L), is the most widely used gene fragment sequence in plant phylogenetic construction. Its conserved nature means it was chosen to generate a large molecular dataset of angiosperms and has been used in a large-scale analysis of green plants (asterias)[4]. In addition, the

chloroplast DNA transfer RNA-Leucine and phenylalanine region (*trn*LF) is also widely used in studying molecular phylogenetic relationships[5].

According to a large-scale survey on the distribution and diversity of kwao krua since 1998, *B. superba* was found to be widely distributed in deciduous forests in all but the southern provinces of Thailand, and is found in the same mountainous habitats as *Pueraria mirifica* (white kwao krua)[6]. Morphometric and genetic variation of kwao krua in Thailand has never been studied and remains unreported in the case of *B. superba*. We therefore aimed to determine the variation among and between *B. superba* populations in Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

From February 2005 to October 2006 leaves were collected from *B. superba* from 34 locations (in 24 provinces) in bamboo, dry evergreen, and mixed deciduous forests in mountainous regions in the northern, central, northeastern, eastern, and western Thailand, but not in the southern part (Table 1), in agreement with its previously reported distribution[6]. Populations were coded from the name of the province followed by a sequential number according to the locality within that province. Twenty-five mature leaves (about 2 m from the shoots) per population were picked for morphometry, and younger leaves were sampled for DNA extraction. In addition, leaves were also collected from *B. monosperma*, *P. mirifica*, and *P. lobata* for DNA extraction to use as outgroups in phylogenetic analyses.

Table 1 Locations and codes of the *B. superba* collection sites.

Code	Province	Latitude	Longitude
CT	Chantaburi	12.82	102.17
CB	Chonburi	13.3	101.31
RAT1	Ratchaburi 1	13.59	99.53
RAT2	Ratchaburi 2	13.59	99.53
RAT3	Ratchaburi 3	13.59	99.53
RAT4	Ratchaburi 4	13.59	99.53
CC	Chachoengsao	13.62	101.42
PB	Prachenburi	14.08	101.66
KC1	Kanchanaburi 1	14.63	99.09
KC2	Kanchanaburi 2	14.51	99.24
KC3	Kanchanaburi 3	14.44	99.49
SR	Saraburi	14.7	100.88
BR	Buriram	14.83	103.01
LB	Lopburi	14.94	100.77
NAK	Nakhon Ratchasima	15.01	102.17
NS1	Nakhon Sawan 1	15.7	100.09
NS2	Nakhon Sawan 2	15.7	100.09
NS3	Nakhon Sawan 3	15.7	100.09
CHY	Chaiyaphum	15.75	101.96
PC	Phetchaboon	16.26	101.08
KK	Khon Kaen	16.52	102.1
TK	Tak	16.6	98.84
PS1	Phitsanulok 1	16.9	100.48
PS2	Phitsanulok 2	16.9	100.48
PS3	Phitsanulok 3	16.9	100.48
NB	Nongbualamphu	17.25	102.25
SU	Sukhothai	17.26	99.66
SK	Sakhonnakorn	17.34	103.83
LY	Loei	17.4	101.49
UTT	Uttaradit	17.67	100.51
LP1	Lampang 1	18.33	99.51
LP2	Lampang 2	18.33	99.51
CR1	Chiangrai 1	19.92	99.93
CR2	Chiangrai 2	19.92	99.93

Morphometric parameters

Nine selected parameters were evaluated: petiole length (PL) and diameter (PD), rachis length (RL), petiolet length (PLL), terminal leaflet length and breadth (TLB), stipule length (SPL), the angle of first leaf border (AB), and the number of pairs of primary veins (NPV). All lengths were measured with a vernier calliper.

Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) was first used on the raw data of each morphometric character from all the sampled populations (Factor; SPSS program for windows). Factor loading scores were obtained from the output and used to select characters, based upon an eigenvalue that was higher than 1.0, to provide a parsimonious reduction in the number of parameters. The selected parameters were then used for linkage cluster analysis between-groups (SPSS for windows 14.0) to investigate the relationship among populations. Finally, correlation was used to explore clinal patterns in the characteristics of *B. superba* leaves in Thailand.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from fresh young leaves using a DNeasy plant mini kit (Qiagen) or a NucleoSpin plant mini kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was kept at −20 °C before use.

Primer design

For PCR, primers of *rbc*L were designed using the primer 3.0 program from the published sequence of

the *rbc*L gene from *Glycine max* (GenBank accession no. Z95552), with forward and reverse (329–348 and 649–630 bp, respectively, of reference sequence) primers being 5′-AGGTTCTGTTACTAACATGT-3′ and 5′-GGTCTCTCCAACGCATAAAT-3′, respectively. For amplification of a fragment of the non-coding intergenic spacer *trn*L-F region of chloroplast DNA, the forward *trn*L 5′ exon primer_c (B49317) and reverse *trn*F primer_f (A502702) from Taberlet et al were used. This was repeated using the *trn*L 3′ exon reverse primer_d[7].

For RAPD analysis, 5 primers (OPA-07, 5′-GAAACGGGTG-3′; OPA-12, 5′-TCGGCGATAG-3′; OPA-19, 5′-CAAACGTCGG-3′; OPC-15, 5′-GACGGATCAG-3′; OPD-2, 5′-GGACCCAACC-3′) were selected based on their ability to discern polymorphic bands in another leguminous plant[8]. All primers were synthesized by BioService Unit of the National Science and Technology Development Agency, Bangkok.

PCR conditions

For amplification of chloroplast loci, PCR reactions were carried out in 1 × PCR master mix solution (Intron Biotechnology), with 2 μM each of forward and reverse primer and 200 ng genomic DNA. PCR conditions for all amplifications were as follows: 94 °C for 2.5 min, 35 cycles of 94 °C for 1 min, 59 °C for 1 min, 72 °C for 3 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min. After agarose electrophoresis, PCR amplicons of the expected sizes (300, 283, and 473 bp for *rbc*L, *trn*LF-cd, and *trn*LF-cf primers, respectively), were excised from the gel and purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen) as per the manufacturer's instructions. The purified PCR amplicons were then direct sequenced commercially by the BioService Unit or the Research Centre, Ramathibodi Hospital, Bangkok.

For RAPD analysis, PCR was performed as described above except for using 4 μM of one of the RAPD primers and cycle conditions were 94 °C for 2.5 min, 45 cycles of 94 °C for 1 min, 36 °C for 1.5 min, 72 °C for 3 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

Phylogenetic analysis

All obtained DNA sequences were aligned using Clustal X. Phylogenetic analyses were performed by using neighbour-joining (NJ) and maximum parsimony (MP)[8]. In order to investigate the support for nodes estimated in a parsimony tree, bootstrap analysis with 1000 replicates were undertaken by UPGMA (PAUP*4.0b10).

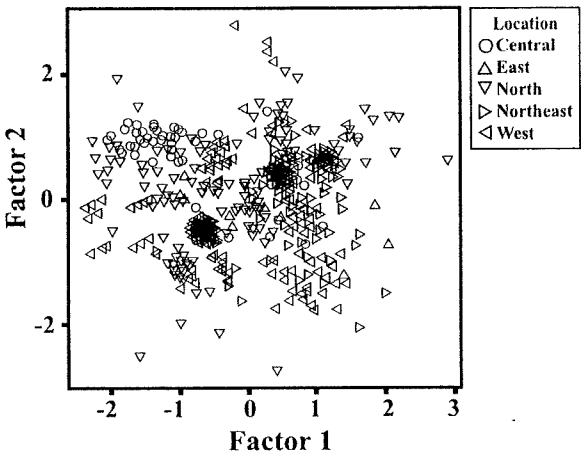


Fig. 1 Plots of factor score 1 and factor score 2 generated by PCA.

RAPD data analysis

Duplication of each reaction was performed and, after TBE-agarose electrophoresis, only bands that were reliably and accurately discriminated (i.e., showed a reproducible pattern) were scored as present or absent between samples on the same gel. For comparisons between gels, banding patterns were compared to markers and shared samples. The deduced R_f values were used to confirm band identities. In all cases scoreable bands were 0.1–1.5 kb in size. Neighbour-joining cluster analysis was performed to demonstrate the relationships among populations by considering the Nei-Li genetic distance (PAUP*4.0b10).

RESULTS AND DISCUSSION

Factor analysis

From the PCA factor analyses and factor loadings, 7 of the characters (PD, NPV, SPL, PL, RL, TLB, and AB) attained a factor loading greater than 0.6 and were selected for further analysis. The factor analysis divided these 7 parameters into three groups. The 1st factor group (PD, NPV, RL, and TLB), 2nd factor group (mainly SPL and PLL), and the 3rd factor (mainly AB) accounted for 34.2%, 17.2%, and 11.5% of the total variation, respectively. Interactive graphs were based on factors 1, 2, and 3. An example of PCA using factor 1 and 2 for the distribution of *B. superba* populations is shown in Fig. 1.

Cluster analysis

A dendrogram, constructed by a hierarchical cluster analysis of the squared Euclidean distances between values of factor scores, revealed no clear separation

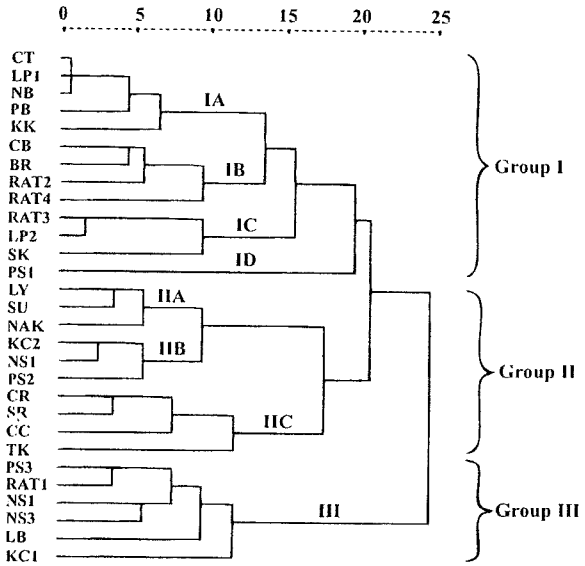


Fig. 2 A morphological dendrogram constructed by a cluster analysis.

of *B. superba* into distinct groups (Fig. 2). The dendrogram could broadly be divided into groups with the first two subdivided into four and three subgroups, respectively (Fig. 2). However, the support for such is equivocal since the factor analysis was provided by the PCA analysis. The 7 informative parameters of leaf length are not informative enough to separate the populations into groups, perhaps because only leaf parameters were used. More parameters derived from other developmentally independent organs such as seed, flower, and fruit tuber, and internodal distances parameters will be further examined to address this possibility. Alternatively, it may be possible that biotic and abiotic variations due to geography and season across these regions are not significantly different and so the morphology of the plants is not significantly affected.

Clinal patterns in the characteristic of *B. superba* in Thailand

To explore clinal patterns in the characteristics of *B. superba*, factor scores were plotted against latitude and longitude. A clear linear regression of geographic trends in morphometric characteristics of *B. superba* was revealed. Gradual transitions of characters from the South to the North and the West to the East were found (Fig. 3, Table 2). A distinct and highly significant slope ($P \leqslant 0.05$) was observed in latitude and longitude. In conclusion, from the North to the South, leaf length increases in size in factor 1 (PD, NPV, RL, and TLB) but decreases in size in factor 2 (SPL and PLL).

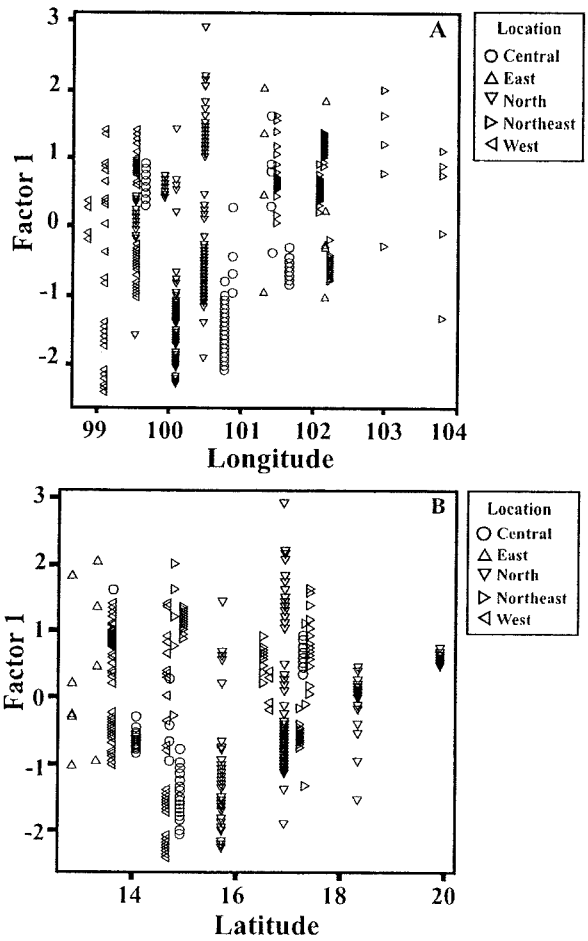


Fig. 3 Geographic trends in morphometric characters of *B. superba* in Thailand. Latitude (A) and longitude (B) plotted against factor score 1 as derived from PCA.

Table 2 Correlation of geographic trends in morphometric characters of *B. superba* in Thailand.

Factor	Latitude		Longitude	
	R value	P value	R value	P value
1	0.21*	0.00*	0.02	0.6
2	−0.24*	0.00*	0.06	0.12
3	−0.68	0.07	0.05	0.22

* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Genetic analysis

The expected PCR products amplified by *rbc*L, *trn*LF-cd, and *trn*LF-cf primers at 247 bp, 229 bp, and 410 bp, respectively, were obtained along with ampli-

Table 3 Summary of the amplified genes and their characteristics.

Characteristics	*rbc*L region	*trn*LF-cd	*trn*LF-cf
No. of samples analysed	32 (35)	29 (31)	25 (27)
Length range (bp)	247	229	410
AT content (%)	58.6	67.5	63.9
No. transversions	1	54	295
No. transitions	7	42	266
No. indels	0	62	102

Numbers in parentheses represent data including the outgroups which are one sample each of *B. monosperma* (only by *rbc*L), *P. mirifica*, and *P. lobata*.

cons from *B. monosperma*, *P. mirifica*, and *P. lobata* as outgroups, and DNA sequences of all PCR products were obtained by direct sequencing. Multiple alignments of the sequences were performed by Clustal X where comparisons revealed nucleotide variation in the form of single base pair substitution. The similarities in pairwise comparisons across samples of *rbc*L, *trn*LF-cd, and *trn*LF-cf sequences aligned by Clustal W ranged from 74–100%; 50–100%, and 45–100%, respectively (Table 3).

Phylogenetic analysis

Partial *rbc*L, *trn*LF-cd, and *trn*LF-cf sequences of *B. superba* plus the outgroups *B. monosperma* and *P. mirifica* and *P. lobata* were analysed to gain insight into the intergenetic and intragenetic relationships. The phylogenetic relationships were inferred by using the neighbour-joining (NJ) and maximum parsimony methods. Similar results were obtained from both methods (congruency of trees was tested by treemap; data not shown) so only the NJ phylogenetic trees are presented (Figs. 4–6).

Phylogenetic trees of *rbc*L from 32 populations of *B. superba* and three species of outgroup (*B. monosperma*, *P. mirifica*, and *P. lobata*) failed to resolve populations and even to separate *B. monosperma*, a different species within the same genus (Fig. 4) as expected and supporting the highly conserved (slow evolving) nature of this chloroplast coding gene.

The phylogenetic tree derived from *trn*LF-cd sequences from 29 *B. superba* populations and the two *Pueraria* outgroup species (Fig. 5) separated *B. superba* populations into two major groups composed of all but two samples (group I) and the SK plus CC samples (group II). Group I comprised of three minor groups (IA, IB, and IC). The IA minor group had highly similar sequences with low genetic distance. The IB and IC minor groups have higher genetic

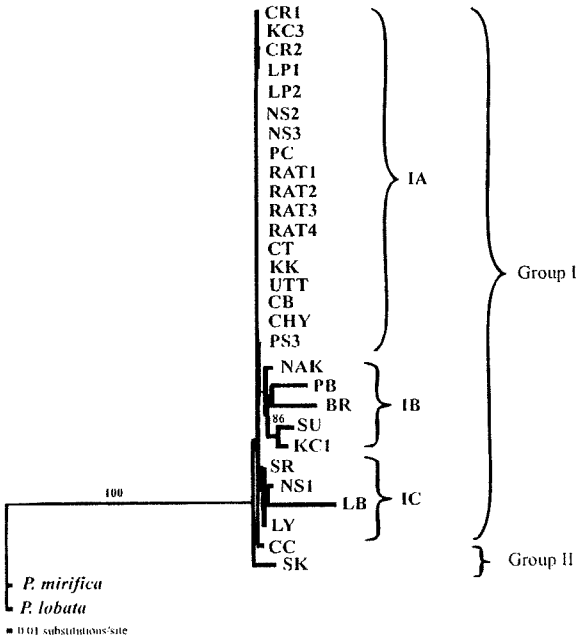


Fig. 4 A rooted phylogenetic tree of *rbc*L sequence inferred by the NJ method. No bootstrap values were above 50% for all branches. *B. monosperma* (BM), *P. mirifica*, and *P. lobata* are the outgroups.

variation. According to the IB minor group, the SU and KC1 populations formed a well separated clade (86% bootstrap support). In addition, minor splits were seen within the IC division but these had poor bootstrap support.

The phylogenetic tree derived from the larger *trn*LF-cf fragment, which encompasses all of the *trn*LF-cd fragment, derived, however, from only 25 *B. superba* populations and the two outgroups (Fig. 6) also separated *B. superba* populations into two groups. This time the second group only contained the SK population with none of the CC isolate rooted in the large 1A group. Additionally, the first group was only split into two minor groups, not three, despite the extra sequence length and number of informative characters. The failure to reform the clade 1C may perhaps be due to the lack of samples LB and LY from this analysis along with sample KC1 (from clade 1B). The two phylogenies are largely similar, as is expected given they are not only from the same gene but that *trn*LF-cf fragment contains all of the *trn*LF-cf sequence. The four minor changes (samples PS3 and LP1 shifting from clade 1A to 1B; samples SR and NS1 moving from the collapsed clade 1C to 1A) may be partly due to the missing samples, as mentioned above. However, the dramatic movement of sample

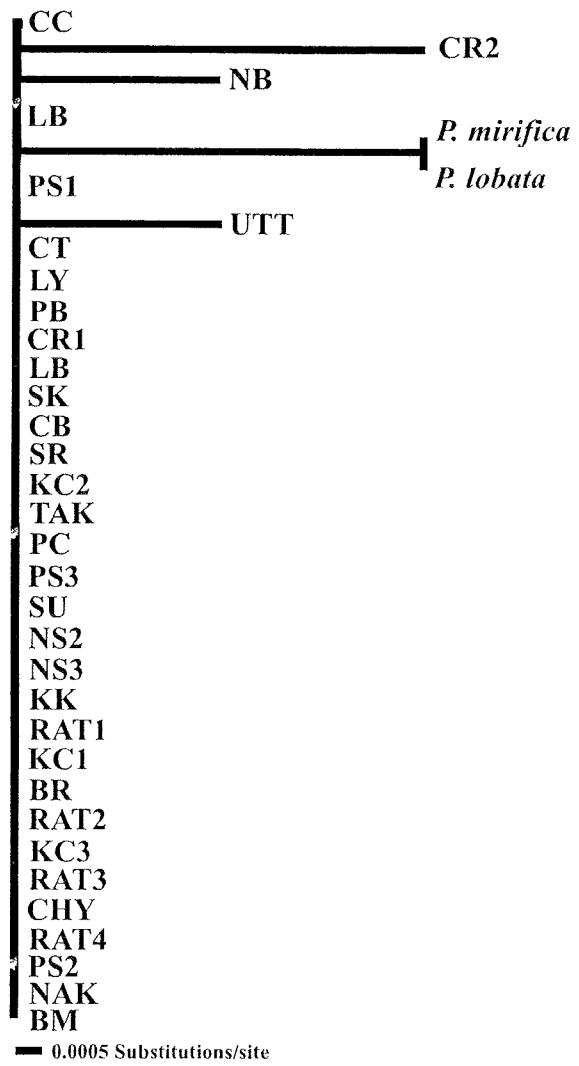


Fig. 5 A rooted phylogenetic tree of *trn*LF-cd sequence inferred by the NJ method. Bootstrap values are shown on the branches when they exceeded 50%. *P. mirifica* and *P. lobata* are the outgroups for tree rooting.

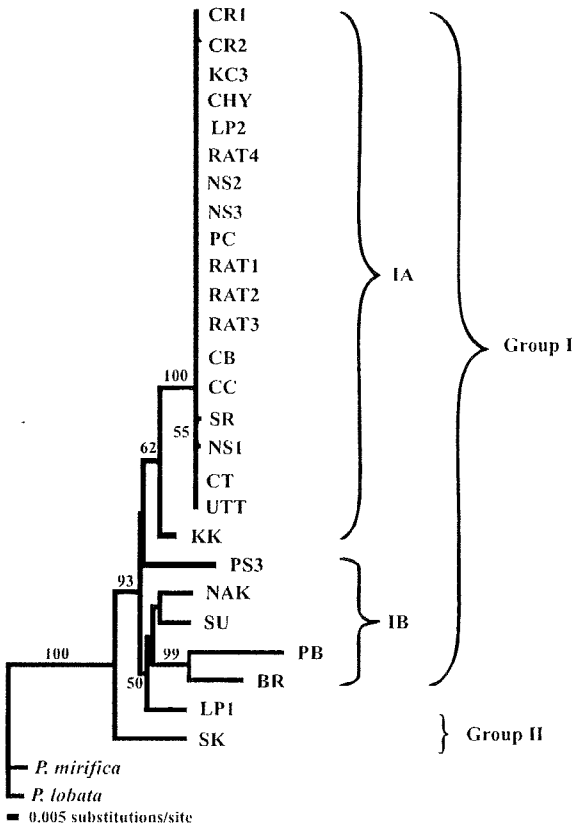


Fig. 6 A rooted phylogenetic tree of *trn*LF-cf sequences inferred by the NJ method. Bootstrap values are shown on the branches when they exceed 50%. *P. mirifica* and *P. lobata* are the outgroups for tree rooting.

CC from the distinct clade 2 (*trn*LF-cd) to clade 1A (*trn*LF-cf) is intriguing and perhaps suggests either recombination or chloroplast heterosis. Given that we direct sequenced the DNA and saw no evidence of multiple templates, to evoke some form of multiple sequence (heterosis) with two different copies of the *trn*LF region would require each copy to be defective at either the d or f primer site, which is possible, but unlikely.

Given the relatively conserved nature of the *trn*LF region, the data suggests that *B. superba* populations have potentially a relatively high level of genetic variation.

RAPD analysis

Preliminary RAPD analysis using 5 primers was used to evaluate if significant genetic diversity exists between *B. superba* populations as inferred from the results of DNA sequencing. Twenty three populations of *B. superba* were used. All 5 selected RAPD primers successfully amplified DNA from all tested *B. superba* populations producing reliably scoreable amplicons with the 5 primers which, interestingly, were all polymorphic across the 23 samples. Polymorphic bands amplified by each primer were 11, 10, 10, 10, and 7, respectively. No monomorphic bands were present suggesting a surprisingly high degree of genetic diversity. The results after scoring the 48 dominant markers were then analysed by using the neighbour-joining cluster to demonstrate the relationship among populations, using the Nei-Li genetic distance (PAUP*4.0)[8]. The derived phylogenetic tree

(Fig. 7) revealed two major separated groups (I and II). Group I (clade I) contained 19 populations of *B. superba*, had a 57% bootstrap value, and could be subdivided, albeit with only weak bootstrap support, into subclades 1A, 1B (TK and SR), and 1C (NAK, LY, and SV). This is congruent with the *trn*LF derived phylogenies. In contrast, there are 4 excepting samples. The first one is LB (clade 1C in *trn*LF to 1A in RAPD). The second one is the PB/PS3 pair which is still coresolved but moved from clade 1B (*trn*LF) to 1A (RAPD). The third one is the odd grouping of TK and SR in this RAPD based phylogeny. The last one is the unresolved KC1 sample. However, the KC1 sample does not belong to either Group I or II. Group II (Clade II) contains four populations of *B. superba* (KK, CR2, CT, and CHY) with a 65% bootstrap value which are all rather oddly from within the 1A clade of the *trn*LF phylogeny. It must be noted that this RAPD analysis not only lacks seven populations, but is also unrooted. This may account for some of the observed differences. Aside from these unresolved issues, it is obvious that group I has a relatively high genetic variation but this is not the case for those samples in group II. Also, with only five RAPD primers this preliminary study revealed nodes of closely related populations from the same province, in contrast to the chloroplast *trn*LF based sequence data. For example, the node of RAT1, RAT2, and RAT3 is close to the node of NS2 and NS3.

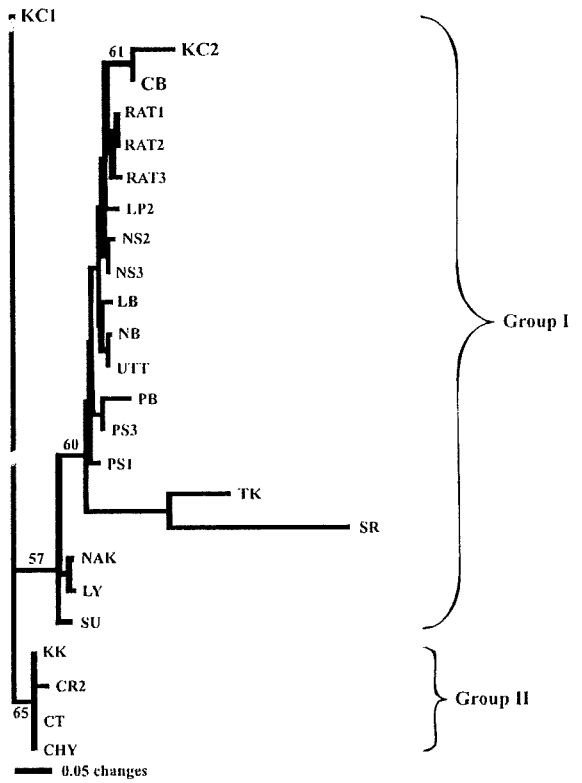


Fig. 7 A neighbour-joining tree of RAPD derived data using the Nei-Li genetic distance among 24 populations of *P. superba*.

These preliminary results should be useful in assessing the potential for genetic analysis for conservation strategies and correlating genetic relationships between geographic populations and bioactivity traits among Thai *B. superba* populations that may help to select the best population(s) of *B. superba* for pharmaceutical applications in the future.

Acknowledgements: This research was financially supported by following grants: Thailand Research Fund (RMU5180042), TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training (BRT T_149006), the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity of Chulalongkorn University and Asia Research Centre, Chulalongkorn University.

REFERENCES

1. Cherdshewasart W, Nimsakul N (2003) The clinical trial of *Butea superba* as an herbal alternative treatment for erectile dysfunction. *Asian J Androl* **5**, 243–6.
2. Moreno-Sánchez M (2004) Graphic approach for morphometric analysis of *Archaeopteria* leaves. *Ann Paleontol* **90**, 161–73.
3. Kazan K, Manners JM, Cameron DF (1993) Genetic variation in agronomically important species of Stylosanthes determined using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* **85**, 882–8.
4. Albach DC, Soltis PS, Soltis DE, Olmstead RG (2001) Phylogenetic analysis of asterias based on sequences of four genes. *Ann Missouri Bot Gard* **88**, 163–212.
5. Álvarez I, Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol* **29**, 417–34.
6. Cherdshewasart W, Subtang S, Dahlan W (2007) Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *J Pharmaceut Biomed Anal* **43**, 428–34.
7. Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* **17**, 1105–9.
8. Swofford DL (2000) *PAUP*. Phylogenetic analysis using Parsimony (* and other methods). Version 4.0b.4a*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

ลำดับที่ 3

Zoological Studies **49**(5): 632-639 (2010)

Zoological Studies

Comparison of Stream Frog Assemblages at Three Elevations in an Evergreen Forest, North-Central Thailand

Ratchata Phochayavanich[1], Harold K. Voris[2], Wichase Khonsue[1], Somying Thunhikorn[3], and Kumthorn Thirakhupt[1,*]

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn Univ., Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand*

[2]*Division of Amphibians and Reptiles, Department of Zoology, Field Museum of Natural History, Chicago, IL 60605, USA*

[3]*Phuluang Wildlife Research Station, Wildlife Research Division, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand*

(Accepted February 23, 2010)

Ratchata Phochayavanich, Harold K. Voris, Wichase Khonsue, Somying Thunhikorn, and Kumthorn Thirakhupt (2010) Comparison of stream frog assemblages at three elevations in an evergreen forest, north-central Thailand. *Zoological Studies* **49**(5): 632-639. A study of stream-dwelling frog assemblages was conducted at 800, 950, and 1250 m in elevation on the Nam San Noi stream, Phuluang Wildlife Sanctuary, north-central Thailand. Three transects, each 100 m long which ran along the stream, were designated at each elevation. Visual encounter surveys were conducted within each transect at night from June 2006 to May 2007. The Shannon-Wiener index of species diversity indicated that the diversity was highest at the lowest elevation and lowest at the highest elevation, while Morishita's similarity index indicated that species compositions at 800 and 950 m were very similar to each other, but both of them differed from that at the highest elevation (1250 m). Over all 3 elevations, 4 of the most common species (with abundances exceeding 1%) were least abundant at the highest elevation, while 2 species, *Limnonectes kuhlii* and *Odorrana aureola*, were most abundant at the highest elevation. The abundance of *Lim. gyldenstolpei* fluctuated among the 3 elevations. These results indicated that the frog compositions significantly differed between 2 elevation groups, that is between (a) the group consisting of 800 and 950 m and (b) that at 1250 m, and also that frog diversity tended to be highest at the lowest elevation. http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/49.5/632.pdf

Key words: Frog diversity, Species composition, Steam transects, Elevational differences.

Terrestrial environments are exposed to both temporal and spatial changes, often rapid, in local environmental gradients. Exploring patterns of species richness and biodiversity across these gradients is a key and central component of understanding the ecology and biogeography of each habitat and geographical domain. For this, elevational gradients in mountainous regions can show particularly large gradient changes in a relatively small area. Documenting the elevational patterns in species richness, and by comparative analysis with other such patterns, identifying the factors that govern them are essential matters for conservation management of any species or habitat in mountainous regions (Pimm and Brown 2004). However, patterns of species richness along elevational gradients considerably vary across the world, while the processes that govern them seem to be equally varied (Rahbek 1995 2005), preventing simple transfer of known data to conceptually similar habitats elsewhere. Nevertheless, the persistence of residential species in a specific area suggests that there are suitable available habitats for those species in that

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Tel: 662-2185259. Fax: 662-2185260.
E-mail:kumthorn.t@chula.ac.th

area. Thus, data on resident species assemblages in any given habitat can be used to determine the suitability of that habitat for those species by comparison to similar habitats in other locations.

Among terrestrial vertebrates, amphibians are regarded as a major group of animals that are sensitive to environmental change (Hopkins 2007). Amphibians are ectothermic animals that rely on environmental sources for heat gain. As a result, their options for activity are more limited than those of endothermic tetrapods, which maintain an elevated body temperature by means of metabolic heat production. Globally, temperature appears to be the main limiting factor in the diversity and distribution patterns of the herpetofauna (Zug et al. 2001, Huang and Tu 2008). However, on a local scale, there are several other factors that can additionally influence amphibian assemblages. The species richness of amphibians can be influenced by season (amphibian: Allmon 1991, Phochayavanich 2007), precipitation (herpetofauna: Owen 1989, frog: Woinarski et al. 1999), soil texture (herpetofauna: Woinarski et al. 1999), the existence of burned areas (herpetofauna: Giaretta et al. 1999), and litter volumes and moisture levels (frog: Allmon 1991). Moreover, amphibian compositions can be influenced by differences in land use cover (amphibian: Phochayavanich et al. 2008; herpetofauna: Vonesh 2001, Barrett and Guyer 2008). Many environmental factors change along elevation gradients (e.g., plant communities, water pH and temperature, ultraviolet-light exposure levels and canopy cover, relative humidity, litter type and cover, and air temperature). Relative abundances and species compositions of amphibian species that rely on these factors are thus predicted to change along such a gradient. Therefore, the objective of this work was to study and compare the composition of amphibian communities at 3 different elevations on Nam San Noi (NSN) stream in Phuluang Wildlife Sanctuary, Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Study area

Phuluang Wildlife Sanctuary is located in Loei Province, Thailand, at 17°3'-17°24'N and 101°16'-101°21'E. The average annual rainfall from 1954 to 2000 was 1229.1 mm, and most of the rain occurs from Apr. to Oct. The sanctuary is covered by a mixture of dry deciduous dipterocarp forest, mixed deciduous forest, dry evergreen forest, montane evergreen forest, coniferous forest, and tropical grassland. This study was conducted on NSN stream which is the main stream within the northern part of the sanctuary (Fig. 1). The stream was divided into 3 sections which were located at 800, 950, and 1250 m in elevation, and all were in the tropical evergreen forest. Intervals between sections were approximately 1.5-2 km. The principal forest types in this sanctuary are tropical dry evergreen forests at 500-900 m and tropical montane evergreen forests at 900-1400 m (Forest Research Center 2002). However, the forest type at 700-900 m can be defined as a sub-community of tropical dry evergreen forest or an ecotonal community composed of both forest types including some oak tree and other plant species similar to the tropical montane evergreen forest. Therefore, the plant communities at the 800 and 950 m sites were more similar to each other than either was to the 1250 m site.

Stream characteristics

The stream width, depth, and rate of water flow were measured at each transect and on each visit. The Kruskal-Wallis test was used to determine differences in stream characteristics among the 3 elevations. The average annual stream characteristics were grouped among transects by a cluster analysis (with Euclidean distance measurements using PC-ORD vers. 4.25 software; McCune and Mefford 1999). Elevations at which stream characteristics were similar were grouped together by the cluster analysis.

Study of frog assemblages

The amphibian species compositions were determined by visual encounter surveys on 100 m transects at 800, 950, and 1250 m on the NSN stream. Nine nights of surveys per month were conducted from June 2006 to May 2007 inclusively on three 100 m stream transects (with intervening distances of 250 m) at each of 3 elevations (800, 950, and 1250 m). The night surveys were conducted by 3 workers for 30 min per transect at 19:00-22:00. Gradients between the three 100 m transects at each of the 3 elevations (800, 950 and 1250 m) were modest in comparison to the overall gradients between the elevations of 800, 950, and 1250 m. The species and numbers of individuals were recorded to calculate the species diversity,

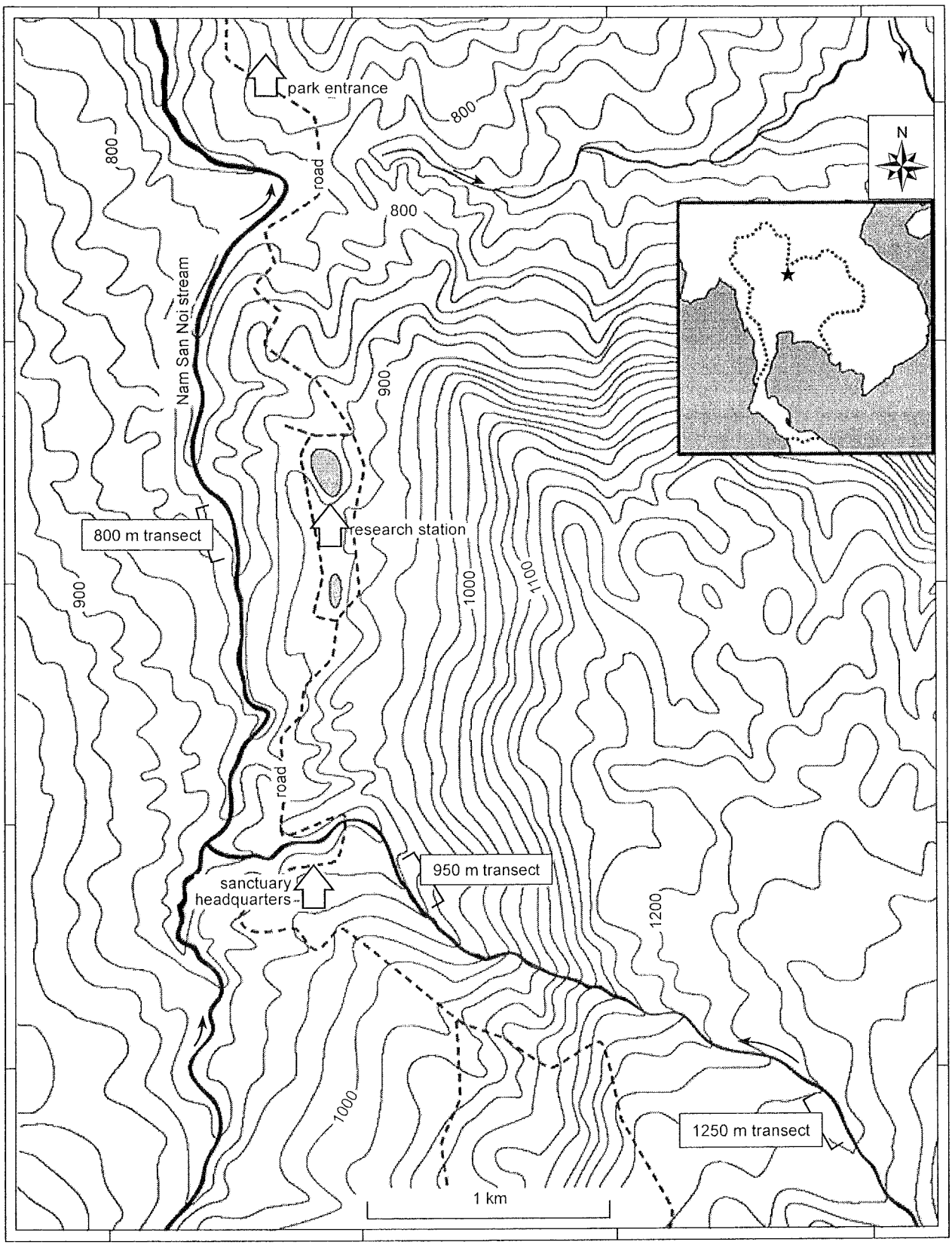


Fig. 1. Map of the study area at the Nam San Noi stream in the Phuluang Wildlife Sanctuary, showing the transect locations at 800 m asl, 950 m asl and 1250 m asl.

species similarity, and species abundance at each elevation. The species diversity was determined by the Shannon-Wiener index of species diversity and similarity was determined by Morishita's similarity index (Krebs 1999).

RESULTS

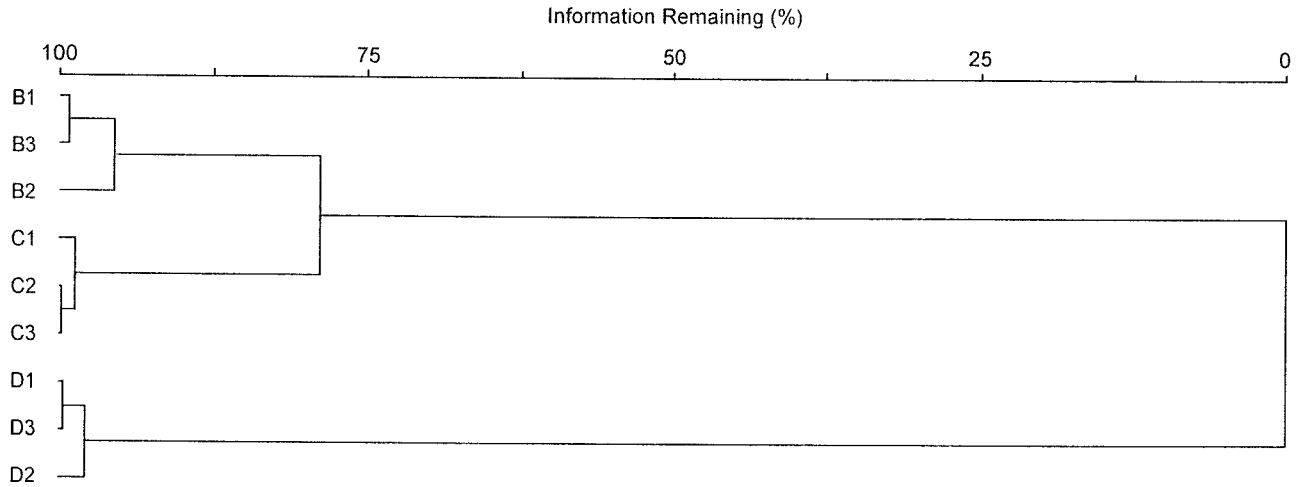
Stream characteristics

The average annual stream width, depth, and rate of water flow significantly differed among the 3 elevations, and all 3 parameters were highest at the lowest elevation (Table 1).

The cluster analysis (with Euclidean distance measurement using PC-ORD vers. 4.25 software) of environmental factors (stream width, depth, and rate of water flow) on the transects at the 3 different elevations on NSN stream indicated that transects were divided into 2 groups, accounting for 75% of the information (Fig. 2). The 1st group was comprised of the stream transects at 800 and 950 m, while the 2nd group was composed of the 3 transects at 1250 m. Thus, stream characteristics of the 800 and 950 m transects were more similar to each other than either was to the stream transects at 1250 m. It is noteworthy that this result was in full agreement with the vegetation similarities between the 2 lower transects compared to the upper one.

Species diversity

In total, 22 species of amphibians were found at NSN stream, Phuluang Wildlife Sanctuary between June 2006 and May 2007. They belong to 2 orders, Caudata and Anura, and 6 families:



B1 - B3 = 1st, 2nd, 3rd stream transects at 800 m asl
C1 - C3 = 1st, 2nd, 3rd stream transects at 950 m asl
D1 -D3 = 1st, 2nd, 3rd stream transects at 1250 m asl

Fig. 2. Similarity of environmental factors among transects at 3 different elevations at the Nam San Noi stream, Phuluang Wildlife Sanctuary, from June 2006 to May 2007, analyzed by cluster analysis with Euclidean distance measurement using PC-ORD version 4.25 software. 1-3 represent the 1st, 2nd, and 3rd stream transects at elevation sites (B) 800, (C) 950 and (D) 1250 m asl, respectively.

Table 1. Stream characteristics (mean ± S.E.) at 3 elevations on Nam San Noi stream from June 2006 to May 2007. Stream width, depth, and flow rate significantly differed among elevations, by the Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.05$

Elevation	800 m	950 m	1250 m
Stream width (m)	9.22 ± 0.70	6.45 ± 0.45	2.55 ± 0.30
Stream depth (m)	0.91 ± 0.08	0.39 ± 0.03	0.27 ± 0.03
Rate of stream flow (m/s)	0.81 ± 0.11	0.49 ± 0.06	0.21 ± 0.05

the Dicroglossidae, Megophryidae, Microhylidae, Ranidae, Rhacophoridae, and Salamandridae. *Hylarana nigrovittata* had the highest abundance (44.0%), followed by *Limnonectes kuhlii* (24.4%), *Odorrana chloronota* (15.4%), *Leptolalax pelodytoides* (7.4%), *Limnonectes gyldenstolpei* (3.3%), *Microhyla berdmorei* (1.8%), and *Odorrana aureola* (1.8%) (Fig. 3). The Shannon-Wiener index of species diversity for all observations was a modest 1.61 reflecting a substantial amount of unevenness among the species abundances. Nine species represented > 1% of the total abundance and were considered common species for the purposes of figure 4. The percentage abundance of each of the other 13 other species was < 1%, and these are not shown in figure 4. Figure 4 illustrates that at each elevation, only 1-3 species dominated with 10% or more of the composition.

Species compositions and abundances at different elevations

(a) 800 m: Seventeen species of amphibians were found at this elevation with 7 species having > 1% relative abundances (Table 2). *Hylarana nigrovittata* (Hn) had the highest abundance (50.1%), followed by *O. chloronota* (Oc) (19.6%), *Lep. pelodytoides* (Lp) (12.3%), *Lim. kuhlii* (Lk) (7.9%), *Lim. gyldenstolpei* (Lg) (4.3%), *M. berdmorei* (Mb) (1.9%), and *P. leucomystax* (Pl) (1.2%) (Fig. 4). The percentage abundances for each of the other 10 species were < 1%. The Shannon-Wiener index of species diversity was the highest of the 3 sites, at 1.54.

(b) 950 m: Fifteen species of amphibians were found at this elevation with 7 species with > 1% relative abundance level (Table 2). *Hylarana nigrovittata* had the highest abundance (56.3%), followed by *O. chloronota* (19.0%), *Lim. kuhlii* (10.4%), *Lep. pelodytoides* (7.1%), *M. berdmorei*

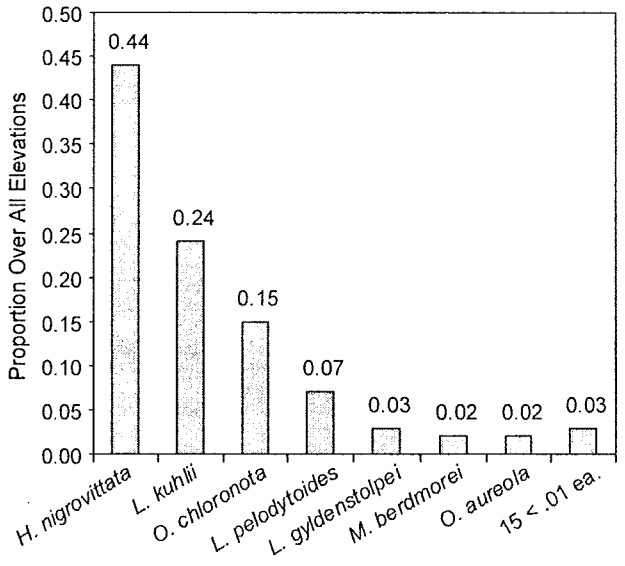


Fig. 3. Proportion of each of the 7 common species at all 3 elevations of Nam San Noi stream, Phuluang Wildlife Sanctuary, from June 2006 to May 2007. The remaining 15 species, whose individual proportions are less than 0.01 each, are shown pooled together on the lower right side. Numbers above each bar show the exact relative proportion.

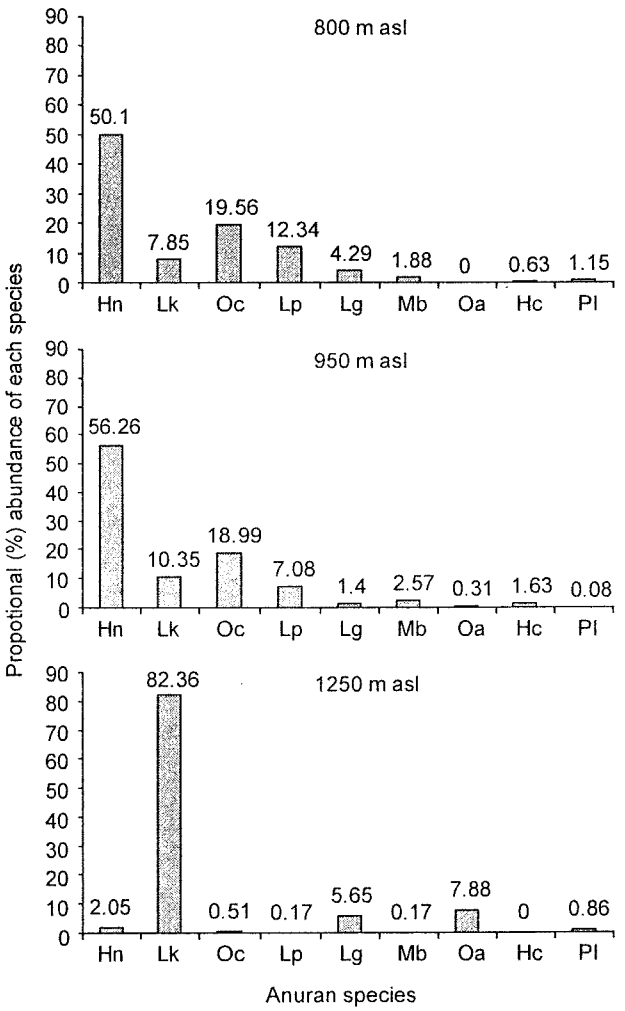


Fig. 4. Percentage abundance of each of the 9 common (in at least one of the 3 elevations) species at each elevation at Nam San Noi stream, Phuluang Wildlife Sanctuary, from June 2006 to May 2007. Species abbreviations are: *Hylarana nigrovittata* (Hn), *Limnonectes kuhlii* (Lk), *Odorrana chloronota* (Oc), *Leptolalax pelodytoides* (Lp), *Limnonectes gyldenstolpei* (Lg), *Microhyla berdmorei* (Mb), *Odorrana aureola* (Oa), *Hylarana cubitalis* (Hc) and *Polypedates leucomystax* (Pl).

(2.6%), *H. cubitalis* (Hc) (1.6%), and *Lim. gyldenstolpei* (1.4%), (Fig. 4). The percentage abundances of the other 8 species were each < 1%. The Shannon-Wiener index of species diversity was 1.38.

(c) 1250 m: Ten species of amphibians were found at this elevation (Table 2). *Limnonectes kuhlii* had the highest abundance (82.36%), followed by *O. aureola* (Oa) (7.88%), *Lim. gyldenstolpei* (5.65%), and *H. nigrovittata* (2.05%) (Fig. 4). The percentage abundances of the remaining 6 species were each < 1%. The Shannon-Wiener index of species diversity (0.71) was the lowest at this elevation.

Combining the data from the 3 elevations, 22 species were found, of which 7 had a total relative abundance of > 1%. Four of the 7 species with a total abundance of > 1% showed their lowest abundance at the highest elevation (1,250 m). *Limnonectes kuhlii* and *O. aureola* were the 2 exceptions, with their maximum abundances being found at the highest elevation. The abundances of *Lim. gyldenstolpei* fluctuated among these elevations, and *Xenophrys major* was only found at 950 m.

Similarities of amphibian species compositions among elevations

Values of Morishita's similarity index between 800 and 950, 950 and 1250, and 800 and 1250 m were 0.99, 0.20, and 0.16, respectively. Thus, the species compositions at 800 and 950 m were very similar to each other, but both of them differed from the species composition at 1250 m.

DISCUSSION

Species diversity and abundance of amphibians at different elevations

Overall, across all 3 surveyed elevations, *H. nigrovittata* had the highest abundance in this stream. However, comparing the relative abundance of each species among the 3

Table 2. Number of observed and the percentage abundance of each of the 22 species of amphibians found on transects at 3 elevations on Nam San Noi stream from June 2006 to May 2007

Family	Species	800 m No. (%)	950 m No. (%)	1250 m No. (%)	Total No. (%)
Salamandridae	*Tylototriton verrucosus*	-	-	1 (0.17)	1 (0.04)
Megophryidae	*Leptobrachium smithi*	6 (0.63)	-	-	6 (0.21)
	Leptolalax pelodytoides	118 (12.34)	91 (7.08)	1 (0.17)	210 (7.43)
	Xenophrys major	-	9 (0.70)	-	9 (0.32)
Dicroglossidae	*Limnonectes gyldenstolpei*	41 (4.29)	18 (1.40)	33 (5.65)	92 (3.26)
	Limnonectes kuhlii	75 (7.85)	133 (10.35)	481 (82.36)	689 (24.39)
	Limnonectes limborgi	-	1 (0.08)	-	1 (0.04)
Ranidae	*Hylarana cubitalis*	6 (0.63)	21 (1.63)	-	27 (0.96)
	Hylarana nigrovittata	479 (50.10)	723 (56.26)	12 (2.05)	1214 (42.97)
	Hylarana taipehensis	1 (0.10)	1 (0.08)	-	2 (0.07)
	Odorrana aureola	-	4 (0.31)	46 (7.88)	50 (1.77)
	Odorrana chloronota	187 (19.56)	244 (18.99)	3 (0.51)	434 (15.36)
Rhacophoridae	*Aquixalus bisacculus*	5 (0.52)	3 (0.23)	-	8 (0.28)
	Chiromantis vittatus	3 (0.31)	-	-	3 (0.11)
	Philautus parvulus	-	2 (0.16)	-	2 (0.07)
	Polypedates leucomystax	11 (1.15)	1 (0.08)	5 (0.86)	17 (0.6)
	Rhacophorus feae	1 (0.10)	-	-	1 (0.04)
Microhylidae	*Kalophrynus interlineatus*	1 (0.10)	-	1 (0.17)	2 (0.07)
	Kaloula pulchra	2 (0.21)	-	-	2 (0.07)
	Microhyla berdmorei	18 (1.88)	33 (2.57)	1 (0.17)	52 (1.84)
	Microhyla fissipes	1 (0.10)	-	-	1 (0.04)
	Micryletta inornata	1 (0.10)	1 (0.08)	-	2 (0.07)
Total number of individuals		956	1285	584	2825
Total number of species		17	15	10	22

elevations, only *H. nigrovittata* had the highest abundances at the low elevations (800 and 950 m), while *Lim. kuhlii* was the most abundant frog at the highest elevation (1250 m). This result is very similar to a previous study in the Lam Ta Kong stream at Khao Yai National Park, Nakhon Ratchasima Province, where *H. nigrovittata* also had the highest overall abundance and was the most abundant frog at low elevations (400-900 m), while *Lim. kuhlii* was the most abundant frog at elevations of > 1000 m (Kongjaroen 2007).

In this study, the species diversity of amphibians was higher at the lower elevations. Parris and McCarthy (1999) reported that the upstream catchment volume was a significant explanatory variable for the species richness of frog assemblages in forest streams in southeastern Queensland, Australia. It was correlated with stream width, stream substrate, permanence of the water, and rates of water flow. Stream-breeding frogs require a stream that is large enough to retain water for a sufficient length of time for their tadpoles to develop to metamorphosis. Thus, large streams usually provide suitable breeding habitats for a greater range of frog species than small streams, because larger streams typically contain water for longer periods of time and allow for a greater diversity of microhabitats and food items to support more niche-differentiated (non-competing) amphibian species. Thus, it can be speculated that the low species diversity at 1250 m observed in this study site was at least in part due to having the lowest stream width, permanence of water, and rates of water flow.

Similarity of amphibian communities among elevations

The similarity index indicates that the species composition of amphibians at the 2 lowest elevations (800 and 950 m) were very similar to each other, but both differed from the composition at the highest elevation (1250 m). Some previous studies (Inger and Voris 1993, Parris and McCarthy 1999) reported that the compositions of frog assemblages on forest streams were correlated with the stream size and gradient. It was observed in this study that the stream width and gradient at 800 and 950 m in elevation were similar, whereas both of them differed from the 1250 m site in these parameters. Thus, these physical factors may at least in part explain why the species compositions at 800 and 950 m were very similar, whereas both of them differed from the composition at 1250 m. However, differences in other biotic and abiotic factors such as the vegetation and microhabitats may also more dramatically differ between the 1250 m site and the 2 lower sites which were more closely related in terms of forest cover type.

Conservation considerations

Generally speaking, in Thailand, high-elevation areas are less disturbed than low-elevation areas which are more likely to be strongly impacted by human activities such as agriculture. The results of this study conducted entirely within a sanctuary indicated that lower sections of the stream (800-950 m) tended to have higher species diversities than the higher sections (1250 m). Thus, these results suggest that there is much to be gained by protecting low-elevation sites from human impacts. In addition, the results demonstrated that several species were restricted to only 1 elevation. This observation suggests that protection of some forest at all elevations will help ensure that all elements of the overall amphibian species diversity will be conserved.

Acknowledgments: This project was supported by the Thai government budget for 2006, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity, the Center of Excellence in Biodiversity, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn Univ. (CEB_M_24_2006), the John D. and Catherine T. MacArthur Foundation under collaboration with the Field Museum, Chicago, IL, USA and the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, National Center for Genetic Enginnering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, grant BRT T_250002. We would like to thank the staff of Phuluang Wildlife Research Station for their kind assistance and cooperation and for providing facilities during the field surveys. In addition, we would like to thank Mr. C. Pongchareon for his assistance in conducting the night surveys and Dr. R. Butcher for his comments and suggestions on the manuscript.

REFERENCES

Allmon WD. 1991. A plot study of forest floor litter frogs, Central Amazon, Brazil. J. Trop. Ecol. **7:** 503-522.

Barrett K, C Guyer. 2008. Differential responses of amphibians and reptiles in riparian and stream habitats to land use disturbances in western Georgia, USA. Biol. Conserv. **141:** 2290-2300.

Forest Research Center. 2002. Final report: database and management plan of Phuluang Wildlife Sanctuary. Bangkok, Thailand: Forest Research Center, Faculty of Forestry, Kasetsart Univ.

Giaretta AA, KG Facure, RJ Sawaya, JHDeM Meyer, N Chemin. 1999. Diversity and abundance of litter frogs in a montane forest of southeastern Brazil: seasonal and altitudinal changes. Biotropica **31:** 669-674.

Hopkins WA. 2007. Amphibians as models for studying environmental change. Inst. Lab. Anim. Res. J. **48:** 270-277.

Huang S, M Tu. 2008. Cold tolerance and altitudinal distribution of *Takydromus* lizards in Taiwan. Zool. Stud. **47:** 438-444.

Inger RF, HK Voris. 1993. A comparison of amphibian communities through time and from place to place in Bornean forests. J. Trop. Ecol. **9:** 409-433.

Kongjaroen W. 2007. Species diversity and altitudinal distribution of amphibians along Lam Ta Klong Watershed Area in Khao Yai National Park. Master's thesis, Department of Forest Biology, Faculty of Forestry, Kasetsart Univ, Bangkok, Thailand.

Krebs CJ. 1999. Ecological methodology. Menlo Park, CA: Addison-Welsey Educational Publishers.

McCune B, MJ Mefford. 1999. Multivariate Analysis of Ecological Data, Version 4.25. Gleneden Beach, Oregon: MjM Software.

Owen JG. 1989. Patterns of herpetofaunal species richness: relation to temperature, precipitation and variance in elevation. J. Biogeogr. **16:** 141-150.

Parris KM, MA McCarthy. 1999. What influences the structure of frog assemblages at forest streams? Aust. J. Ecol. **24:** 495-502.

Phochayavanich R. 2007. Species diversity and seasonal activity of amphibians at different elevations in Nam San Noi stream, Phuluang Wildlife Sanctuary. Master's thesis, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand.

Phochayavanich R, K Thirakhupt, HK Voris. 2008. Species diversity and abundance of amphibians in stream flow across forest and agricultural habitats at Phuluang Wildlife Sanctuary, Loei Province. J. Wildlife Thailand **15:** 17-28. (in Thai with English abstract)

Pimm SL, JH Brown. 2004. Domains of diversity. Science **304:** 831-833.

Rahbek C. 1995. The elevational gradient of species richness; a uniform pattern? Ecography **18:** 200-205.

Rahbek C. 2005. The role of spatial scale and the perception of large scale species richness patterns. Ecol. Lett. **8:** 224-239.

Vonesh J. 2001. Patterns of richness and abundance in a tropical African leaf-litter herpetofauna. Biotropica **33:** 502-510.

Woinarski JCZ, A Fisher, D Milne. 1999. Distribution patterns of vertebrates in relation to an extensive rainfall gradient and variation in soil texture in the tropical savannas of the Northern Territory, Australia. J. Trop. Ecol. **15:** 381-398.

Zug GR, LJ Vitt, JP Caldwell. 2001. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. San Diego, CA: Academic Press.

ลำดับที่ 4

ความหลากชนิด และความชุกชุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกระหว่างลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่า และพื้นที่เกษตรกรรมบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย

SPECIES DIVERSITY AND ABUNDANCE OF AMPHIBIANS IN STREAM FLOW ACROSS FOREST AND AGRICULTURAL HABITATS AT PHU LUANG WILDLIFE SANCTUARY, LOEI PROVINCE

รัชต โปชยะวณิช[1/]* กำธร ธีรคุปต์[1/] Harold K. Voris[2/]

Ratchata Phochayavanich[1/]* Kumthorn Thirakhupt[1/] Harold K. Voris[2/]

ABSTRACT

Species diversity and abundance frogs in the Num San Noi stream, Phu Luang Wildlife Sanctuary was studied by visual encounter surveys from May 2006 to May 2007. Six 100 m stream transects, 3 in forest and 3 in agricultural areas were surveyed once per month. The first agricultural stream transect (AST) located close to the edge of the forest was followed by the 2nd and 3rd transects with the distance of 250 m intervals far from the forest. All forest stream transects (FST) were located far from the forest edge more than 2 km. All transects were located at 750-800 m asl. The Shannon-Wienner's diversity index indicated that the diversity in agricultural stream was higher than the forest stream. The Simplified Morishita's similarity index indicated that the species composition of the 1st AST, closest to the forest edge, was the most similar to the FSTs, 75-87 %, whereas the species composition of the other 2 ASTs (far from the forest edge) were less similar to FSTs, 49-53 %. In the ASTs, abundances of each of 5 forest species were significantly lower whereas 6 urban species were significantly higher when compared with the FSTs ($p \leq 0.05$). It can be concluded that the species composition and the survival of 5 forest species were influenced by the stream bank changing from forest to the agricultural area. Therefore, in order to ensure the forest stream amphibian persistence, the stream bank in the protected area should be maintained to be natural.

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากชนิดและความชุกชุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกระหว่างลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรกรรมที่บริเวณลำห้วยน้ำสานน้อย ซึ่งอยู่ในพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2549 ถึง พฤษภาคม 2550 โดยวางเส้นสำรวจตามแนวลำธาร ความยาวเส้นละ 100 เมตร จำนวน 6 เส้น แยกเป็นในพื้นที่ป่า 3 เส้น และพื้นที่เกษตรกรรม 3 เส้น ซึ่งทุกเส้นสำรวจของลำธารที่ไหลผ่านป่าจะอยู่ห่างจากรอยต่อระหว่างป่ากับพื้นที่เกษตรกรรมไม่น้อยกว่า 2 กิโลเมตร ขณะที่เส้นสำรวจตามแนวลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมเส้นแรกทำการวางบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมที่ติดกับป่า และวางเส้นสำรวจอีก 2 เส้นถัดไปโดยเว้นระยะระหว่างเส้นสำรวจประมาณ 250 เมตรตามแนวลำธาร ทำการสำรวจภาคสนามเดือนละ 1 ครั้ง โดยใช้วิธีการสำรวจแบบพบเห็นตัวโดยตรงในเวลากลางคืน ทำการบันทึกชนิดและจำนวนตัวที่พบ จากการศึกษาพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้งสิ้น 24 ชนิด โดยเส้นสำรวจตามแนวลำธารที่ไหลผ่านป่าพบ 17 ชนิด ขณะที่เส้น

[1/] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330; *e-mail: voice_of_anura@hotmail.com

[2/] Division of Amphibians and Reptiles, Department of Zoology, Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois 60605 USA

สำรวจตามแนวลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมพบ 21 ชนิด ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Wiener (H')ของเส้นทางสำรวจบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรม (H' = 2.29) มากกว่าบริเวณลำธารในพื้นที่ป่า (H' = 1.54) และค่าดัชนีความคล้ายคลึงแบบ Simplified Morishita แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบบริเวณเส้นสำรวจแรกของพื้นที่เกษตรกรรม (เส้นสำรวจที่ติดกับป่า) มีความคล้ายคลึงกับของเส้นสำรวจในพื้นที่ป่ามากที่สุด (75-87%) ขณะที่เส้นสำรวจในพื้นที่เกษตรกรรมอีก 2 เส้น กับเส้นสำรวจในป่ามีความคล้ายคลึงกันน้อยกว่า (49-53%) และเมื่อเปรียบเทียบความชุกชุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในแต่ละชนิดระหว่าง 2 พื้นที่ พบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 11 ชนิดที่มีความชุกชุมแตกต่างกันระหว่าง 2 พื้นที่อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยในพื้นที่เกษตรกรรมพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 6 ชนิดมีความชุกชุมสูงกว่าในป่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งปกติเป็นชนิดที่สามารถพบได้ในหลายถิ่นที่อยู่อาศัย (ป่า พื้นที่เกษตรกรรม หรือแหล่งชุมชน) และในพื้นที่ป่าพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 5 ชนิดมีความชุกชุมสูงกว่าในพื้นที่เกษตรกรรมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งปกติเป็นชนิดที่สามารถพบได้เฉพาะในป่า จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์พื้นที่ด้านข้างลำธารจากป่ามาเป็นพื้นที่เกษตรกรรมกรรม ส่งผลต่อองค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณลำธาร และส่งผลต่อความอยู่รอดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อาศัยอยู่ได้เฉพาะในพื้นที่ป่าอย่างน้อย 5 ชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องมีมาตรการฟื้นฟูลำห้วยลำธารในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมให้กลับมามีสภาพนิเวศที่สมบูรณ์เพื่อเอื้ออำนวยต่อการดำรงชีพของสัตว์ป่ากลุ่มนี้ต่อไป

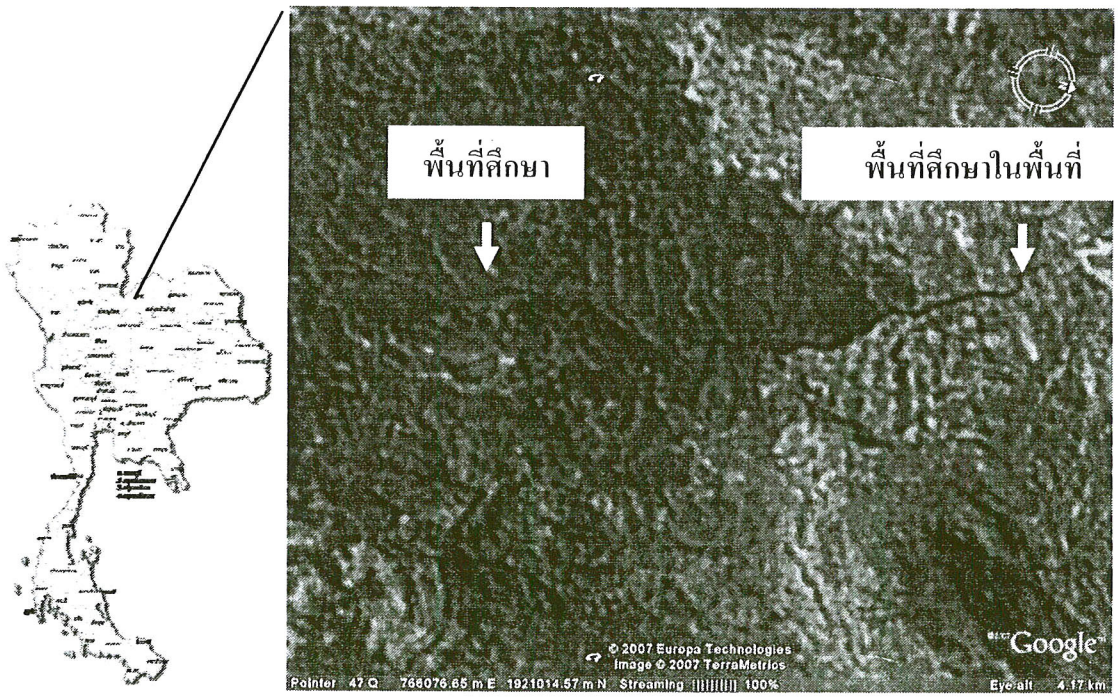
คำนำ

ปัจจุบันนี้ปัญหาการลดลงของประชากรสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเกิดขึ้นทั่วโลก ซึ่ง Stuart *et al.* (2004) ได้แบ่งกลุ่มสาเหตุของการเกิดปัญหานี้เป็น 3 สาเหตุคือ 1) การล่ามากเกินขนาด 2) การลดลงของถิ่นที่อยู่อาศัย และ 3) กลุ่มสาเหตุที่ยังไม่มีหลักฐานยืนยันแน่ชัด เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาวะอากาศของโลก และการเพิ่มขึ้นของชนิดพันธุ์ต่างถิ่น เป็นต้น โดยประเทศไทยถูกระบุว่าปัญหานี้เกิดมาจากการล่ามากเกินขนาด อย่างไรก็ตามประชากรมนุษย์ในประเทศยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ความต้องการพื้นที่ทำกินและที่อยู่อาศัยจึงเพิ่มขึ้นเช่นกัน การเปลี่ยนแปลงพื้นที่ธรรมชาติมาเป็นพื้นที่ที่มนุษย์ต้องการจึงเพิ่มขึ้นตามมา ดังนั้นปัญหาการลดลงของถิ่นที่อยู่อาศัยก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ควรให้ความสำคัญ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงถิ่นที่อยู่อาศัยจากพื้นที่ธรรมชาติมาเป็นพื้นที่ที่มนุษย์สร้างขึ้น ย่อมส่งผลกระทบต่อสัตว์ในพื้นที่ดังกล่าวอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ แต่ลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมมิได้ถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นพื้นเกษตรกรรมโดยตรง จึงเป็นที่น่าสนใจว่าการเปลี่ยนแปลงพื้นที่สองข้างลำธารจากพื้นที่ธรรมชาติมาเป็นพื้นที่เกษตรกรรมจะส่งผลอย่างไรต่อชนิดและจำนวนสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อาศัยอยู่บริเวณลำธารนั้น ซึ่งอาจเป็นส่วนช่วยในการตัดสินใจเกี่ยวกับการจัดการการใช้ประโยชน์พื้นที่ด้านข้างลำธารต่อไป ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบความหลากชนิดและความชุกชุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกระหว่างลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรกรรม บริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วิธีการสำรวจในภาคสนาม

การศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกลำน้ำสานน้อย (ภาพที่ 1) เป็นกรณีศึกษา ลำน้ำสานน้อยเป็นลำน้ำสายหลักทางทิศเหนือของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง โดยลำน้ำสายนี้ไหลจากพื้นที่ป่าธรรมชาติออกสู่พื้นที่เกษตรกรรมที่ระดับความสูงประมาณ 750 เมตรจากระดับน้ำทะเล เพื่อจำกัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมให้ใกล้เคียงกันจึงเลือกพื้นที่ศึกษาตามแนวลำธารในป่าธรรมชาติและพื้นที่เกษตรกรรมที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลที่ใกล้เคียงกัน การศึกษาในครั้งนี้วางเส้นสำรวจทั้งหมด 6 เส้น ความยาวเส้นละ 100 เมตร โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 3 เส้น กลุ่มแรกวางตามแนวลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรม เส้นสำรวจแรกเริ่มวางที่รอยต่อระหว่าง 2 พื้นที่ จากนั้นเว้นระยะห่างตามแนวลำธาร 250 เมตร แล้วจึงวางเส้นที่ 2 และเส้นที่ 3 ทำในลักษณะเดียวกัน และกลุ่มที่ 2 วางตามแนวลำธารที่ไหลผ่านป่าธรรมชาติ เส้นสำรวจในป่าธรรมชาติทั้ง 3 เส้น วางห่างจากรอยต่อระหว่าง 2 พื้นที่มากกว่า 2 กิโลเมตร โดยวางเส้นสำรวจเว้นระยะห่าง 250 เมตร เช่นเดียวกับในพื้นที่เกษตรกรรม สำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกโดยใช้วิธีการสำรวจแบบพบเห็นตัวโดยตรงในเวลากลางคืนตามเส้นสำรวจ ดำเนินการสำรวจเดือนละ 1 ครั้ง โดยเริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2549 จนถึงเดือนพฤษภาคม 2550 บันทึกชนิดและจำนวนสะเทินน้ำสะเทินบกที่พบในแต่ละชนิด



ภาพที่ 1 แสดงลำน้ำสานน้อยที่ไหลผ่านพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรกรรม เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย

2. วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

2.1 วิเคราะห์ความหลากชนิดโดยใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Wiener (Krebs, 1999) ซึ่งคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

$$H' = \sum_{i=1}^{s} (p_i)(\ln p_i)$$

เมื่อ H' คือ ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Weiner

s คือ จำนวนชนิด

p_i คือ สัดส่วนจำนวนตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดต่อจำนวนตัวทุกชนิดรวมกัน

2.2 วิเคราะห์ความคล้ายคลึงของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกโดยใช้ค่าดัชนีความคล้ายคลึงแบบ Simplified Morishita (Krebs, 1999) ซึ่งคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

$$C_H = \frac{2\sum X_{ij}X_{ik}}{[(\sum X^2_{ij}/N^2_j)+(\sum X^2_{ik}/N^2_k)]N_jN_k}$$

เมื่อ C_H คือ ดัชนีความคล้ายคลึงแบบ Simplified Morishita

X_{ij}, X_{ik} คือ จำนวนตัวของชนิด i ในกลุ่มตัวอย่างที่ j และกลุ่มตัวอย่างที่ k ตามลำดับ

$N_j = \sum X_{ij}$ คือ จำนวนตัวรวมในกลุ่มตัวอย่างที่ j

$N_k = \sum X_{ik}$ คือ จำนวนตัวรวมในกลุ่มตัวอย่างที่ k

2.3 วิเคราะห์ความชุกชุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก โดยคำนวณจาก

ความชุกชุม = จำนวนตัวในแต่ละชนิดที่พบ/100 เมตร

และวิเคราะห์ความแตกต่างของความชุกชุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด และความแตกต่างของความชุกชุมรวมระหว่างสองพื้นที่ศึกษา โดยใช้ *Mann-Whitney U*-Test โดยใช้ค่าความชุกชุมเป็นจำนวนตัวที่พบในแต่ละเส้นสำรวจ (จำนวนตัว/100 เมตร)

ผลและวิจารณ์

ผลการศึกษา

1. ความหลากชนิด

จากการสำรวจพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้งหมด 24 ชนิด (ตารางที่ 1) การเปรียบเทียบจำนวนชนิดและดัชนีความหลากหลายระหว่าง 2 พื้นที่ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน คือในลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมทั้งสองค่ามีค่ามากกว่าในป่า โดยพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณลำธารที่

ไหลผ่านป่าทั้งสิ้น 17 ชนิด และพบบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมทั้งสิ้น 21 ชนิด โดยคำนวณค่าดัชนีความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่าได้ 1.54 และพื้นที่เกษตรกรรมได้ 2.29

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด และค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Wiener เปรียบเทียบระหว่างลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่า และพื้นที่เกษตรกรรม การจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานและชื่อวิทยาศาสตร์อ้างตาม Frost (2008)

ลำดับที่	ชนิด	ลำธารในพื้นที่ป่า (จำนวนตัว/100 เมตร: X±SE)	ลำธารในพื้นที่เกษตรกรรม (จำนวนตัว/100 เมตร: X±SE)
	วงศ์อึ่งกราย (Family Megophryidae)		
1	อึ่งกรายลายเลอะ (*Leptobrachium smithi*)	0.15±0.09	0.03±0.03
2	อึ่งกรายหนังปุ่ม (*Leptolalax pelodytoides*)*	3.03±0.59	0.41±0.13
3	อึ่งกรายห้วยเล็ก (*Xenophrys parva*)	0	0.03±0.03
	วงศ์คางคก (Family Bufonidae)		
4	คางคกบ้าน (*Duttaphrynus melanostictus*)*	0	0.10±0.05
	วงศ์กบ (Family Dicroglossidae)		
5	กบหนอง (*Fejervarya limnocharis*)*	0	0.56±0.14
6	กบหงอน (*Limnonectes gyldenstolpei*)	1.05±0.33	1.69±0.53
7	กบห้วยขาปุ่ม (*Limnonectes kuhlii*)*	1.92±0.39	0.13±0.07
8	กบกา (*Limnonectes limborgi*)	0	0.05±0.034
9	เขียดจะนา (*Occidozyga lima*)	0	0.05±0.04
	วงศ์เขียด (Family Ranidae)		
10	เขียดหูดำ (*Hylarana cubitalis*)	0.15±0.09	0.26±0.15
11	เขียดอ่อง (*Hylarana nigrovittata*)*	12.28±1.79	3.39±0.84
12	เขียดไต้หวัน (*Hylarana taipehensis*)*	0.03±0.03	2.39±0.78
13	กบชะง่อน (*Odorrana cf. chloronota*)*	4.80±0.54	2.36±0.58
	วงศ์ปาด (Family Rhachophoridae)		
14	ปาดลายเลอะ (*Aquixalus bisacculus*)*	0.13±0.07	0
15	ปาดจิ๋วสีม่วง (*Chiromantis vittatus*)	0.08±0.06	0.03±0.03
16	ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*)*	0.28±0.10	0.95±0.21
17	ปาดดอยอินทนนท์ (*Rhacophorus feae*)	0.03±0.03	0
	วงศ์อึ่งอ่าง (Family Microhylidae)		
18	อึ่งปุ่ม (*Kalophrynus interlineatus*)	0.03±0.03	0
19	อึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra*)	0.05±0.04	0.15±0.07
20	อึ่งแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*)	0.46±0.17	0.54±0.31
21	อึ่งลายเลอะ (*Microhyla butleri*)	0	0.18±0.18
22	อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*)*	0.03±0.03	0.54±0.18
23	อึ่งข้างดำ (*Microhyla heymonsi*)*	0	0.36±0.28
24	อึ่งหลังขีด (*Micryletta inornata*)	0.03±0.03	0.03±0.03
	จำนวนรวมของค่าเฉลี่ยจำนวนตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทุกชนิด*	24.51±2.11	14.21±2.16
	ดัชนีความหลากหลายของ Shannon-Wiener	1.54	2.29

* *Mann-Whitney U*-test, $p \leq 0.05$; X: ค่าเฉลี่ย; SE: ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

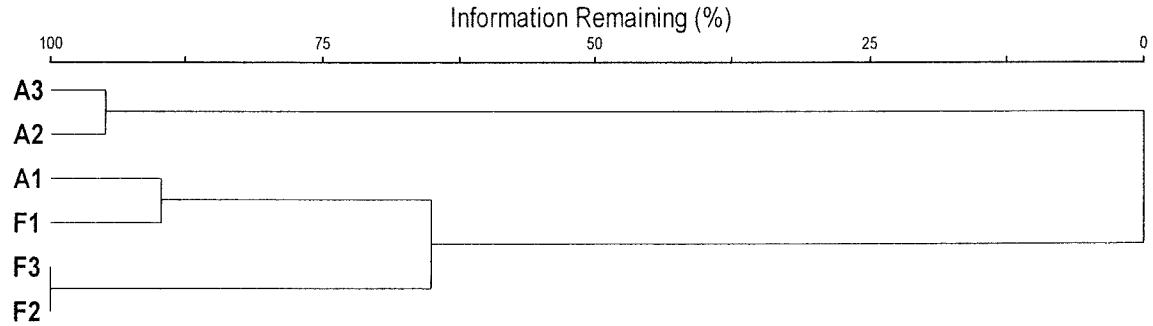
2. ความคล้ายคลึง

ดัชนีความคล้ายคลึงแบบ Simplified Morishita (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า องค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบในเส้นสำรวจทั้ง 3 เส้น บริเวณลำธารที่ไหลผ่านป่ามีความคล้ายคลึงกันมาก (94-98 %) ในขณะที่องค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบในเส้นสำรวจทั้ง 3 เส้นบริเวณลำธารที่ไหลผ่านเกษตรกรรมมีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างน้อย (51-71 %) เมื่อพิจารณาความคล้ายคลึงขององค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบระหว่าง 2 พื้นที่ พบว่า องค์ประกอบชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของเส้นสำรวจบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมเส้นที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของเส้นสำรวจบริเวณลำธารที่ไหลผ่านป่ามากที่สุด (74-87 %) และองค์ประกอบชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของเส้นสำรวจบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมเส้นที่ 2 และ 3 มีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของเส้นสำรวจบริเวณลำธารที่ไหลผ่านป่าน้อย (49-53 %) โดยสามารถเขียน Phenogram (ภาพที่ 2) แสดงความคล้ายคลึงได้โดยใช้การคำนวณแบบ Euclidean Distance Measurement

ตารางที่ 2 แสดงความคล้ายคลึงขององค์ประกอบของชนิดสะเทินน้ำสะเทินบกระหว่างลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรกรรม โดยใช้ค่าดัชนีความคล้ายคลึงแบบ Simplified Morishita

เส้นสำรวจ	F1	F2	F3	A1	A2	A3
F1	1	-	-	-	-	-
F2	0.97	1	-	-	-	-
F3	0.94	0.98	1	-	-	-
A1	0.87	0.80	0.74	1	-	-
A2	0.51	0.52	0.49	0.71	1	-
A3	0.50	0.53	0.50	0.63	0.57	1

หมายเหตุ F1-F3: เส้นทางสำรวจในพื้นที่ป่าเส้นที่ 1 - เส้นที่ 3; A1-A3: เส้นทางสำรวจในพื้นที่เกษตรกรรมเส้นที่ 1 - เส้นที่ 3



ภาพที่ 2 Phenogram แสดงความคล้ายคลึงขององค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกระหว่างลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรกรรมโดยใช้การคำนวณแบบ Euclidean Distance Meansurement

3. ความชุกชุม

เมื่อเปรียบเทียบค่าความชุกชุมรวมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกระหว่าง 2 พื้นที่ พบว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณลำธารที่ไหลผ่านป่ามีความชุกชุมรวมสูงกว่าบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อีกทั้งค่าความชุกชุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดจำนวน 11 ชนิด มีค่าแตกต่างกันระหว่าง 2 พื้นที่อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 1) โดยพบว่าความชุกชุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 5 ชนิดได้แก่ อึ่งกรายหนังปุ่ม กบห้วยขาปุ่ม เขียดอ่อง กบชะง่อน และปาดลายเลอะ บริเวณลำธารที่ไหลผ่านป่ามีค่าสูงกว่าบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรม และความชุกชุมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 6 ชนิดได้แก่ คางคกบ้าน กบหนอง เขียดไต้หวัน ปาดบ้าน อึ่งน้ำเต้า และอึ่งข้างดำ บริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมมีค่าสูงกว่าบริเวณลำธารที่ไหลผ่านป่า ทั้งนี้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดสำรวจพบเฉพาะในพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งเท่านั้น โดยเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดที่พบเฉพาะในลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่าจำนวน 3 ชนิด คือ ปาดลายเลอะ ปาดดอยอินทนนท์ และอึ่งปุ่ม และเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดที่พบเฉพาะในลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมจำนวน 7 ชนิด คือ อึ่งกรายห้วยเล็ก คางคกบ้าน กบหนอง กบกา เขียดจะนา อึ่งลายเลอะ และอึ่งข้างดำ

วิจารณ์ผลการศึกษา

1. ความหลากชนิด

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ทั้งจำนวนชนิดและค่าดัชนีความหลากหลายให้ผลไปในแนวทางเดียวกัน โดยจำนวนชนิดและความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมมีค่าสูงกว่าบริเวณลำธารที่ไหลผ่านป่า ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลไปในทิศทางตรงกันข้ามกับผลการศึกษาในอดีต ซึ่งเปรียบเทียบความหลากหลายของสัตว์กลุ่มนี้ระหว่างถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ และพื้นที่ที่ถูกรบกวน หรือถูกทำลาย เช่น การศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อาศัยอยู่ในถิ่นที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกันของ ยอดชาย (2544) ที่อุทยานแห่งชาติปางสีดา จังหวัดสระแก้ว พบว่าสัตว์กลุ่มนี้มีความหลากหลายในพื้นที่ป่าดิบแล้ง มากกว่าในทุ่งหญ้า ซึ่งทุ่งหญ้านี้เกิดขึ้นจากการบุกรุกป่าธรรมชาติในอดีต Gardner & Fitzherbert (2007) ศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อาศัยอยู่บริเวณเศษซากพืชระหว่างป่าดิบแล้ง และพื้นที่เพาะปลูก บริเวณ Katavi National Park, ทางตะวันตกของประเทศ Tanzania พบว่าการเพาะปลูกส่งผลให้ความหลากชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อาศัยอยู่บริเวณเศษซากพืชลดลง และ Bishop *et al.* (1999) ได้ศึกษาความหลากหลายของกบที่อาศัยอยู่บริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมเปรียบเทียบกับลำธารที่ไหลผ่านป่าธรรมชาติที่ลุ่มน้ำ Holland ประเทศ Canada พบว่าความหลากหลายของกบที่อาศัยอยู่บริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมมีค่าต่ำกว่าความหลากหลายของกบที่อาศัยอยู่บริเวณลำธารที่ไหลผ่านป่าอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาที่เป็นไปในทิศทางตรงกันข้ามกับการศึกษาในอดีต อาจเป็นเพราะ 2 สาเหตุสำคัญดังนี้

1) พื้นที่บริเวณสองข้างของเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมถูกเปลี่ยนแปลงเป็นพื้นที่ไร่ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไร่ข้าวโพด โดยหลังฤดูเก็บเกี่ยวซึ่งตรงกับฤดูแล้ง พื้นที่สองข้างลำธารนี้จะถูกเปิดโล่ง การเปิดโล่งของพื้นที่ในฤดูแล้งจะทำให้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อาศัยอยู่บริเวณนั้นสูญเสียน้ำเป็นปริมาณมาก เนื่องจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีผิวหนังที่น้ำซึมผ่านได้ดีมาก (Duellman & Trueb, 1994) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจึงจำเป็นต้องรักษาสมดุลน้ำในร่างกาย โดยสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอาจเคลื่อนที่จากบริเวณพื้นที่เปิดโล่งลงไปสู่บริเวณลำธารซึ่งมีความชื้น และปริมาณน้ำมากกว่า ทำให้ลำธารบริเวณนี้มีโอกาสพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดที่อาศัยอยู่บริเวณน้ำนิ่งเป็นหลักได้มากขึ้น เช่น อึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ ปาดบ้าน และคางคกบ้าน ทำให้เส้นทางสำรวจในพื้นที่เกษตรกรรมนี้มีโอกาสพบจำนวนชนิดสัตว์มากขึ้น

2) เส้นทางสำรวจตามแนวลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมตั้งอยู่ใกล้แนวรอยต่อระหว่างพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรกรรม จึงทำให้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อาศัยอยู่ในป่าสามารถกระจายตัวของออกมายังเส้นทางสำรวจตามแนวลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมได้ง่าย ในขณะที่เส้นทางสำรวจตามแนวลำธารในป่าตั้งอยู่ห่างจากแนวรอยต่อประมาณ 2 กิโลเมตร ทำให้เส้นทางสำรวจดังกล่าวไม่ได้รับผลกระทบจากการกระจายตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เกษตรกรรม ผลที่เกิดขึ้นในลักษณะนี้เรียกว่าผลกระทบจากแนวรอยต่อ (edge effect) ซึ่งปกติแล้วผลกระทบนี้จะส่งผลให้บริเวณพื้นที่แนวรอยต่อ มีความหลากหลายสูงขึ้น (Odum, 2005) ซึ่งเส้นทางสำรวจของลำธารในพื้นที่เกษตรกรรมของการศึกษาครั้งนี้ตั้งอยู่ใกล้แนวรอยต่อมาก จึงทำให้การสำรวจพบค่าความหลากหลายสูงกว่าที่ควรจะเป็น ดังนั้นการยืนยันผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงพื้นที่สองข้างลำธารต่อความหลากหลายของสัตว์กลุ่มนี้อาจจะชัดเจนขึ้นถ้ามีศึกษาเพิ่มเติม โดยการเลือกศึกษาบริเวณลำธารที่ตั้งอยู่ห่างจากแนวรอยต่อระหว่างสองสังคมชีวิตเป็นระยะทางที่มากพอที่จะไม่ได้รับผลกระทบจากแนวรอยต่อ

2. ความคล้ายคลึง

สาเหตุที่องค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณลำธารในป่ามีความคล้ายคลึงกันมาก อาจเป็นเพราะสภาพถิ่นที่อยู่อาศัยมีสภาพไม่แตกต่างกันมากนัก การสำรวจตามแนวลำธารในป่าจึงพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มที่เป็นกลุ่มสังคมเดียวกัน แตกต่างจากเส้นทางสำรวจของลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งมีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเส้นทางสำรวจในพื้นที่เกษตรกรรมมีความแตกต่างกันในด้านระยะห่างจากแนวขอบป่า ซึ่งระยะห่างจากแนวขอบป่าจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อการกระจายตัวออกมายังพื้นที่ด้านนอกของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ป่า คล้ายกับการศึกษาจำนวนหนึ่ง

ที่รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง Landscape structure กับการกระจายตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ซึ่งส่วนมากศึกษาใน Wood frogs และ Spotted salamanders พบว่าสัตว์ทั้งสองกลุ่มนี้ มักจะไม่เคลื่อนที่ออกมายังพื้นที่ที่ถูกทำลาย เช่น ทุ่งหญ้า ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ พื้นที่เปิดโล่ง รวมถึงถนน (Windmiller, 1996; Gibbs, 1998; deMaynadier & Hunter, 1999; Rothermel & Semlitsch, 2002; Regosin *et al.*, 2003; Marsh *et al.*, 2004 *อ้างตาม* Cushman, 2006) การศึกษาในครั้งนี้อาจได้รับผลกระทบจากความสามารถในการกระจายตัวดังกล่าว จึงส่งผลให้เส้นทางสำรวจของลำธารในพื้นที่เกษตรกรรมเส้นที่ 1 มีสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ป่ากระจายตัวออกมาได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับในป่ามากที่สุด เนื่องจากเป็นเส้นทางสำรวจที่ติดกับพื้นที่ป่า ด้วยเหตุนี้จึงทำให้องค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเส้นสำรวจนี้มีความคล้ายคลึงกับองค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในป่ามากที่สุด และส่งผลให้องค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเส้นทางสำรวจนี้แตกต่างจากองค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเส้นทางสำรวจของลำธารในพื้นที่เกษตรกรรมเส้นอื่นซึ่งตั้งอยู่ห่างจากป่าออกไป

3. ความชุกชุม

จากการศึกษาในครั้งนี้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดที่พบเฉพาะบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรม และชนิดที่พบความชุกชุมบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมสูงกว่าในป่าอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ คางคกบ้าน กบหนอง ปาดบ้าน อึ่งน้ำเต้า และอึ่งข้างดำ ส่วนใหญ่แล้วเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบได้ทั่วไปในหลายถิ่นที่อยู่อาศัย ดังการศึกษาของยอดชาย (2544) ที่ศึกษาความหลากหลายของสัตว์สะเทินบกใน 3 ถิ่นที่อยู่อาศัยบริเวณอุทยานแห่งชาติปางสีดา จังหวัดสระแก้ว พบว่า คางคกบ้าน กบหนอง ปาดบ้าน อึ่งน้ำเต้า และอึ่งข้างดำ สามารถพบได้ทั้งใน ป่าดิบแล้ง ป่าเต็งรัง และทุ่งหญ้า นอกจากนี้ยังมีเอกสารบางส่วนที่บันทึกถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์ 5 ชนิดนี้ว่าสามารถพบได้แม้กระทั่งในพื้นที่ที่ถูกรบกวนเช่น พื้นที่เกษตรกรรม และในเขตชุมชน หรือ เขตเมือง (ธัญญา, 2546; Inger, 1966; Inger & Stuebing, 2005) ในขณะที่สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ในการศึกษาครั้งนี้พบเฉพาะบริเวณลำธารในป่า และชนิดที่พบความชุกชุมบริเวณลำธารในป่าสูงกว่าในลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ อึ่งกรายหนังปุ่ม กบชะง่อน กบห้วยขาปุ่ม เขียดอ่อง อึ่งปุ่ม ปาดอินทนนท์ และปาดลายเลอะ ซึ่งจากการศึกษาความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในป่าดิบแล้ง ป่าเต็งรัง และทุ่งหญ้า ของ ยอดชาย (2544) พบว่า เขียดอ่อง และอึ่งปุ่มพบเฉพาะในป่าดิบแล้งเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีเอกสารบางส่วนที่บันทึกถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเหล่านี้ว่าโดยปกติแล้วจะพบอาศัยอยู่ตามถิ่นที่อยู่อาศัยที่เป็นธรรมชาติ เช่น กบห้วยขาปุ่มจะพบบริเวณลำธารในป่าซึ่งมีน้ำใส อึ่งปุ่ม (*Kalophrynus pleurostigma*) ซึ่งเป็นอึ่งปุ่มชนิดที่ใกล้เคียงกับที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ จะพบอาศัยอยู่ตามเศษซากพืชในป่า

เท่านั้น (Inger, 1966; Inger & Stuebing, 2005) เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ ปัจจัยแวดล้อมบางลักษณะในลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมอาจไม่เหมาะสม (ตารางที่ 3) เช่น

ตารางที่ 3 แสดงค่าปัจจัยแวดล้อมเปรียบเทียบระหว่างลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่า และพื้นที่เกษตรกรรม

ปัจจัยแวดล้อม	ลำธารในพื้นที่ป่า (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ลำธารในพื้นที่เกษตรกรรม (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
อุณหภูมิอากาศ (^{o}c)*	20.99±0.40	23.50±0.43
ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ (%)*	85.17±1.60	74.92±1.89
ความสามารถในการส่องผ่านของแสงในน้ำ (เมตร)*	0.81±0.06	0.64±0.06

* *Mann-Whitney U*-test, $p \leq 0.05$

1) อุณหภูมิที่สูง และความชื้นที่ต่ำ ลักษณะสภาพแวดล้อมนี้จะส่งผลให้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสูญเสียน้ำได้ง่าย ดังนั้นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่วิวัฒนาการมาในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ ความชื้นสูง เหมือนสภาพแวดล้อมในป่าดิบเขาจึงอาจจะไม่สามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมนี้ได้

2) ความสามารถในการส่องผ่านของแสงในน้ำ น้ำในลำธารบริเวณที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมจะมีความขุ่นมากในฤดูฝน ซึ่งเกิดจากการชะล้างและกัดเซาะหน้าดินมาก เมื่อแสงส่องผ่านน้ำได้น้อยก็จะไปลดอัตราการเจริญเติบโตของพืชที่ขึ้นตามวัตถุใต้น้ำ ซึ่งพืชเหล่านี้จะเป็นอาหารที่สำคัญของลูกอ๊อด ดังนั้นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ปกติมีลูกอ๊อดอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีปริมาณพืชน้ำที่ขึ้นที่วัตถุใต้น้ำสมบูรณ์จึงอาจจะไม่สามารถดำรงเผ่าพันธุ์ในพื้นที่ดังกล่าวได้

นอกจากสองปัจจัยดังกล่าว อาจเป็นเพราะปัจจัยอื่น เช่น การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ดังเช่นในการศึกษาของ Bishop *et al.*, (1999) ได้ศึกษาการเจริญของไข่ของกบที่อาศัยอยู่บริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมเปรียบเทียบกับลำธารที่ไหลผ่านป่าธรรมชาติ ในลุ่มน้ำ Holland ประเทศ Canada จากการศึกษาพบว่าอัตราการเจริญที่ผิดปกติของไข่ของ American toads และ Green frogs ในลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมมีค่าสูงกว่าในลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่ป่าธรรมชาติ เนื่องจากสารเคมีในกลุ่ม Organochlorine ที่พบในลำธารในพื้นที่เกษตรกรรมมีมากเกินค่ามาตรฐานความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ ทั้งนี้ Bishop และคณะได้รายงานเพิ่มเติมว่า นอกจากสารเคมีในกลุ่ม Organochlorine แล้วยังมีสารเคมีอีกหลายกลุ่ม เช่น แอมโมเนียและฟอสฟอรัสที่ไหลลงสู่ลำธาร ซึ่งเป็นสาเหตุ หรือมีส่วนช่วยให้ ความหนาแน่นและความสำเร็จในการสืบพันธุ์ของกบ 2 ชนิดดังกล่าวในลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมมีค่าต่ำกว่าในลำธารตามธรรมชาติ แต่เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้เก็บตัวอย่างน้ำบริเวณลำธารที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมมาวิเคราะห์หาสารเคมีจึงไม่สามารถยืนยันผลที่เกิดขึ้นจากสารเคมีที่อาจมีการปนเปื้อนในพื้นที่นี้ได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงพื้นที่สองข้างลำธารส่งผลต่อความหลากหลาย องค์ประกอบของชนิด และความชุกชุม แม้จะยังไม่สามารถยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงพื้นที่สองข้างลำธารส่งผลให้ความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกลดลงได้ อย่างไรก็ตามได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อพื้นที่สองข้างลำธารเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้องค์ประกอบของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งยังส่งผลต่อความอยู่รอดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอย่างน้อย 5 ชนิด ได้แก่ อึ่งกรายหนังปุ่ม กบชะง่อน กบห้วยขาปุ่ม เขียดอ่อง และปาดลายเลอะ ซึ่งเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบเฉพาะในป่าหรือพื้นที่ที่ติดกับป่าเท่านั้น ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องมีมาตรการฟื้นฟูลำห้วยลำธารในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ที่ไหลผ่านพื้นที่เกษตรกรรมให้กลับมามีสภาพนิเวศที่สมบูรณ์เพื่อเอื้ออำนวยต่อการดำรงชีพของสัตว์ป่ากลุ่มนี้ต่อไป

คำนิยม

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก the John D. and Catherine T. MacArthur Foundation โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_250002 และเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550 ภายใต้แผนงานวิจัยอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพ และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รหัสโครงการ CEB_M_24_2006 ขอขอบคุณคุณสมหญิง ทัฬหิกรณ์ คุณบุญมา ศรีบุรินทร์ และสถานีวิจัยสัตว์ป่าภูหลวงเป็นอย่างยิ่งสำหรับความช่วยเหลือด้านงานภาคสนาม ขอขอบคุณอาจารย์ประทีป ด้วงแค และคุณยอดชาย ช่วยเงิน ที่ได้ให้คำแนะนำในการเขียนเอกสารฉบับนี้

เอกสารอ้างอิง

ธัญญา จั่นอาจ. 2546. **คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย**. ด่านสุทธาการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ยอดชาย ช่วยเงิน. 2544. **ความหลากชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์เลื้อยคลาน ที่อุทยานแห่งชาติป่างสีดา จ.สระแก้ว**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Bishop, C. A., N. A. Mahony, J. Struger, P. Ng & K. E. Pettit. 1999. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland river watershed, Ontario, Canada (1990-1992). **Environmental Monitoring and Assessment** 57: 21-43.

Cushman, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. **Biological Conservation** 128: 231-240.

Duellman, W. E. & L. Trueb. 1994. **Biology of Amphibians**. The Johns Hopkins Press, London.

Frost, D. R. 2008. **Amphibian Species of the World: an Online References**. Version 5.2 (15 July, 2008). Electronic Database accessible at http:// research. amnh. org/ herpetology/ amphibia/ index.php. American Museum of Natural History, New York, USA. <accessed on 22 September 2008>

Gardner, T. A. & E. B. Fitzherbert. 2007. Spatial and temporal patterns of abundance and diversity of an East African leaf litter amphibian fauna. **Biotropica** 39: 105-113.

Inger, R. F. 1966. The systematics and zoogeography of the amphibian of Borneo. **Fieldiana: Zoology** 52: 1-402.3

Inger, R. F. & R. B. Stuebing. 2005. **A Field Guide to the Frogs of Borneo**. 2nd ed. Natural History Publications, Malaysia.

Krebs, C. J. 1999. **Ecological Methodology**. 2nd ed. Welsey educational, California.

Odum, E. P. & G. W. Barrett. 2005. **Fundamentals of Ecology**. 5th ed. Thomson Brooks/Cole, United States.

Stuart, S. N., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Young, A. S. L. Rodrigues, D. L.Fischman & R. W. Waller. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science** 306: 1783-1786.

ลำดับที่ 5

REPRODUCTIVE CYCLE OF THE RAINBOW WATER SNAKE *ENHYDRIS ENHYDRIS*, PRACHINBURI PROVINCE, THAILAND

Chattraphas Pongcharoen[1/]* Kumthorn Thirakhupt[1/] Harold K. Voris[2/]

ABSTRACT

From March 2006 to April 2007, two hundred and fifty eight *Enhydris enhydris* females at Ban Borthong, Kabinburi District, Prachinburi Province, were collected from local fisherman's nets for the investigation of reproductive cycle. Thirty-nine gravid females were found during nine-month period, February to October, from which the number of gravid females was highest in April. The mean of snout to vent length (SVL) and mass of gravid females was 560.49 ± 5.85 mm and 141.15 ± 64.61 gram, respectively. Mean clutch size was 13.07 ± 5.17 embryos, ranging from 1 to 27 embryos and mean clutch mass was 29.59 ± 17.29 gram, ranged from 4 to 88 gram. The full-term stage of embryo, stage 37, was found in May to June and September, suggesting that the rainbow water snake had 2 reproductive cycles per year. First reproductive cycle period started from October to June and second period started from May to September.

INTRODUCTION

The Oriental-Australian rear-fanged water snakes in the Family Homalopsidae are distributed worldwide. Approximately 38 species have been found from Pakistan's Indus River to northern Australia and the Micronesian Island of Palau (e.g. Taylor, 1965; Cox *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2002; Karns *et al.*, 2005). One species of these snakes, *Enhydris enhydris* (figure 1), has wide distribution ranging from northeast India and Myanmar eastward to peninsular Southeast Asia, through Indonesia as far east as Sulawesi. It is piscivorous and highly aquatic life-style. By the way, a lot of cognizance were scattered reported in many literatures. Although spectacularly dense populations were reported by many authors (Murphy *et al.*, 1999; Murphy &Voris, 2002), a highly uncontrolled fishery in many freshwater habitats could affect their populations (Stuart *et al.*, 2000). Hence, the research on reproductive cycle of this snake could provide important information to understand its life-history patterns and to plan its conservation management program. This study the reproductive cycle of *Enhydris enhydris* at Kabinburi District, Prachinburi Province, Thailand

Key words : *Enhydris enhydris, gravid female, full-term stage of embryo, reproductive cycle*

[1/] Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand Chattraphas@hotmail.com, *e-mail: chattraphas@hotmail.com
[2/] Division of Amphibians and Reptiles, Field Museum of Natural History, 1400 South Lake Shore Drive, Chicago, Illinois,U.S.A.

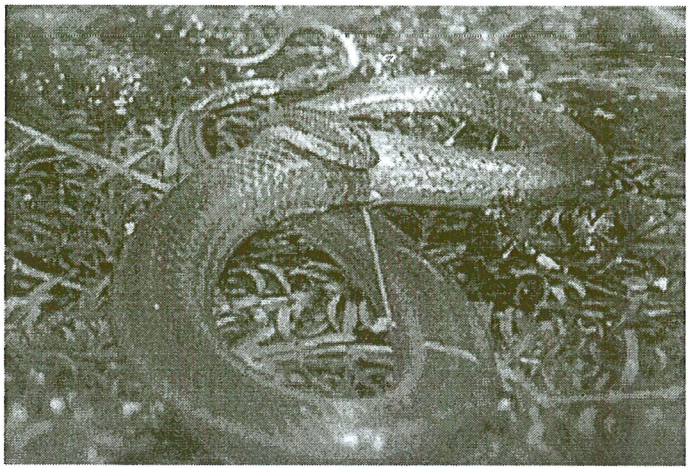


Figure 1. Rainbow water snake, *Enhydris enhydris,* at Kabin Buri District, Prachinburi Province, Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Field work was carried out at Kabinburi District, Prachinburi Province. Snakes were collected in each month from June 2006 to May 2007. *Enhydris enhydris* were collected from fisherman's gill nets which were placed at fresh water habitats. Live snakes were sexed, measured, weighed following Wangkulangkul (2005) and released at captured site.

Sex: the sex of snakes was determined by injecting water at the base of the tail. In males the hemipenes would emerge from the vent opening, while for the females, hemipenes would not emerge. Snout vent length (SVL): the measurement was done with a measuring tape. It measured from the tip of snout along the body to the vent opening. Tail length (TL): the measuring tape was used to measure from the vent opening to the tip of the tail. Weight: the snakes were placed in a plastic bag of known weight. Then, they were weighed by digital balance. The weight was recorded in grams.

Dead female snakes were examined for ova and embryos. The collected eggs were counted, weighed and staged following Zehr (1962). The picture of the method used was exhibited in figure 2.

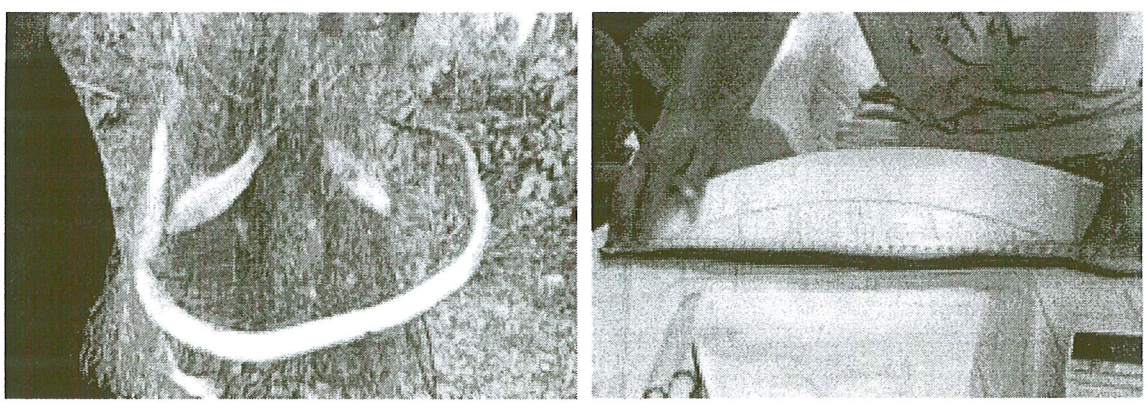


Figure 2. Methodology of the study were shown in pictures.

RESULTS AND DISCUSSION

Sexual dimorphism

Both sexes of snakes differed significantly in morphology ($p < 0.01$). Female specimens (n = 258) were 535.0 ± 8.31 mm in SVL, 11.51 ± 1.49 mm in TL and 141.15 ± 64.61 grams in weight whereas those of males (n = 351) were 470.5 ± 4.68 mm in SVL, 12.19 ± 1.10 mm in TL and 76.52 ± 19.61 grams, respectively (figure 3). Sex ratio of male : female was 1.47 : 1 which was significantly different ($X^2 = 12.21, p < 0.01$, female n = 258, male n = 351).

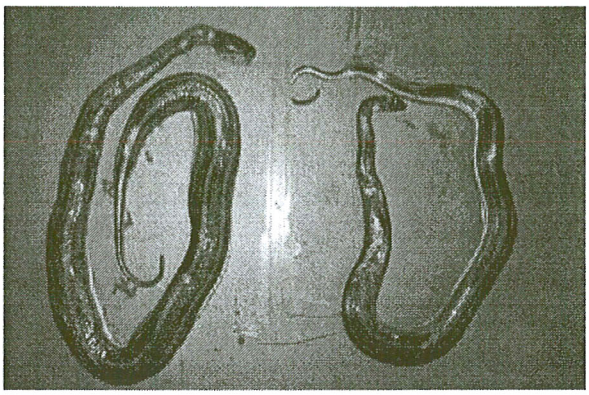


Figure 3. Picture shown sexual dimorphism of *Enhydris enhydris* at Kabin Buri District, Prachinburi Province, Thailand. Female snake was placed on the left and male snake was place on the right.

Reproduction

For *Enhydris enhydris* females, the distribution of body size was normal (Figure 4). Thirty-nine (15.16%) females, with oviducal eggs, had SVL ranging from 360 mm to 640 mm with the average of 560.49 ± 5.85 mm. The mean clutch size was 13.07 ± 5.17 embryos (ranged from 1 to 27 embryos) and mean clutch mass was 29.59 ± 17.29 gram (ranged from 4 to 88 gram). There were significant correlations between SVL and female mass (minus their ova; r = 0.871, $p < 0.01$) and between SVL and clutch mass (r = 0.118, $p = 0.05$), but no correlation occurred between SVL and clutch size (r = 0.104, $p = 0.08$).

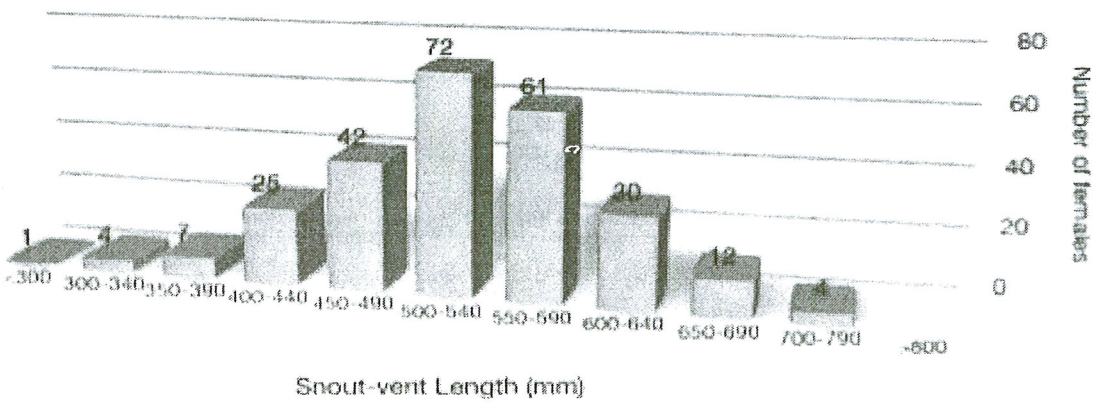


Figure 4. Histogram showing the SVL distribution of female *Enhydris enhydris* at Kabinburi District, Prachinburi Province, Thailand.

Reproductive cycle

According to figure 5, the females with follicles were found throughout the year, of which the peak were occurred in October (90% of collected snakes). Oviducal eggs and early period of embryos were recorded in 2 periods, from February to May and from July to September. The peak were occurred in April (80% of collected female snakes) and followed by August (38% of collected female snakes). Gravid female snakes containing the full-term stage of an embryo, stage 37, were found from May (5% of collected snakes) to June (16% of collected snakes) and September (11% of collected snakes). Each reproductive condition of female snakes was shown in figure 6.

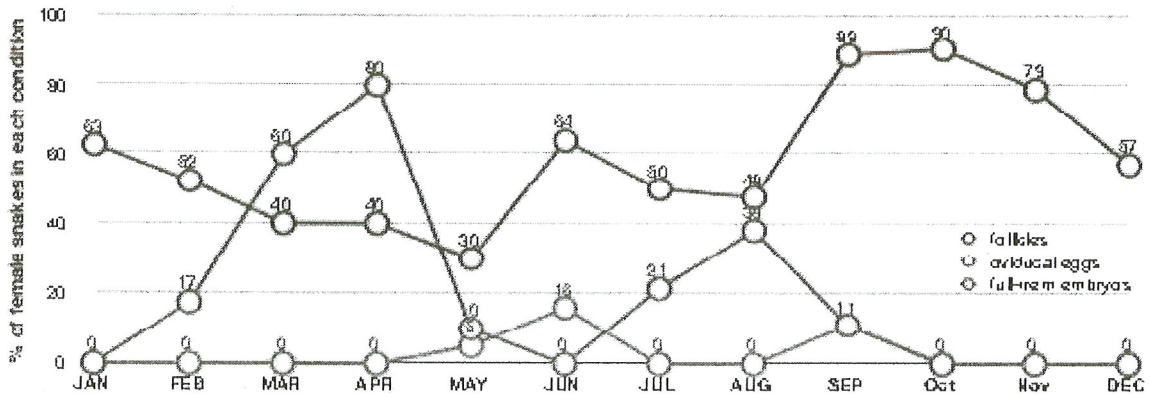
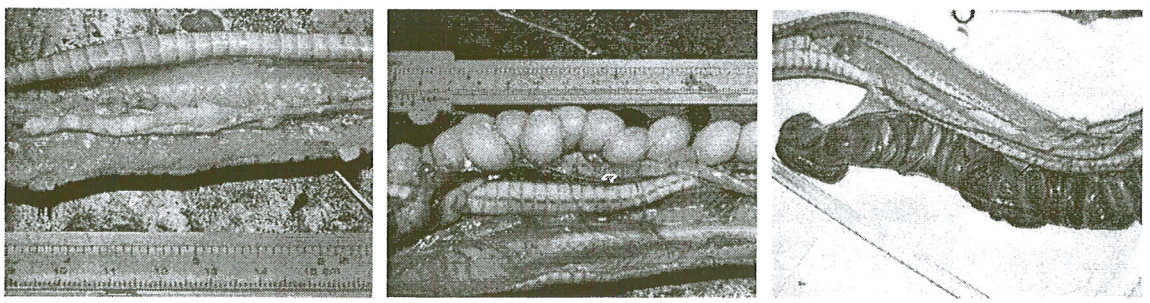


Figure 5. Graph shown proportion between number of female snakes in each condition with all collected female snakes by month at Kabin Buri District, Prachinburi Province, Thailand.



follicles Full-term stage of embryos Oviducal eggs

Figure 6: Figure shown reproductive condition of female snakes of *Enhydris enhydris* at BAn Borthong, Kabin Buri District, Prachinburi Province, Thailand

Discussion

The mean and range of body sizes of *Enhydris enhydris* gravid females at Kabinburi Province (SVL = 560.49 ± 5.85 mm, range = 360-640 mm) are consistent with a previous report (SVL = 568.0 ± 11.5 mm, range = 436.0-698.0 mm) by Karns *et al.* (2005). However, the mean clutch size (13.07 ± 5.17 embryos) in this study was bigger than the previous studies (11.0 ± 1.0 embryos) by other authors (Karns *et al.*, 2005 and Murphy *et al.*, 2002).

In this study, two reproductive cycles of *Enhydris enhydris* at Kabinburi District were determined. The first period occurred during 8 months from October to June and the later period occurred during 4 months from May to September. The first period was considered to be the main reproductive cycle by a higher proportion of reproductive female snakes. The later cycle had shorter interval than the former cycle (4 months and 8 months, respectively). This might be the effect of food availability in rainy season (June to October).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research, Training grant BRT (BRT_T_2500001), The John D. and Catherine T. MacArthur Foundation and the Center of Excellence in Biodiversity under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity (CEB_M_25_2006), Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University. We thank Sakaerat Environmental Research Station for accommodation and thank our colleagues who assisted in data collection phase.

REFERENCES

Cox, M. J., P. P. Van Dijk, J. Nabhitabhata & K. Thirakupt. 1998. **A Photographic Guide to Snakes and Other Reptiles of Peninsular Malaysia, Singapore and Thailand.** Asia Books Co., Ltd. Bangkok.

Murphy, J. C., H. K. Voris, B. L. Stuart & S. G. Platt. 2002. Female reproduction in the rainbow water snake, *Enhydris enhydris* (Serpentes, Colubridae, Homalopsinae). **The National History Journal of Chulalongkorn University** 2 (1) : 31-37.

Karns, D. R., J. C. Murphy, H. K. Voris and J. S. Suddeth. 2005. Comparison of semi-aquatic snake communities associated with the Khorat basin, Thailand. **The National History Journal of Chulalongkorn University** 5 (2) : 73-90.

Stuart, B. L., J. Smith, K. Davey, P. Din & S. G. Platt. 2000. Homalopsine water snakes : the harvest and trade in Tonle Sap, Cambodia. **Traffic** 18 : 115-122.

Taylor, E. H. 1965. The serpent of Thailand and their adjacent waters. **University of Kansas Science Bulletin** 45: 609-1096.

Wangkulangkul, S., K. Thirakupt & H.K. Voris. 2005. Sexual size dimorphism and reproductive cycle of the little file snake *Acrochordus granulatus* in Phangnga bay, Thailand. **Science Asia**. 31 : 257 - 263.

Zehr, D. R. 1962. Stages in the normal development of the common garter snake, *Thammnophis sirtalis sirtalis*. **Copeia**. 1962 : 322 - 329.

ลำดับที่ 6

การแพร่กระจายตามฤดูกาลของนกยูงเขียว *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ที่ ต.ป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

SEASONAL DISTRIBUTION OF GREEN PEAFOWL (*PAVO MUTICUS* LINNAEUS, 1766) IN PA MIANG SUBDISTRICT, DOI SAKET DISTRICT, CHIANG MAI PROVINCE.

จิรวัฒน์ ดำแก้ว วีณา เมฆวิชัย และ ผุสตี ปริยานนท์

Jirawat dumkeaw[1], Wina mekvichai[1] and Putsatee parriyanonth[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

บทคัดย่อ: ในประเทศไทยปัจจุบันพบการแพร่กระจายของนกยูงเขียวในภาคเหนือและภาคตะวันการศึกษาการแพร่กระจายของนกยูงในรอบหนึ่งปีในพื้นที่ตำบลป่าเมี่ยง อ. ดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงฤดูแล้ง เดือนธันวาคม – เดือนพฤษภาคม นกยูงจะเข้าสู่ฤดูสืบพันธ์ นกยูงเพศเมียจะเข้าไปรวมกลุ่มกับนกยูงเพศผู้เพื่อผสมพันธุ์ บริเวณรอบๆศูนย์การศึกษาและพัฒนาการเลี้ยงสัตว์ป่าในพื้นที่ต้นน้ำ หลังจากผสมพันธุ์นกยูงเพศเมียจะเข้าไปวางไข่ในบริเวณป่าจนกว่าไข่จะฟัก ฤดูฝนจะอยู่ในช่วงเดือนมิถุนายน – เดือนพฤศจิกายน นกยูงเพศผู้และนกยูงเพศเมียจะแยกกันหากิน โดยเพศเมียจะพาลูกออกหากินบริเวณพื้นที่แปลงเกษตร

Abstract: In Thailand, green peafowl are distributed in the north and the west. This study is in Pha Miang subdistrict Doi Saket district Chiang Mai province. In dry season from December to May, this period female green peafowl are pairing with male green peafowl in area around wildlife breeding center. After breeding, female green peafowl go to the forest to lay egg and take care until hatch. Rainy season from June to November, female green peafowl have chick and lead them to feed in agricultural area.

Introduction: At present, green peafowl number had been decrease rapidly by hunting and habitat destruction. The seasonal distribution is key data to know the dynamic population and habitat utilizations in daily month in whole year observation to provide the basic data for making decision on green peafowl conservation in natural habitat. Normally green peafowl live in open field, riverine area and dry dipterocrap forest (Ponsena, 1988; Johnagard, 1999). In breeding season, male peafowl used the open area as their territory to display attracted the female.

Methodology: In this studies, the habitat used are classified into 4 area types which are agriculture area, reservoir area, human settlement area and wildlife breeding center area, all of habitats according to human disturbances. Seasons are classified into 2 season types, dry season from December to May and rainy season from June to November. The survey method are use point count (Colin *et al.*, 1992) in all 4 habitat types; 8 stations for agriculture area, 6 stations for reservoir area, 2 stations for wildlife breeding center area and 4 stations for human settlement area. Each station is observed with in 200 meter in radius. The observation starts at 6.00 am – 10.00 am in the morning and 3.00 pm – 6 pm in he evening. The number of green peafowl and

their habitat are recorded. The data analyze of green peafowl distribution in 4 habitat types is used Kruskal willis test and paired simple T-test to comparing between rainy season and dry season.

Results and discussion: Seasonal distribution in dry season and rainy season is difference. Dry season, male green peafowl are pairing with the male. Male peafowl use the open area close to the forest or on the hill not far from the riverine area (Brickleand Cu, 1998; Brickle, 2002; Meakvichai *et al.*, 2002). The suitable breeding areas of green peafowl are around wildlife breeding center. Most male green peafowl are creating their territory in this area. The distribution density of this area is 32 individuals/km^2 which are high than other areas. The distribution densities in other areas are 2 individuals/km^2 in agriculture area, 4 individuals/km^2 in reservoir area and 1 individuals/km^2 in human settlement area. In rainy season, green peafowl are distributed in agriculture area which have distribution density is 8 individuals/km^2. Ripen fruits such as jackfruit, papaya, chili, and seeding as rice and soy bean are available in agricultural areas. The other areas density are 4 individuals/ km^2 for reservoir area, 18 individuals/ km^2 for wildlife breeding area and 1 individual/ km^2 for human settlement area. Wildlife breeding center area have a high density distribution in rainy season because this area are provide food for breeding captive that easy and high protein so induce green peafowl living close to wildlife breeding center come (Arratharakorn, 2001). When analyze the distribution in 4 habitat types by Kruskal willis is significant ($P< 0.05$, $df = 3$) but not significant in distribution in daily month in whole year observation ($P>0.05$, $df = 11$). Between the season, the data analyze by paired sample T test is not significant ($t = 0.108$, $p>0.05$, $df = 5$). The population fluctuations in 4 habitat types are not significant due to in rainy season female green peafowl have chick and some adult peafowl has been gone to the forest. From previous study in this area (Thawonwan, 2005; Meakvichai, 2007), the total number of green peafowl are 61 individuals but in this study total number of green peafowl are 108 individual. Numbers of this population increase 47 individuals in 4 years. The new born chick in last 4 year are 10 individuals, in this study got new born chick are 28 individuals. From the increase of populations let we know this area suitable for green peafowl.

Conclusion: Green peafowl distributions depend on life period and food. In dry season as the same as breeding season of green peafowl, male green peafowl choose territory close to wildlife breeding center because this area suitable for breeding. In raining season, male peafowl separate itself to live alone and female green peafowl got chick and lead her chick to feed in agriculture area because have ripen fruits, seeding and farm plant and quite save for her chick .

References:

Arratharakorn, S, 2001. Breeding ecology, and agricultural field utilization of green peafowl Pavo muticus
Linnaeus, 1766 at Doi Phu Nang National Park.

Brickle, N. and Cu, N., 1998. The status and distribution of green peafowl Pavo muticus in Dak Lak Province, Vietnam. Hanoi.

Brickle, N. W., 2002. Habitat use, predicted distribution and conservation of green peafowl (*Pavo muticus*) in Dak Lak Province, Vietnam. Biological conversation 105:189-197.

Colin, J., Neil, D.B. and David, A.H. 1992. Bird census techniques, 85 – 104.

Johnagard, P. A., 1999. The pheasants of the world. 2nd ed. Biology and Natural history:355-371.

Meakvichai, W., 2007. Distribution and status of green peafowl in Thailand. International symposium on Galliformes 14 – 21 October 2007 Chengdu, Sichuan, China.

Ponsena, P., 1988. Biological characteristics and breeding behaviors of green peafowl (*Pavo muticus* (Linneaus)) in Huai Kha Kheang Wildlife Sanctuary. Master Thesis.Department of Forest Biology, Kasetsart University.

Silapasuwuan, N. and Mekvichai, W. 2000. Distribution range and minimum population of green peafowl Pavo muticus Linnaeus in Breeding season at Doi Phu Nang National Park. 26th Congress on Science and Technology of Thailand. p324.

Thawonwan, P., 2005. Population dynamic of the green peafowl, *Pavo muticus imperator* at Huoi hong Krai royal development study center, Chiang Mai province. Senior project, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Van de Bult, M. and Vongkamjan, S. 2005. Habitat study of release site of green peafowl in Mae Wong National Park. 31st Congress on Science and Technology ofThailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005.

ลำดับที่ 7

Tropical Natural History 10(1): 37-51, April 2010
©2010 by Chulalongkorn University

Ant Species Diversity and Community Composition in Three Different Habitats: Mixed Deciduous Forest, Teak Plantation and Fruit Orchard

PITINAN TORCHOTE[1], DUANGKHAE SITTHICHAROENCHAI[2*] AND CHATCHAWAN CHAISUEKUL[2]

[1] *Program in Zoology, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, THAILAND*
[2]*Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, THAILAND*
* Corresponding author. E-mail: dsitthi@hotmail.com
Received: 16 February 2009; Accepted: 10 August 2009

ABSTRACT.– **The species diversity of ants in three different land use types: a mixed deciduous forest, and a derived commercial teak plantation and a durian orchard, were studied to determine and compare the ant species diversity in these areas. Five sampling methods: handling capture over constant time, sugar-protein bait trap, pitfall trap, leaf litter sifting and soil sifting, were conducted each month from September 2007 to September 2008, inclusive. The species richness of ants in the area was 62 identified species and 67 morpho-species, belonging to 49 genera in nine subfamilies. The Shannon-Wiener's species diversity index indicated that the diversity was the highest in the mixed deciduous forest (2.387), followed by the durian orchard (1.997) and lastly the teak plantation (1.463). The β-diversity, using Sorensen's similarity coefficient to determine the similarity in community composition, was highest between the forest and the teak plantation at 65.5%, and then between the teak plantation and the durian orchard at 45.5%, and between the forest and the durian orchard at 39.7%, indicating that both ant species diversity and community composition were distinctly varied in these three sites which may relate to their different land use types. Therefore, the information from this preliminary study suggests that, subject to confirmation and further clarification, ant species diversity may be used to assist the conservation and management planning of agro-forestry ecosystems.**

KEY WORDS: **ant, community composition, species diversity, land use type**

INTRODUCTION

Although the proportion of biomass represented by ground-dwelling ants in comparison with other soil microfauna (e.g. termites and earthworms) in the tropics can vary from relatively low (0.02 – 5%), to high (80%) (Hölldobler and Wilson, 1990), in terms of population density even when at a low relative biomass ants make a far larger contribution ranging typically from 7 – 53% (Lavelle and Pashanasi, 1989). Indeed, both arboreal and ground-dwelling ants play diverse and important ecological roles. They may function in an ecosystem as predators, prey, detritivores, mutualists, herbivores, or in combinations, and their functions are usually related to the species and genera they belong to (Alonso, 2000; Schultz and McGlynn, 2000). In addition, they create mycorrhizal reservoirs, effect nutrient immobilization, water movement, nutrient cycling, soil movement and other physical and chemical changes to the soil profile (e.g. reviewed in Folgarait, 1998; Lobry de Bruyn, 1999, Philpott and Armbrecht, 2006).

Ants are collectively classified in a single family, the Formicidae, in the order

Hymenoptera (Hölldobler and Wilson, 1990). Worldwide there are 23 subfamilies of ants comprised of 287 genera and approximately 12,000 described species, with a likely much larger number of species, yet to be described (Bolton et al., 2006). Despite the fact that tropical forests are amongst the poorest surveyed areas, they still have the highest recorded species diversity with, for example, some ~2200 species recorded in Asia (Hölldobler and Wilson, 1990). Within Thailand, there are nine recorded subfamilies; Aenictinae, Cerapachyinae, Dolichoderinae, Dorylinae, Formicinae, Leptanillinae, Myrmicinae, Ponerinae and Pseudomyrmecinae (Wiwatwitaya and Jaitrong, 2001).

Ants have numerous advantages that make them suitable for biodiversity and environmental monitoring studies. Ants are eusocial organisms, characterized by cooperative brood care, overlapping generations of workers within the colony, and a highly developed caste system (Wilson, 1971, cited in Agosti et al. 2000), which contribute towards the ants' numerical and biomass dominance, high diversity and their presence in almost every habitat throughout the world. Moreover, ants as indicators of ecological niches, especially soil systems, have other advantages, such as a fairly good existent taxonomic knowledge for ease of identification, their relative ease of collection, stationary nesting habits that allow them to be resampled overtime and their relative sensitivity to environmental changes (Alonso and Agosti, 2000; Andersen et al., 2002). Thus, overall, as well as broadly common species, most habitats are likely to have specialized species, which occur in sufficient species diversity and abundance as to be able to serve as suitable terrestrial indicator species of habitat quality and changes. However, this assumption has not been tested and the suitable indicator species identified, for most habitats including the changing forest land usage of the tropics, such as in Southeast Asia and especially Thailand.

Thong Pha Phum district, in the Kanchanaburi province, western Thailand, is located at the junction of three ecoregions; the Tenasserim-South Thailand semi-evergreen rain forest, the Kayah-Karen montane rain forest and the Chao Phraya lowland moist deciduous forest (Beamish, 2007). Therefore, with such a relatively high diversity of habitats and organisms including flora, then likewise the biodiversity of ants including habitat-specific or specialist species, is expected to be high. Consistent with this notion is that Bourmas (2005) reported that 202 ant species, belonging to 56 genera in nine subfamilies, were found from four forest types; namely a dry evergreen, lower mixed-deciduous, dry upper mixed-deciduous and disturbed mixed-deciduous forests, in the Golden Jubilee forest reserve in Thailand. Besides the forest reserve and national park, Thong Pha Phum district also has several other land use types which include the commercial plantings of teak, *Tectona grandis* (Lamiales: Verbeniceae), and rubber, *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. (Malpighiales: Euphorbiaceae) trees, and agricultural areas, such as the cultivation of fruit orchards, rice and field crops. However, there is currently no information about the biodiversity of ants in these habitats which have been modified from the natural forest, yet such changes in the land-use patterns have resulted in areas that significantly differ in vegetative cover, management and some environmental factors and so would be expected to have changed the ant community composition and abundances.

With the increasing loss of habitats and biodiversity around the world, there is an urgent need for biodiversity assessments to be carried out during the conservation planning process (Alonso, 2000), as well as factors influencing biodiversity variation, such as habitats and/or land use types. The aim of this preliminary study is to determine and compare ant species diversity and composition in three different types of land use within the same broad area; specifically a natural mixed deciduous forest, and the two thereof derived states, a teak plantation and an intensively agrochemical used agricultural area represented by a durian fruit orchard, to investigate the potential feasibility of using ants as indicator species in land usage changes of forest systems. Within this context, the rational of this preliminary study is that the basic knowledge of ant species diversity and composition in different land usage habitats will assist in evaluating and planning for biodiversity conservation management.

MATERIALS AND METHODS

Study sites.– The study sites were located within the Huai Khayeng sub-district, Thong Pha Phum district, Kanchanaburi province, in western Thailand bordering Myanmar. Three areas were selected based on differences in land usage types: (i) a natural habitat represented by a mixed deciduous forest, (ii) a largely monoculture based forestry plantation, represented here by a teak plantation, and (iii) an agrochemically intensive farm, represented here by an evergreen durian orchard (Fig. 1). The mixed deciduous forest was located in the Golden Jubilee reserved forest, which covers a total area of 5,637.12 hectares and consists of dry evergreen, mixed deciduous and dry dipterocarp forests (Bourmas, 2005). The canopy of mixed deciduous forest was approximately 80 and 20 % in the wet and dry seasons, respectively. A 20 - 25 years old teak (*T. grandis*) plantation is located in the Huai Khayeng Reserve Forest Restoration Project, where the teak trees were planted at 6 × 6 m intervals, and rattan palm (*Calameae* sp.) trees were planted between the teak rows in an eight hectare area in 2006. The canopy of teak plantation was approximately 60 and 10 % in the wet and dry seasons, respectively. Local cattle browsing and grazing on small bamboo and seedlings were occasionally found in this area. The durian orchard covers an area of 20.8 hectares with the durian trees planted orderly in a 5 × 5 m interval and managed therefore, and the canopy cover was approximately 50% without leaf shedding throughout the year. Agrochemicals, including pyrethroid and organophosphate pesticides (Cypermethrin and Chlorpyrifos, respectively), the herbicide Glyphosate that can also affect some arthropods, and mixed fertilizers for nitrogen, phosphorus and potassium, were applied all year round. Thus, ant species and composition can be differentially affected through either direct poisoning or indirectly affected through loss of prey species. The wet and dry season of this study were determined by the monthly total rain fall that was obtained from the meteorological station at Thong Pha Phum district, Kanchanaburi province. The months which had a total rain fall higher than 100 mm were included as the rainy season (Whitmore, 1975), making the rainy season in this study periods from April to October and the dry season from November to March.

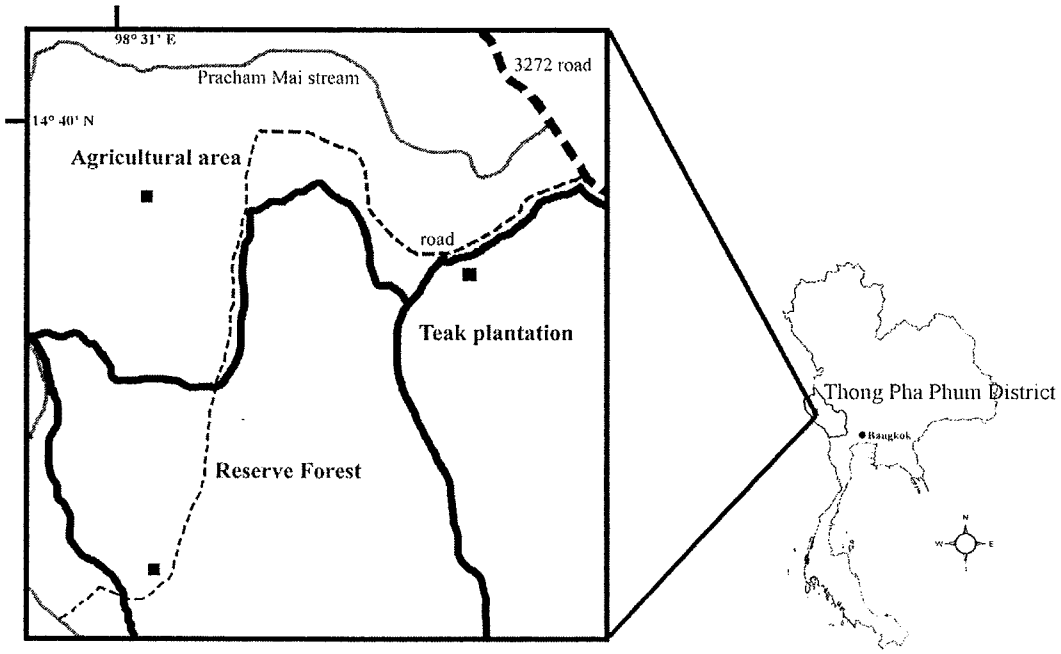


FIGURE 1. The study site map in Huai Khayeng sub-district, Thong Pha Phum district, Kanchanaburi province of Thailand, depicting the three studied sites sampled in 2007 - 2008: Reserve forest (a mixed deciduous forest), Teak plantation, and Agricultural area (an agrochemically intensive durian orchard).

Sampling methods.– In each of the three habitat types, a permanent plot of 15 × 50 m was selected as a sampling area. The surveys at each site were conducted every month from September 2007 to September 2008, inclusive. Five easy, common and cheap sampling methods that are relatively non-time consuming to use, outlined below, were used to harvest ants in order to study the species diversity and abundance of ants in each habitat taking into account the potential shortfalls and biases each method alone would involve (e.g. Majer and Delabie, 1994; Folgarait et al., 1997; Majer, 1997; Folgarait 1998). This rational is based upon future applicability, as in farmers or park wardens need indicators (in this case ant species diversity and composition) of soil or environment quality/ sustainability that are not too technically demanding, cheap and quick to attain, but reliable and widely applicable. For each method, sampling was conducted once a month every month during the 13 successive month time period.

Handling capture with constant time.– Each permanent plot (15 × 50 m) was divided into three strip quadrates (5 × 50 m), and one person collected the ants for 30 minutes at each quadrat. The ants in each habitat were collected in three alternating time periods, in the morning, late morning and afternoon. The ants were extensively searched for on the bare ground, in the leaf litter, under stones, in decaying logs and under and on shrubs and tree bases up to 1.5 m height above ground.

Sugar-protein baiting trap (applied from Bestelmeyer et al., 2000).– Each permanent plot was divided into 30 smaller quadrates

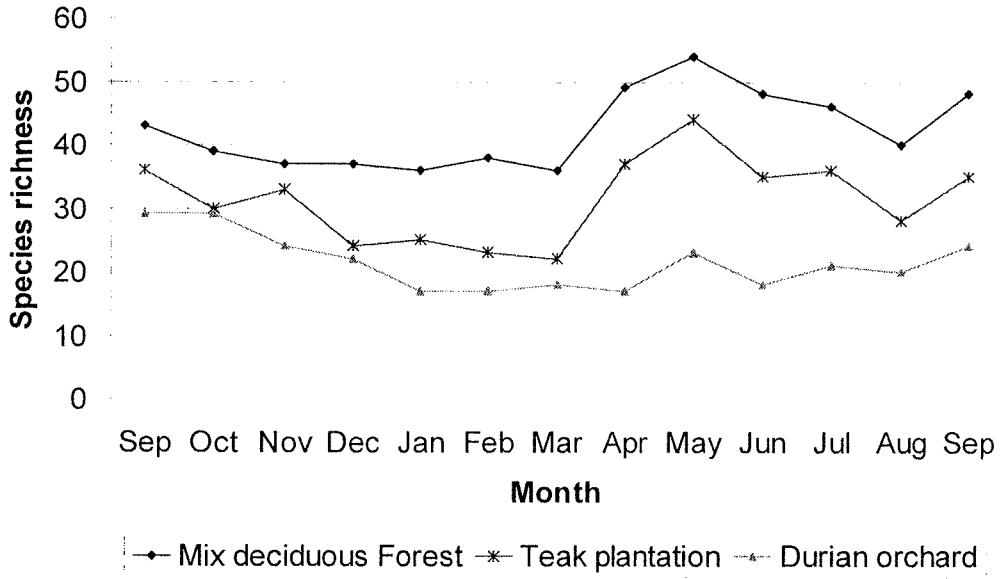


FIGURE 2. The species richness of ants among sampling months from the three habitats outlined in the legend to Figure 1.

(5 × 5 m). Canned tuna fish was mixed with 80% (w/v) sugar solution at a 1:1 (w/v) ratio and used as bait. Three grams of bait were placed directly on the center of a piece of cotton cloth (9 × 9 cm). The baited cloth was placed on each quadrat, and the ants on the cloth were harvested after 45 minutes.

Pitfall trap (applied from Bestelmeyer et al., 2000).– Each permanent plot was divided into 30 quadrates, similar to the baiting method detailed above, except that a hole was dug at the center of each quadrat. A plastic container (8 cm diameter × 12 cm height) was placed in each hole with the lip of the trap level with the soil surface. Petroleum gel was applied around the inner lip of trap and a 2% (v/v) (alkylbenzene sulfonate Sunlight®, Unilever Thai Holding Comp.) detergent solution was poured into the trap to a depth of about two cm. Samples were collected after 24 hours and taken to the laboratory for sorting. Note each trap was not placed directly on any ant nest.

Leaf litter sifting.– Each permanent plot was divided into 30 (5 × 5 m) quadrates, as above, from which ten were randomly selected. The leaf litter was collected from within a 1 × 1 m quadrat positioned in the center of each selected 5 x 5 m quadrat. After collection, the leaf litter samples were sieved with a 0.8 × 0.8 cm mesh and the ants were collected using forceps.

Soil sifting.– The soil was sampled in the same sampling quadrat as the leaf litter sample (above) in each site. In the center of the leaf litter sampling quadrat, the soil was collected in an area of 25 x 25 m to five cm depth from the soil surface. The soil samples were sieved with 0.8 × 0.8 cm mesh and the ants were collected using forceps.

Soil texture.– The soil texture was determined from three replicate soil samples selected randomly from each study site. The soil texture was determined by the Bouyoucos Hydrometer method (Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, 2006). The percentage of soil particles was calculated.

Ant collection and identification.– For all sampling methods, upon collection the ants were preserved in 95% (v/v) ethyl alcohol and subsequentially taken back to the laboratory for classification to (morpho-) species level and counting the numbers of each (morpho-) species. Identification of ants to family, genus and species (nearly all cases), or morpho-species where this was not possible, was based on the keys by Bolton (1994), Hölldobler and Wilson (1990), and Wiwatwitthaya and Jaitrong (2001).

The specimens were also compared with the reference collections at the Ant Museum, Faculty of Forestry, Kasetsart University, and the Museum of Zoology, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Unidentified specimens were coded based on their reference collections, the sp. of AMK is the code of Ant Museum, Kasetsart University and the sp. of CUMZ is the code of Chulalongkorn University Museum of Zoology.

Data analysis.– The Shannon-Wiener's diversity index (Krebs, 1999), was used to calculate the diversity of ants collected from four of the collection methods, i.e. the sugar-protein baiting trap, pitfall trap, leaf litter sifting and soil sifting. Hand (visual encounter) based collection, with its inherent bias, was excluded from this the Shannon-Wiener's diversity index since it cannot be used to reliably support the relative abundance of each species. The formula of the Shannon-Wiener's diversity index used is presented below:

$$H' = \sum_{i=1}^{s} (pi)(\ln pi)$$

Where, H' = Species diversity index
s = Number of species
p_i = Proportion of the total sample belonging to i^{th} species

The Sorensen's similarity coefficient (Krebs, 1999) was used to measure the beta-diversity or the similarity between two study sites as follows:

$$S = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Where, S = Sorensen's similarity coefficient
a = Number of species in site A and site B
b = Number of species in site B but not in site A
c = Number of species in site A but not in site B

The evenness index (Krebs, 1999) was calculated to determine the equal abundance of ants in each study site as follows:

$$\text{Evenness} = \frac{H'}{H'_{MAX}}$$

Where, H' = Observed index of species diversity
H'_{MAX} = Maximum possible index of diversity

TABLE 1. The collecting methods, study sites, percentage occurrence, and some biology of each species in the legend to Figure 1. (H = handling capture with constant time, B = sugar-protein baiting trap, P = pitfall trap, S =, soil sifting, L = leaf litter sifting, F = mix deciduous forest, T = teak plantation, O = durian orchard, * = % occurrence less than 40%, ** = % occurrence between 40-69%, *** = % occurrence more than 70%, D = dry season, W = wet season.)

Subfamily/species	Collecting					Study sites			% Occurrence	Some biology (Brown, 2000)
	H	B	P	S	L	F	T	O		
Aenictinae										
Aenictus camposi	✓					–,W	–,–	–,–	*	Army ants
Aenictus ceylonicus	✓		✓			–,W	–,W	–,–	*	
Aenictus dentatus	✓					–,W	–,W	–,–	*	
Aenictus laeviceps	✓					–,–	–,W	–,–	*	
Aenictus nishimurai	✓					–,W	–,–	–,W	*	
Aenictus sp.5 of AMK	✓					–,W	–,W	–,–	*	
Cerapachyinae										
Cerapachys sp.3 of AMK	✓					–,–	D, –	–,–	*	Army ants, predators of other ants
Cerapachys sp.5 of AMK	✓					–,–	–,W	–,–	*	
Cerapachys sp.14 of AMK	✓			✓		D,W	–,–	–,–	*	
Dolichoderinae										
Philidris sp.1 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	–,–	**	Foragers
Tapinoma indicum	✓					–,–	–,–	–,W	*	Generalized foragers
Tapinoma melanocephalum	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	***	
Technomyrmex albipes	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	–,W	–,–	*	Generalized foragers
Technomyrmex kraepelini (group)	✓			✓	✓	D,W	–,W	–,–	*	
Dorylinae										
Dorylus orientalis	✓		✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	*	Army ants
Formicinae										
Acropyga acutiventris	✓			✓		D,W	–,–	–,–	*	Tend coccids
Anoplolepis gracilipes	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	–,–	**	Foragers
Camponotus (Myrmamblys) sp.1 of AMK	✓			✓		–,–	D,W	–,–	*	Generalized foragers
Camponotus ruflogaucus	✓	✓	✓	✓	✓	–,–	D,W	D,W	**	
Camponotus sp.7 of AMK-group	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	**	
Oecophylla smaragdina	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	–,–	**	Predators, tend homopterans
Paratrechina opaca	✓					D, –	–,–	–,–	*	Generalized foragers
Paratrechina sp.1 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	–,–	–,–	*	
Paratrechina sp.4 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	***	
Paratrechina sp.8 of AMK	✓	✓				–,W	D,W	D,W	*	
Paratrechina sp.9 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	–,–	D,W	**	
Paratrechina sp.10 of AMK	✓	✓	✓			D,W	D,W	D,W	*	
Plagiolepis sp.1 of AMK	✓	✓	✓		✓	–,–	D,W	D,W	*	Generalized foragers
Plagiolepis sp.2 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	–,W	D,W	–,–	*	
Polyrhachis (Campomyrma) halidayi	✓			✓	✓	–,W	–,–	–,W	*	Generalized foragers
Polyrhachis (Cyrtomyrma) laevissima	✓					–,W	D,W	–,–	*	

TABLE 1. Continues.

Subfamily/species	Collecting					Study sites			% Occurrence	Some biology (Brown, 2000)
	H	B	P	S	L	F	T	O		
Polyrhachis (Myrma) illaudata	✓					D,W	–,–	–,–	*	
Polyrhachis (Myrma) proxima	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	–,–	**	
Polyrhachis (Myrmhopla) armata	✓					D,W	–,W	–,–	*	
Polyrhachis (Myrmhopla) furcata	✓					–,W	–,–	–,–	*	
Polyrhachis (Myrmhopla) hippomanes-group	✓					–,W	–,W	–,–	*	
Polyrhachis (Myrmhopla) tibialis	✓		✓			D, –	–,W	–,–	*	
Polyrhachis (Myrmhopla) sp.5 of AMK	✓					D, –	–,–	–,–	*	
Pseudolasius sp.1 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	–,–	–,–	*	Cryptic foragers
Leptanillinae										
Leptanilla sp.1 of AMK	✓			✓	✓	–,W	–,–	–,W	*	Cryptic mass predators
Leptanilla sp.2 of AMK	✓					–,W	–,–	–,–	*	
Myrmicinae										
Calyptomyrmex sp.1 of AMK	✓			✓		–,W	–,W	–,–	*	–
Cardiocondyla emeryi	✓					–,–	–,–	–,W	*	–
Cardiocondyla nuda	✓	✓			✓		–,W	D,W	*	
Cardiocondyla wroughtonii	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D, –	**	
Carebara sp.1 of AMK	✓			✓		–,W	–,W	D,W	*	–
Cataulacus sp. (queen)	✓					–,W	–,–	–,–	*	–
Crematogaster (Orthocrema) sp.1 of AMK	✓					–,W	–,–	–,–	*	Generalized foragers
Crematogaster (Orthocrema) sp.2 of AMK	✓					–,W	–,–	–,–	*	
Crematogaster sp.2 of AMK			✓			–,–	D, –	–,–	*	
Crematogaster sp.5 of AMK	✓					–,W	–,W	–,–	*	
Crematogaster sp.9 of AMK	✓	✓			✓	D,W	–,W	–,–	*	
Lophomyrmex lucidus				✓		–,–	–,W	–,–	*	Generalized foragers
Meranoplus bicolor	✓	✓	✓	✓		–,–	–,W	D,W	*	Seed harvesters and general foragers
Monomorium floricola	✓	✓	✓			D,W	–,W	–,–	*	Generalized foragers, harvesters
Monomorium latinode	✓	✓		✓	✓	D,W	–,W	D,W	*	
Monomorium pharaonis	✓	✓	✓		✓	D,W	–,–	–,–	*	
Monomorium sechellense	✓		✓		✓	–,W	–,W	–,–	*	
Monomorium sp.1 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	–,–	**	
Myrmecina sp.4 of AMK	✓			✓	✓	–,W	–,W	D,W	*	Predators of mites
Myrmicaria brunnea	✓	✓				–,–	–,W	–,–	*	–
Myrmicaria sp.1 of CUMZ	✓	✓		✓		–,–	–,W	–,–	*	

TABLE 1. Continues.

Subfamily/species	Collecting					Study sites			% Occurrence	Some biology (Brown, 2000)
	H	B	P	S	L	F	T	O		
Oligomyrmex sp.1 of AMK	✓		✓	✓	✓	D,W	–,–	–,–	*	Cryptic foragers, termite thief ants
Oligomyrmex sp.11 of AMK	✓					–,W	–,–	–,–	*	
Oligomyrmex sp.1 of CUMZ	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	***	
Pheidole sp. 1 (eq 101)[a]	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	***	Many seed harvesters, many omnivorours
Pheidole sp. 2 (eq 141)[a]	✓	✓	✓		✓	D,W	D,W	–,–	**	
Pheidole noda (group)	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	–,–	**	
Pheidole planifrons	✓	✓	✓		✓	D,W	D,W	–,–	**	
Pheidole rabo	✓	✓	✓			–,–	–,–	D,W	*	
Pheidole rinae taipoana	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	***	
Pheidole sp.14 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	–,–	D,W	–,–	*	
Pheidole sp.2 of CUMZ	✓	✓	✓	✓		–,W		D,W	*	
Pheidole sp.3 of CUMZ	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	–,W		**	
Pheidologeton affinis	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	***	Generalized, and mass foragers
Pheidologeton diversus	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	–,–	*	
Pheidologeton pygmaeus	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	–,–	–,–	*	
Recurvidris sp.3 of AMK	✓	✓	✓	✓		D,W	D,W	–,–	*	Generalized foragers
Rhopalomastix sp.2 of AMK	✓					–,–	–,W	–,–	*	
Solenopsis geminata	✓	✓	✓	✓	✓	–,–	–,–	D,W	*	Generalized foragers
Strumigenys sp.6 of AMK					✓	–,W	–,–	–,–	*	Predators, especially of collembolans
Strumigenys sp.7 of AMK				✓		–,–	–,–	D, –	*	
Strumigenys sp.4 of AMK	✓		✓	✓	✓	–,–	D,W	D,W	**	
Tetramorium bicarinatum	✓		✓			–,–	D,W	–,–	*	Generalized foragers
Tetramorium kheperra	✓	✓	✓	✓	✓	–,W	D,W	D,W	**	
Tetramorium pacificum	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	–,W	–,–	*	
Tetramorium parvum					✓	–,W	–,–	–,–	*	
Tetramorium simillimum	✓	✓	✓	✓	✓	–,–	–,W	D,W	*	
Tetramorium smithi	✓					–,–	–,–	–,W	*	
Tetramorium sp.6 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	**	
Tetramorium sp.10 of AMK	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	–,–	–,–	*	
Vollenhovia sp.2 of AMK	✓					–,W	–,–	–,–	*	
Vollenhovia sp.7 of AMK	✓					–,W	–,W	–,–	*	
Ponerinae										
Amblyopone reclinata	✓				✓	–,W	–,W	–,–	*	Predators
Amblyopone sp.4 of AMK	✓					D, –	–,–	–,–	*	
Amblyopone sp.5 of AMK	✓					–,W	–,W	–,–	*	
Anochetus graeffei	✓		✓	✓	✓	D,W	–,–	D,W	**	Predators
Anochetus sp.1 of AMK	✓				✓	D,W	D,W	D, –	*	
Centromyrmex feae	✓			✓		D,W	–,–	–,–	*	Cryptic predators of termites
Diacamma vagans	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	–,–	**	Predators
Gnamptogenys bicolor	✓	✓	✓	✓	✓	–,–	D,W	D,W	*	Predators and scavengers

TABLE 1. Continues.

Subfamily/species	Collecting					Study sites			% Occurrence	Some biology (Brown, 2000)
	H	B	P	S	L	F	T	O		
Harpegnathos venator			✓			–,W	–,–	–,–	*	Predators
Hypoponera sp.3 of AMK	✓					–,–	–,–	–,W	*	Generalized foragers
Hypoponera sp.5 of AMK	✓		✓	✓		D,W	–,W	D,W	**	
Hypoponera sp.7 of AMK	✓			✓	✓	D,W	–,W	–,–	*	
Leptogenys birmana	✓				✓	–,W	–,–	–,–	*	Predators of isopods and mass foraging predators
Leptogenys diminuta	✓					D,W	–,–	–,–	*	
Leptogenys sp.1 of AMK	✓		✓			D,W	–,–	–,–	*	
Leptogenys sp.12 of AMK	✓		✓		✓	–,W	D,W	–,–	*	
Leptogenys sp.14 of AMK	✓		✓			–,W	–,–	–,W	*	
Leptogenys sp.23 of AMK	✓		✓			D,W	D,W	–,–	*	
Leptogenys sp.5 of AMK	✓					–,W	–,–	–,–	*	
Leptogenys sp.20 of AMK	✓			✓	✓	–,W	–,W	–,–	*	
Odontomachus rixosus	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	–,–	–,–	*	Predators
Odontoponera denticulata	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	***	Predators
Pachycondyla amblyops			✓			–,–	–,–	–,W	*	Predators
Pachycondyla astuta-group	✓		✓			D,W	–,–	–,–	*	
Pachycondyla leeuwenhoeki	✓		✓		✓	D,W	–,–	–,–	*	
Pachycondyla luteipes	✓	✓	✓	✓	✓	D,W	D,W	D,W	***	
Pachycondyla rufipes	✓		✓		✓	D,W	D,W	–,W	**	
Pachycondyla sp.5 of AMK	✓		✓	✓	✓	D,W	–,–	–,W	*	
Pachycondyla sp.7 of AMK	✓		✓	✓	✓	–,–	–,–	D,W	*	
Platythyrea parallela	✓					–,W	–,–	–,–	*	Predators, many on termites
Ponera sp.7 of AMK				✓		–,–	–,–	D, –	*	Predators of small arthropods
Probolomyrmex sp.4 of AMK	✓					–,W	–,–	–,–	*	Predators
Pseudomyrmecinae										
Tetraponera rufonigra		✓				–,–	D, –	–,–	*	–
Tetraponera allaborans	✓					D,W	–,–	–,–	*	
Tetraponera attenuata	✓		✓			D,W	–,W	–,–	*	
Tetraponera difficilis	✓					D, –	–,W	–,–	*	

[a]: eq-codes, codes of Katsuyuki Equchi for *Pheidole* spp.

RESULTS

Species diversity.– Across the three sites 129 ant species and morphologically recognizable taxa from 49 genera were recorded which represents a reasonably good species richness. In summary, these ants belong to the nine subfamilies; Aenictinae, Cerapachyinae, Dolichoderinae, Dorylinae, Formicinae, Leptanillinae, Myrmicinae, Ponerinae and Pseudomyrmecinae. Some species, such as *Pachycondyla luteipes*, *Pheidologeton affinis* and *Odontoponera denticulata*, were found in all three land use types, whilst other species, such as *Acropyga acutiventris*, *Polyrhachis (Myrma) illaudata*, *Odontomachus rixosus* and *Centromyrmex feae*, were found only in the forest. Whereas, some species, such as

TABLE 2. The species richness, the Shannon-Wiener's species diversity index, and the evenness index of ants from the three habitats outlined in the legend to Figure 1.

Study site	Mix deciduous forest	Teak plantation	Durian orchard
Species richness	100	77	46
Species diversity index	2.387	1.463	1.997
Evenness index	0.562	0.365	0.545

Camponotus (Myrmamblys) sp.1 of AMK, *Myrmicaria brunnea*, and *Cerapachys* sp.5 of AMK, were found only in the teak plantation and some species were found only in the orchard, such as *Pheidole rabo*, *Solenopsis geminata* and *Hypoponera* sp.3 of AMK (Table 1).

With respect to the comparative ant communities between the three sites, the highest number of species was recorded in the mixed deciduous forest followed by the teak plantation and the lowest in the durian orchard. The Shannon-Wiener's species diversity index indicated that the year round diversity was the highest in the mixed deciduous forest, followed by the durian orchard and lastly the teak plantation. Moreover, the highest value of the evenness index of ants was in the mixed deciduous forest, followed closely by the durian orchard, whereas that for the teak plantation was markedly lower (Table 2). This indicates that a relatively equal abundance of each ant species was present in the mixed deciduous forest and the durian orchard whereas the teak plantation had an unequal abundance of some ant species.

The species richness of ants between each sampling month in the forest and the teak plantation showed a similar trend, whereas a more constant richness was found in the durian orchard. The highest ant species richness was found in the reserve forest in all of the 13 sampled months, followed by the teak plantation and then the durian orchard, respectively. There was a difference in the number of ants species number between wet and dry seasons, where in the wet season (from April to October) ant species numbers were high in all three study sites and then lower in the dry season (from November to March). In the forest and the teak plantation, the highest ant diversity was in May 2008 whereas the lowest in the forest was in January and March 2008, and in the teak plantation was in March 2008. The orchard was different in that the highest ant species diversity numbers was in September and October 2007 and the lowest in the period of January to April 2008 (Fig. 2).

Species similarity.– The species similarity between the forest and the teak plantation, as evaluated by Sorensen's similarity coefficient, was the highest whilst that between the teak plantation and the durian orchard and between the forest and the durian orchard were intermediate and the lowest, respectively (Table 3).

The soil texture.– The three types of percentage of soil texture were similar trend in the forest and the durian orchard whereas the teak plantation was distinctively different having less sand, and more silt and clay as a percentage composition (Table 4).

TABLE 3. The Sorensen's similarity coefficient of ants from the three habitats outlined in the legend to Figure 1. Remark: F= mixed deciduous forest, T= teak plantation, and D= durian orchard

Sites	F	T	D
F	1	-	-
T	0.655	1	-
D	0.397	0.455	1

TABLE 4. The percentages of soil texture from the three habitats outlined in the legend to Figure 1.

Study sites	Soil texture (% ± SD)		
	Sand	Silt	Clay
Mixed deciduous forest	72.91±3.05	8.09±2.23	18.99±2.69
Teak plantation	47.53±1.53	19.33±0.58	34.14±1.00
Durian orchard	76.98±2.18	6.45±1.27	16.57±1.36

DISCUSSION

Both the species richness and the diversity indices of ants were highest in the mixed deciduous forest, whereas the ranked order (Forest > Teak > Durian and Forest > Durian > Teak for species richness and diversity, respectively) showed a slight difference between the teak plantation and the durian orchard. The relatively high ant species diversity in the mixed deciduous forest may be caused by the correspondingly high diversity in the plant community and as such would potentially reflect the differences in the canopy cover and leaf shedding. In this scenario, the leaf litter, soil moisture content, and leaf litter biomass in each study site would likely be affected by differences in each plant community, as reported by Bourmas (2005) and Hasin (2008). Additionally, in the dry season, the various plants in the mixed deciduous forest and the teak trees in the plantation shed their leaves, which did not occur to the same extent with the evergreen durian trees. However, in March 2008, there was a fire in the teak plantation which removed the leaf litter and consequentially the mixed deciduous forest had a higher leaf litter than the other sites, and was covered by the litter all year round. The leaf litter provides both food and nest sites to many ant species, so it might be expected that an addition of both resources will produce a stronger response from litter-nesting ants (Armbrecht et al., 2006). So, there were more leaf litter species in the forest than the teak plantation, such as *Paratrechina* sp.1 of AMK, *Paratrechina* sp.9 of AMK, and *Odontomachus rixosus*. The distinct soil texture in the teak plantation may be another reason since the higher in clay proportion makes this area very hard in the dry season and more saturated in the wet season, making it un suitable for ground nesting species. The interpretation of the data across these three different habitats with respect to land usage, like with respect to soil types is somewhat restricted by the fact that the data is derived from only one site per habitat, and thus an inability to state inter-habitat variation is greater than intra-habitat or inter-site variations independent of land usage. Regardless, the higher species richness of ants in the natural deciduous forest than in the teak plantation was similar to the reported trend for ant diversity at Sabah, Malaysia, which was higher in the primary and secondary forests than in the oil palm plantation (Yahya, 2000). Moreover, there were various microhabitats in the forest sites such as leaf litter, decaying logs and under stones or bark. In the forest site, many predatory ants were found including litter specialist predators, such as *Leptogenys* and *Oligomyrmex*, and litter generalist predators, such as *Hypoponera* and *Anochetus*.

Although the durian orchard had the lowest species richness, it had a higher evenness index than in the teak plantation, and was at almost the same level as the natural forest (ranking for evenness is Forest~Durian > Teak), which is reflected in the higher species diversity index than in the teak plantation. Another possible reason is that most of the ants found in the durian orchard were genera that usually form large colonies containing large numbers of workers and can easily be found all year round, such as *Pheidologeton*, *Pheidole* and

Solenopsis, reducing the risk of stochastic noise due to random missing of multiple but infrequent species at each site. In the durian orchard, the leaf litters were gathered around the tree, except after the harvesting period when the leaf litters were abandoned (June to August), so the moisture was maintained by the grass cover. The orchard was irrigated all year round, and especially in the dry season. These activities yield a higher moisture content in the orchard than in the teak plantation, leading to a relative abundance of soil arthropods, such as springtails, symphylans and diplurans, being found all year round, and thus in the presence of those predatory ant species that prey on them. Moreover, in the durian orchard, agrochemicals, such as pesticides and fertilizers, were applied all year round, so there were no arboreal ant species in this area except for *Polyrhachis* (*Campomyrma*) *halidayi*, which was found as only as one individual (reproductive caste) with no evidence of persistence (nest site or workers), whereas this species was persistent in the reserve forest.

The highest ant species richness was in the reserve forest in all 13 of the sampled months followed by the teak plantation and the orchard, respectively, supporting that the forest is a more suitable habitat than the teak plantation and the durian orchard, all year round. In the dry season, there were lower soil and litter moisture contents and a high temperature, conditions which are unsuitable for ants and their prey leading to a lower ant biodiversity and population levels and so a lower species number being recorded. In the wet season, there is more soil and litter moisture contents which are hence more suitable for many soil faunas that serve as ant prey. Thus, with an increase in the population size and potential biodiversity, a higher of predatory ants were found in this period. Legionary ants, also known as army ants (indicated in Table 1) were occasionally collected, and their action as mobile generalist predators in the litter layer can influence the composition of the fauna. However, although they were rarely found, care in estimating their actual abundance and significance is required due to their nomadic life-style with quiet large ranges and movement rates relative to the small sampling area and time periods (Delabie et al., 2000).

The similarity indices indicated that the species composition of ants between the natural forest and the teak plantation was higher than that between the forest and durian orchard. Compared with the primary land use as a natural forest, this result suggests that these two modified land usages reduce the ant diversity and that, despite the fire in the teak plantation during the sampling year, the durian orchard land can support a lower ant biodiversity than the teak plantation. This may be due to the fact that the tree canopy of the durian orchard was treated all year round by agrochemicals, including pyrethroid and organophosphate pesticides and the herbicide *Glyphosate* that can also affect some arthropods and other food sources such as weed nectar and seeds; and mixed fertilizers for nitrogen, phosphorus and potassium. These agrochemicals can differentially affect the ant species composition, through either direct poisoning or indirectly through loss of prey species, and so explain the different ant species composition in the durian orchard compared to that in the teak and natural mixed deciduous forests. Therefore, the canopy ants, even ant species commonly found in disturbed areas, such as *Oecophylla smaragdina* or other canopy ants such as *Crematogaster*, *Tetraponera*, and some *Polyrhachis* species were absent

in the durian plantation. Moreover, some predatory ants that might be of benefit in the control of certain insect pests in this area, such as *Odontoponera denticulata*, were regulated by the agrochemical practices of the farmer.

From this study, the difference in three sites, which may reflect the different land usages of these sites but that awaits more detailed studies to confirm, potentially influenced the ant community species diversity and composition, as somewhat intuitively expected but not to date ascertained for these habitats. Some species were found in all three land use types, whilst other species were more specialized being found only in specific microhabitats in the forest. If an understanding of microhabitats used by specific ant species can be developed, along with the key trophic interactions, then the potential of using ants as terrestrial indicator species for detecting environmental changes can potentially be reliably and easily (low cost and time) performed compared to some other indicator species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Thai government budget 2007, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity, the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University (CEB_M_37_2007), and the Chulalongkorn University Graduate Scholarship. Pitinan would like to thank the Ant Museum, Faculty of Forestry, Kasetsart University for their continual support and the people who helped at Thong Pha Phum District.

LITERATURE CITED

Agosti, D., Alonso, L.E., Majer, J.D. and Schultz, T. R. 2000. Ants: Standard method for measuring and monitoring biodiversity, Smithsonian Institution Press, Washington.

Alonso, L.E. 2000. Ants as indicators of diversity. In: Agosti, D., Alonso, L.E., Majer, J.D. and Schultz, T.R. (Eds). Ants: Standard method for measuring and monitoring biodiversity, Smithsonian Institution Press, Washington, 80-88 pp.

Alonso, L.E. and Agosti, D. 2000. Biological studies, monitoring, and ants: An overview. In: Agosti, D., Alonso, L.E., Majer, J.D. and Schultz, T.R. (Eds). Ants: Standard method for measuring and monitoring biodiversity. Smithsonian Institution Press, Washington, 1-8 pp.

Andersen, A. N., Hoffmann, B. D., Muller, W. J. and Griffiths, A. D. 2002. Using ants as bioindicator in land management: simplifying assessment of ant community responses. Journal of Applied Ecology, 39: 8- 17.

Armbrecht, I., Perfecto, I. and Silverman, E. 2006. Limitation of nesting resources for ants in Colombian forest and coffee plantations. Ecological Entomology, 31: 403-410.

Beamish, F.W.H. 2007. Thong Pha Phum: Synthesis of the aquatic projects with a view to the future. In: Baimai, V. and Tanthalakha, R. (Eds). BRT research reports 2007: Western Thong Pha Phum, Jirawat Express, Bangkok, 7-12 pp.

Bestelmeyer, B.T., Agosti, D., Alonso, L.E., Brandão, C.R.F., Brown, W.L.Jr., Delabie, J.H.C. and Silvestre, R. 2000. Field techniques for the study of ground-dwelling ants. In: Agosti, D., Alonso, L.E., Majer, J.D. and Schultz, T.R. (Eds). Ants: Standard method for measuring and monitoring biodiversity,Smithsonian Institution Press, Washington, 122-144 pp.

Bolton, B. 1994. Identification guide to the ant genera of the world, Harvard University Press, Cambridge, 222 pp.

Bolton, B., Alpert, G., Ward, P.S. and Naskrecki, P. 2006. Bolton's Catalogue of Ants of the World: 1758-2005, Harvard University Press, Cambridge.

Bourmas, C. 2005. Species diversity of ants at Huai Khayeng, Thong Pha Phum district, Kanchanaburi Province, Department of Forest Biology, Faculty of Forestry, Kasetsart University, 108 pp. (in Thai),

Brown, W.L.Jr. 2000. Diversity of ants. In: Agosti, D., Alonso, L. E., Majer, J. D. and Schultz, T. R. (Eds). Ants: Standard method for measuring and

monitoring biodiversity, Smithsonian Institution Press, Washington, 45-79 pp.

Delabie, J.H.C., Agosti, D. and Nascimento, I.C. 2000. Litter ant communities of the Brazilian Atlantic rain forest region. In: Agosti, D., Majer, J.D., Alonso, L.E. and Schultz, T.R. (Eds). Sampling ground-dwelling ants: Case studies from the world's rain forest, Curtin University, Perth, 1-17 pp.

Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, 2006. Laboratory manual for soil science, Kasetsart University, Bangkok, 198 pp. (in Thai)

Folgarait, P.J. 1998. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. Biodiversity and Conservation, 7: 1221-1244.

Folgarait, P.J., Gorosito, N. and Zipeto, G. 1997. Reduction of biodiversity by Camponotus punctulatus ants mediated by human disturbance. Association for Tropical Biology Annual Meeting. Symposium on Tropical Diversity, origins, maintenance and conservation. June 15-20, San Jose, Costa Rioca. 57 pp.

Hasin, S. 2008. Diversity and community structure of ants at Sakaerat Environmental Research Station, Nakhon Ratchasima province, Department of Forest Biology, Faculty of Forestry, Kasetsart University, 94 pp. (in Thai).

Hölldobler, B. and Wilson, E.O. 1990. The ants, Belknap Press, Cambridge, 732 pp.

Krebs, C.J. 1999. Ecological methodology, Addison-Educationall Publishers, California, 581 pp.

Lavelle, P. and Pashanasi, B. 1989. Soil microfauna and land management in Peruvian Amazonia (Yurimaguas, Loreto). Pedobiologia, 33: 283-291.

Lobry de Bruyn, L.A. 1999. Ants as bioindicators of soil function in rural environments. Agriculture, Ecosystems and Environment, 74: 425-441.

Majer, J.D. 1997. The use of pitfall traps for sampling ants – a critique. Memoris of Museum Victoria, 56: 323-329.

Majer, J.D. and Delabie, J.H.C. 1994. Comparison of the ant communities of annually inundated and terra firme forests at Trombetas in the Brazilian Amazon. Insects social, 41: 343-359.

Philpott, S.M. and Armbrecht, I. 2006. Biodiversity in tropical agroforests and the ecological role of ants and ant diversity in predatory function. Ecological Entomology, 31: 369-377.

Schultz, T.R., and McGlynn, T.P. 2000. The Interaction of Ants with Other Organisms. In: Agosti, D., Alonso, L.E., Majer, J.D. and Schultz, T.R. (Eds). Ants: Standard method for measuring and monitoring biodiversity, Smithsonian Institution Press, Washington, 35-44 pp.

Wilson, E.O. 1971. The insect societies. Cambridge: Belknap Press. Cited In: Agosti, D., Alonso, L.E., Majer, J.D. and Schultz, T.R. (Eds). Ants: Standard method for measuring and monitoring biodiversity, 2000, Smithsonian Institution Press, Washington, 9-24 pp.

Whitmore, T.C. 1975. Tropical rain forest of the Far East, Oxford, Clarendon Press, 352 pp.

Wiwatwitaya, D. and Jaitrong, W. 2001. Identification guide to the ant genera of Khao Yai National Park, Kasetsart University, Bangkok, 110 pp. (in Thai)

Yahya, B.E.B. 2000. The use of three insect groups as biological indicators in three ecohabitats of Sabah, School of Science and Technology, Universiti Malaysia Sabah, Malaysia, 182 pp.

ลำดับที่ 8

วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย

Journal of Wildlife in Thailand

ปีที่ 16 ฉบับที่ 1 ธันวาคม 2552

Volume.16 No.1 December 2009

คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Faculty of Forestry Kasetsart University

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย ปีที่ 16 ฉบับที่ 1

Journal of Wildlife in Thailand Vol.16 No.1

คณะที่ปรึกษา

คณบดีคณะวนศาสตร์ ผู้อำนวยการสำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า ผู้อำนวยการสำนักอุทยานแห่งชาติ

รศ. ดร. อุทิศ กุฏอินทร์ คุณจำรัส จึงธีรพานิช

บรรณาธิการ

ประทีป ด้วงแค

รองลาภ สุขมาสรวง ผู้ช่วยบรรณาธิการ

กองบรรณาธิการ

นริศ ภูมิภาคพันธ์	วิจักขณ์ ฉิมโฉม	ยงยุทธ ไตรสุรัตน์	อนรรฆ พัฒนวิบูลย์
ดอกรัก มารอด	นันทชัย พงษ์พัฒนานุรักษ์	ยอดชาย ช่วยเงิน	Lon I. Grassman, Jr.
George A. Gale	Michael Cota	Masatoshi Yasuda	Carola Borries
โดม ประทุมทอง	อิงอร ไชยเยศ		

สำนักงาน

ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2579-0176

โทรสาร 0-2942-8107 (คุณเพ็ญศรี ขอบเขตต์)

พิมพ์ที่

โรงพิมพ์และทำปกเจริญผล

20/21-22 ถ.นนทบุรี(สนามบินน้ำ) ต.บางกระสอ จ.นนทบุรี 11000

โทร0-29680661 โทรสาร 0-29680664

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

คำนำ

วารสารสัตว์ป่าเมืองไทยฉบับนี้ได้จัดทำเป็นฉบับพิเศษ ในโอกาสที่ การสัมมนาวิชาการเรื่อง สัตว์ป่าเมืองไทยได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องติดต่อกันมาจนครบรอบ 30ปี และได้จัดการสัมมนาภายใต้หัวข้อ "30ปี การสัมมนาเรื่องสัตวป่าเมืองไทย:ความสำเร็จในอดีต กับการท้าทายในอนาคต (To Celebrate the 30th Anniversary of Thai Wildlife Seminar :Past Achievements and Future Challenges)" ดังนั้นวารสารฉบับนี้จึงแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือหนึ่งความคิดเห็น มุมมอง และนานาทรรศนะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ป่าเมืองไทยอันทรงคุณค่ายิ่งจากผู้ที่มีประสบการณ์ตรงในแต่ละสาขาต่างๆ และยินดีมอบข้อเขียนดังกล่าวเพื่อถ่ายทอดมุมมองที่ถือว่าประโยชน์อย่างมากต่อวงการอนุรักษ์สัตว์ป่าของประเทศไทยในอนาคต จำนวน 14 เรื่อง ซึ่งทางกองบรรณาธิการใคร่ขอถือโอกาสนี้แสดงความขอบพระคุณเป็นอย่างสูงยิ่งต่อเจ้าของบทความดังกล่าว และส่วนที่สองนั้นยังคงเป็นงานวิจัยด้านสัตว์ป่าของประเทศไทยอีกจำนวน 6 เรื่อง

สำหรับวารสารสัตว์ป่าเมืองไทย ได้เผยแพร่มาอย่างต่อเนื่อง จนมาถึงปัจจุบัน เป็นปีที่ 16 และทางกองบรรณาธิการได้รับทราบผลค่า Journal Impact Factor ของวารสารสัตว์ป่าเมืองไทย ในปี พ.ศ. 2551 โดยศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย มีค่า เท่ากับ 0.036 และมีค่า Cited Half-life มากกว่า 10 จัดอยู่ในลำดับที่ 77 จากวารสารทั้งหมด 164 ฉบับ (*โดยวารสารที่มีค่า Journal Impact Factor สูงสุดเท่ากับ 0.750 โดย ลำดับที่ 1 ถึง 20 ส่วนใหญ่เป็นวารสารทางการแพทย์ และ มีจำนวน 9 ฉบับที่มีค่า เท่ากับศูนย์ ติดตามรายละเอียดตามได้ที่* http://www.kmutt.ac.th/jif/public_html/T-JIF.html) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้อันดีอย่างหนึ่งว่าเนื้อหาในวารสารนี้ มีบุคคลให้ความสนใจติดตามและใช้อ้างอิงประกอบในการเขียนบทความวิจัย ดังนั้นจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าในอนาคต จะมีผู้สนใจใช้วารสารฉบับนี้เป็นแหล่งอ้างอิง และทำให้ค่า Journal Impact Factor ของวารสารสัตว์ป่าเมืองไทยมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

การจัดพิมพ์วารสารสัตว์ป่าเมืองไทยฉบับนี้ที่สำเร็จลุล่วงเป็นเพราะได้รับการสนับสนุนจากสองหน่วยงานหลัก คือสำนักความหลากหลายทางชีวภาพ สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และสมาคมอนุรักษ์สัตว์ป่า - ประเทศไทย (Wildlife Conservation Society – Thailand Program) ที่ได้เป็นเจ้าภาพร่วมในการการสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที่ 30 ตลอดจนความร่วมมือในการตรวจทาน แก้ไข และคำแนะ จากกองบรรณาธิการทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือด้วยดีเสมอมาและสุดท้ายต้องขอขอบคุณทีมงานจากหนังสือ Advanced Thailand Geographic ที่ช่วยในการออกแบบปกวารสารฉบันนี้ ทางคณะบรรณาธิการต้องขอกล่าวขอบคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

กองบรรณาธิการ

GENETIC VARIATION OF GREEN PEAFOWLS *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 IN NORTHERN AND WESTERN THAILAND BASED ON MICROSATELLITE DNA

Pirach Thawonwan[1/]* Wina Meckvichai[1/] Pataradorn Pinyopich[1/]

ABSTRACT

Genetic variation of green peafowl (*Pavo muticus*, Linnaeus, 1766) between northern and western part of Thailand (northern population from Ping basin and western population from Huai Kha Khaeng basin) were analyzed by using 8 microsatellite loci of 25 individual per site. Genomic DNA was extracted from feather tips and was amplified by polymerase chain reaction. Amplification with 8 microsatellite primers of HUJ002, LEI166, MCW034, MCW069, MCW080, MCW068, MCW295, and MCW330, the results showed that the total allelic numbers per locus were 2, 2, 4, 2, 3, 2, 4, and 2, respectively. Mean number of alleles per locus of green peafowl from northern and western part of Thailand were 2.13 and 2.25, respectively. The mean of expected heterozygosity (H_E) of green peafowl population were 0.40 and 0.42, respectively and it was not significantly different between populations. Green peafowl from northern part and western part were small and large population, respectively and had random mating because from Hardy-Weinberg assumption, green peafowl from northern part and western part at all loci no deviated from this assumption. Genetic differentiation within both populations of green peafowl was higher than genetic differentiation between populations. The genetic distance of green peafowl between northern and western populations were 0.1956.

Key words : *green peafowl, microsatellite DNA, genetic variation*

INTRODUCTION

The historical range of green peafowl covers large area in East and South-east Asia, from India to Indo-China and Java. In most of its range, however, it is locally and patchily distributed, and it is probably extinct in some places, e.g., northeast India and Malaysia (Johnsgard, 1986). Though protected by law in a number of countries, e.g. Indonesia (Abdullah et al., 1978), Thailand, Malaysia (Johnsgard, 1986) and Burma (Collar and Andrew, 1988), the species has continued to decline, due to excessive hunting for its feathers, meat or chicks (for sale, or to be kept as pets). Because of this, the species is nominated as vulnerable in the revised IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources, 2008). At present in Thailand, green peafowl have been reported in many

[1/]Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand*E-mail: tombio@hotmail.com

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

areas from northern and western, but about 1,500 birds are only confirmed in Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary in the western part that is the highest population. In northern, it is found along Ping, Ing, Yom and Nan basin such as Doi Phu Nang National Park, Mae Yom National Park and Wiang Loh Wildlife Sanctuary. Furthermore, green peafowl have been found at Huai Hong Krai Royal Development Study Center. There are about 56 birds (Meckvichai et al., 2007).

In wildlife conservation, genetic variation in population level is important information in a long run, because genetic variation is the essential quality for adaptation of animals to survival. Then, it is necessary to study genetic variation within and between two populations of green peafowl in Thailand from northern and western, by using microsatellite DNA technique.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-five feather specimens of green peafowl (*Pavo muticus*) from the Natural History Museum of Chulalongkorn university that were collected from each area; northern part (Huai Hong Krai Royal Development Study Center, Chiang Mai province) and western part (Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary, Uthai Thani province) were used. For outgroup, twelve blood specimens of red jungle fowl (*Gallus gallus spadiceus* Bonnaterre, 1792) from the Natural History Museum of Chulalongkorn University that were collected from Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary, Uthai Thani province were used. Nuclear DNA was extracted from the feather tip and blood specimen using QIAamp® DNA Mini Kit (by dried blood spot protocol). Concentration of extracted DNA was measured and estimated by UV absorption of Spectrophotometer. Extracted DNA solution could absorb UV at wave length 260 nm (OD_{260}).

Eight pairs of oligonucleotide primers were chosen from several publications HUJ002 (Wutthivikaikan, 2003), LEI166, MCW080, MCW098, MCW034, MCW069, MCW295 and MCW330 (Bao et al., 2006). The characteristics of all selected primer are shown in table 1.

The PCR reaction mixture was composed of each at 0.2 μM, dNTP each at 1 mM, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.0 unit of Taq DNA polymerase per 25 μL, 30-50 ng template of genomic DNA. The composition of enzyme storage buffer was 20 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT and 100 mM KCl. The temperature cycling was as following. Denaturing was 94°C for 3 minutes. Annealing was for 60 seconds at 53°C - 55°C. The extension was at 72°C for 90 seconds. The reaction was carried out for 35 cycles. The final extension was at 72°C for 10 minutes. PCR products were detected with 8% denaturing polyacrylamide gel that based on electrophoresis technique. Set of

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

100bp+1.5 kb DNA ladder were used as standard size DNA marker. The gel was prepared for visualization of PCR products by silver staining. Observed of PCR products banding pattern were scored by eye. The data was analyzed in these topics:

Allele Frequency

Differences in microsatellite allele frequency between two varieties of green peafowl were assessed using Fisher's exact test in GENEPOP program (Taylor et al., 1994). Allele frequency could be calculated by software GENEPOP (Raymond and Rousset, 1995) .The mean number of alleles per locus (A) was calculated to compare genetic variation between varieties by a one-way ANOVA (Taylor et al., 1994). The effective number of alleles per locus (n_e) was calculated.

Heterozygosity

When the variety was in Hardy-Wienberg equilibrium, heterozygosity could be calculated from heterozygous allele frequencies at a given locus (Hoelzel, 1992). Expected from Hardy-Wienberg assumption could be calculated and examined using the package GENEPOP, (Raymond and Rousset, 1995). Generally, mean of observed (H_{obs}) heterozygosity and expected from Hardy-Wienberg assumption (H_{exp}) of overall locus was calculated for comparison of genetic variation between varieties. Difference in H_{obs} and H_{exp} were assessed by a Wilcixon signed rank test (Taylor et al., 1994).

Hardy-Wienberg Equilibrium

Genotype frequencies were tested against Hardy-Wienberg expectation for each locus and all varieties. The probability of type I error was estimated using a Markov chain method approximation to exact test (Gao and Thompson, 1992). This test was carried out using the GENEPOP program (Raymond and Rousset, 1995). A sequential Bonferroni correction method was used to adjust significance levels for multiple test (Lessios, 1992).

Genotypic linkage disequilibrium test

This parameter was tested by using program GENEPOP. It was used a Markov chain method following the algorithm of Gao and Thomson (1992). Significant level was adjusted by a Bonferroni method (Lessios, 1992).

Differentiation between varieties test

The statistically significant differences were tested using the exact test of genetic differentiation of GENEPOP. The probability of Type I error (P-value) was estimated using a Markov chain method (Raymond and Rousset, 1995). To diminish type I error, level of significant was further adjusted using the Bonferroni method.

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

Genetic distance analysis

Genetic distance was calculated and computational estimated by using GENDIST (Felsenstein, 1993).

RESULTS AND DISCUSSION

The concentration of extracted DNA had ranged from 14.05 - 61.70 μg/mL. The number of allele and allele frequency of green peafowl from northern, from western and red jungle fowl of each microsatellite loci are shown in Table 2.

Numbers of microsatellite allele in each locus are high (2-4 alleles). Each locus of this study showed many different alleles and some rare alleles that have low allele frequency. Green peafowl from western at MCW034 locus have shown unique allele that allele frequency is 0.014. Unique allele is specific region of each population. Generally, if the unique allele frequency is approximate 0.9, this allele is possible to be for identifying its own out from others (Lovette, 1998). However, unique alleles in this study have low allele frequency.

Two varieties of green peafowl and red jungle fowl were measured the mean number of alleles per locus (A) and compared by Wilcoxon sign rank test. The result showed no significant mean difference between varieties (P=0.317). It can be indicated that between populations of green peafowl from northern and western had nearly of allele number. The mean of effective number of alleles per locus (a_e) was calculated and compared by Wilcoxon sign rank test in each variety. The result showed no significant mean difference between varieties (P=0.498). The mean of observed heterozygosity (H_O) and expected from Hardy-Wienberg assumption (H_E) of each population for all loci were calculated. The mean observed (H_O) and expected from Hardy-Wienberg (H_E) heterozygosities showed no significant difference (P=0.180), that mean heterozygosity is no different in population level. Therefore, H_E can be used to compare genetic diversity between populations, because it reduces estimation error of rare alleles. The result is shown in Table 3.

The difference of mean expected heterozygosity (H_E) was compared between varieties and assessed by Wilcoxon sign rank test. The result showed no significant difference of H_E between varieties (P=0.889). This result is caused by microsatellite DNA that highly mutation rate, it permits high polymorphism of alleles which increasing the chance to find heterozygous allele. The result is shown in Table 4.

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

The Hardy-Wienberg assumption was carried out using an exact test that conformed the Hardy-Wienberg assumption to all of microsattelite loci. The result is shown in Table 5.

The result showed all microsatellite loci conformed to Hardy-Wienbreg assumption ($P>0.05$). It explained that observed and expected heterozygosity is no different, and microsatellite loci are selected to random association.

The different region of microsatellite loci can effect to genetic linkage on the allelic distribution (Ciampolini et al., 1995). Genetic linkage disequilibrium is used for provide the different region of microsatellite loci. The microsatellite DNA at HUJ002, LEI166, MCW034, MCW069, MCW080, MCW098, MCW295 and MCW330 locus are located at chromosome 17^{th}, 5^{th}, 2^{th}, E46C08W48, 15^{th}, 4^{th}, 4^{th} and 17^{th}, respectively. The exact test for genotypic linkage disequilibrium showed each locus pair conformed to the genetic linkage equilibrium excepted MCW098 - MCW295 locus, which locate on the same chromosome, showed no significance of the linkage disequilibrium ($P=0.423$). It explained that both loci locate on far distance region. But for HUJ002 - MCW330 locus showed significance of the linkage disequilibrium ($P=0.07$). It explained that HUJ002 locus is not independent from MCW330 locus, and showed that the alleles of these loci are not random association. This result is shown in Table 6.

The northern green peafowl showed no significant difference from the western green peafowl at LEI166, MCW098, MCW295 and MCW330 locus whereas other loci showed significant difference. The result is shown in Table 7.

It may explain that each population of green peafowl has alike genetic information and period of time is not enough to clearly revealed genetic differentiation between populations. Therefore, the geographic isolation can not separate green peafowl population to two sub-populations but in long time green peafowl population can separate to sub-population. Furthermore, selected microsatellite loci exhibits many different alleles, so it increases chance to show significant genetic differentiation within and between populations and the genetic differentiation within population is more than between populations (Mindell, 1997).

The allele frequency at eight microsatellite loci in each pair of varieties was used to calculate the genetic distance. The genetic distance of green peafowl between northern and western populations were 0.1956. The result is shown in Table 8.

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

CONCLUSION AND RECOMMENDATION

Genetic variation within population of green peafowl

Green peafowl are high genetic variation because there are highly number of alleles per locus and highly observed heterozygosity.

Genetic variation between varieties of green peafowl

Genetic variation between green peafowl populations in Thailand may not different because observed and expected heterozygosity of green peafowl from northern and western part are closely related and not different. Number of alleles per locus of green peafowl from northern part is different from western part. However, mean effective number of alleles per locus is the better parameter for determining genetic variation. It shows that green peafowl from northern and western are not statistic different.

In this study, only eight microsatellite loci were determined for genetic variation analysis. In addition, each microsatellite loci showed high number of alleles, and that some alleles showed low allele frequency (lower than 0.1). Because microsatellite DNA markers are neutral marker that not under the selection process and show a high mutation rate, leading to many different alleles, which low allele frequency (Wolfus et al., 1997). Moreover, different mutation process between microsatellite markers may be provided opportunities and probabilities of complicated for analysis of population. The stepwise mutation process whereby repeats was usually added one at a time suggested that similarity of length reflected allelic relatedness and showed band sharing between population (Mindell, 1997). As a result, the study at populations level over which microsatellite provide sufficient resolution may be narrower than that mutate more slowly, such as mitochondrial DNA that may be showed clearly genetic differentiation between population levels.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Thai government budget 2007, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity and the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn (CEB_M_38_2007). The first author also wishes to grateful thank Assoc. Prof. Wina Meckvichai, Dr. Pataradawn Pinyopich and all members in the Ornithology Research Laboratory and the Molecular-Biology Research Laboratory, Faculty of Science, Chulalongkorn University for supporting and consulting. Special thanks to Mr. Sathit Malawong and Miss. Waree Wutthivikaikan for training technique in molecular laboratory.

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

REFERENCES

Abdullah, A., Subijanto & Suwelo, I. S. 1978. Protected wildlife in Indonesia. In: McNeely, J. A., Rabor, D. S. and Sumardja, E. A. (Eds). Proceedings of the Biotrop symposium on animal populations and Wildlife management in Southeast Asia. **Biotrop Special Publications**, 8: 23-39.

Bao Wen-Bin, Chen Guo-Hong, Shu Jing-Ting, Xu Qi & Li Hui-Fang. 2006. Screening of peafowl microsatellite primers and analysis of genetic diversity. **HEREDITAS**, 28(10):1242-1246.

Ciampolini, R., Goudarzi, K. M., Vaiman, D., Dillman, C., Mazzanti, E., Foulley, J. L., Leveziel, H. & Dario, C. 1995. Individual multilocus genotypes using microsatellte polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. **Animal Science**, 73: 3259-3268.

Collar, N. J. & Andrew, P. 1988. **Birds to watch. The ICBP world check-list of threatened birds. ICBP**. Technical Publication No. 8, Cambridge, 330 pp.

Felsenstein, J. 1993. **PHYLIP: Phylogeny Inference Package (program version 3.5)**. University of Washington, Seattle.

Gao, S. W. & Thompson, E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multi alleles. **Biometrics**, 48: 361-372.

Hoelzel, A. R. 1992. **Molecular genetic analysis of population. A practical approach**. IRL Press, New York.

Johnsgard, P. A. 1986. **The pheasants of the world**. Oxford University Press, Oxford, 350 pp.

Lessios, H. A. 1992. Testing eletrophoretic data for agreement with Hardy-Wienbreg expectations. **Marine Biology**, 112: 517-523.

Lovette, I. J., Bermingham, E. & Ricklefs, R. E. 1998. Evolutionary differentiation in three endemic West Indian Warblers. **The Auk**, 115(4): 890-903.

Meckvichai, W., Asirapoj, S., Wonghongsa, S. & Pitdamkham, C. 2007. The distribution and abundance of green peafowl *Pavo muticus* in Thailand in **The 4th International Galliformes Symposium**. October 14-21, 2007, Chengdu and Wolong, China.

Mindell, D. P. 1997. **Avian molecular evolution and systematic**. The Associated Press academic, New York.

Raymond, M. & Rousset, F. 2003. A population genetic software for exact test and ecumenicist: GENEPOP version 3.4. **Heredity**, 68: 248-249.

Saitou, N. & Nei, M. 1987. The Neighbor-joining method: a new method for Reconstructing phylogenic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4: 406-425.

Taylor, A. C., Sherwin, W. B. & Wayne, R. K. 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the Northern hairy-nosed wombat *Lasiorhinus krefftii*. **Molecular Ecology**, 3: 277-290.

Wolfus, G. M., Garcia, D. K. & Warren, A. A. 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. **Aquaculture**, 60148: 1-13.

Wutthivikaikan, W. 2003. **Development of microsatellite DNA for study in green peafowl population by using chicken derived primers**. Master Thesis. Program of Biotechnology, Graduate School, Chulalongkorn University.

TABLE LEGENDS

Table 1. Characteristics of eight selected green peafowl microsatellite PCR primers.

Locus	Forward sequence/Reward sequence	Tm (°C)	Product size (bp)	Chromosome no.
HUJ002	5' CATCTCACAGAGCAGCAGTG 3'	55	124-142	17
	5' GAATCCTGGATGTCAAAGCC 3'			
LEI166	5' CTCCTGCCCTTAGCTACGCA 3'	53	254-267	5
	5' TATCCCCTGGCTGGGAGTTT 3'			
MCW034	5' TGCACGCACTTACATACTTAGAGA 3'	53	223-245	2
	5' TGTCCTTCCAAATTACATTCATGGG 3'			
MCW069	5' GCACTCGAGAAAACTTCCTGCG 3'	53	159-168	E46C08W48
	5' ATTGCTTCAGCAAGCATGGGAGGA 3'			
MCW080	5' GAAATGGTACAGTGCAGTTGG 3'	53	272-282	15
	5' CCGTGCATTCTTAATTGACAG 3'			
MCW098	5' GGCTGCTTTGTGCTCTTCTCG 3'	53	260-262	4
	5' CGATGGTCGTAATTCTCACGT 3'			
MCW295	5' ATCACTACAGAACACCCTCTC 3'	55	94-107	4
	5' TATGTATGCACGCAGATATCC 3'			
MCW330	5' TGGACCTCATCAGTCTGACAG 3'	53	260-290	17
	5' AATGTTCTCATAGAGTTCCTGC 3'			

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

Table 2. The allele number and allele frequency of green peafowl from northern, western and red jungle fowl were analyzed by eight microsatellite loci.

Locus	Allele number and allele frequency									
	Green peafowl northern			Green peafowl western			Red jungle fowl			
	no. 1	no. 2	no. 3	no. 1	no. 2	no. 3	no. 1	no. 2	no. 3	no. 4
HUJ002	0.800	0.200	-	0.520	0.480	-	0.833	0.167	-	-
LEI166	0.620	0.380	-	0.700	0.300	-	0.727	0.273	-	-
MCW034	0.940	0.060	-	0.200	0.660	0.140	0.333	0.333	0.167	0.167
MCW069	0.620	0.380	-	0.200	0.800	-	0.500	0.500	-	-
MCW080	0.460	0.500	0.040	0.260	0.380	0.360	0.500	0.500	-	-
MCW098	0.680	0.320	-	0.780	0.220	-	0.833	0.167	-	-
MCW295	0.620	0.380	-	0.780	0.220	-	0.625	0.125	0.208	0.042
MCW330	0.780	0.220	-	0.840	0.160	-	0.500	0.500	-	-

Table 3. The mean number of sample size (N), mean number of alleles per locus (A), mean effective number of alleles per locus (a_e), mean observed Heterozygosity (H_O) and expected Hardy-Wienberg assumption (H_E) of green peafowl from northern, western and red jungle fowl were analyzed by eight microsatellite loci.

Population	N	A	a_e	H_O	H_E
Green peafowl northern	25	2.13	1.73	0.58	0.40
Green peafowl western	25	2.25	1.81	0.50	0.42
Red jungle fowl	12	2.50	2.00	0.60	0.49

Table 4. Comparison of mean number of alleles per locus (A), mean effective of allele (a_e) and mean expected heterozygosity (H_E) between populations of green peafowl from northern and western by Wilcoxon sign rank test.

Parameters	P - value
A	0.317
a_e	0.498
H_E	0.889

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

Table 5. The estimation under Hardy-Wienberg assumption of green peafowl from northern, western and red jungle fowl was analyzed by eight microsatellite loci.

Locus	P - value		
	Green peafowl northern	Green peafowl western	Red jungle fowl
HUJ002	1 ns	0.2418 ns	1 ns
LEI166	1 ns	1 ns	1 ns
MCW034	1 ns	0.4190 ns	1 ns
MCW069	0.8011 ns	1 ns	1 ns
MCW080	1 ns	0.5235 ns	1 ns
MCW098	1 ns	1 ns	1 ns
MCW295	1 ns	1 ns	0.0672 ns
MCW330	1 ns	1 ns	0.4486 ns

* Significant level was further adjusted by using a Bonferoni method, ns no significant

Table 6. The pair wise comparison of genetic linkage disequilibrium between eight microsatellite loci of investigated populations.

Locus pairs	P - value	Locus pairs	P - value
HUJ002&LEI166	0.001*	MCW034&MCW080	0.242 ns
HUJ002&MCW034	0.059 ns	MCW034&MCW098	0.636 ns
HUJ002&MCW069	0.087 ns	MCW034&MCW295	0.332 ns
HUJ002&MCW080	0.003*	MCW034&MCW330	0.018*
HUJ002&MCW098	0.026*	MCW069&MCW080	0.597 ns
HUJ002&MCW295	0.458 ns	MCW069&MCW098	0.087 ns
HUJ002&MCW330	0.007*	MCW069&MCW295	0.531 ns
LEI166&MCW034	0.916 ns	MCW069&MCW330	0.219 ns
LEI166&MCW069	0.451 ns	MCW080&MCW098	0.836 ns
LEI166&MCW080	0.008*	MCW080&MCW295	0.114 ns
LEI166&MCW098	0.439 ns	MCW080&MCW330	0.129 ns
LEI166&MCW295	0.570 ns	MCW098&MCW295	0.423 ns
LEI166&MCW330	0.403 ns	MCW098&MCW330	0.941 ns
MCW034&MCW069	0.080 ns	MCW295&MCW330	0.414 ns

* Significant level was further adjusted by using a Bonferoni method, ns no significant

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

Table 7. The pair wise comparison of contingency tests of differentiation between green peafowl populations from northern, western and red jungle fowl by eight microsatellite loci. (GN = green peafowl from northern, GW = green peafowl from western, RF = red jungle fowl)

Varieties pairs	P - value							
	HUJ002	LEI166	MCW034	MCW069	MCW080	MCW098	MCW295	MCW330
GN&GW	0.0055*	0.5304^{ns}	0.0000*	0.0000*	0.0002*	0.3582^{ns}	0.1224^{ns}	0.4574^{ns}
GN&RF	1.0000^{ns}	0.4330^{ns}	0.0000*	0.4493^{ns}	1.0000^{ns}	0.2597^{ns}	0.0006*	0.0660^{ns}
GW&RF	0.0112*	1.0000^{ns}	0.0050*	0.0147*	0.0006*	0.7596^{ns}	0.0016*	0.0108*

* Significant level was further adjusted by using a Bonferoni method, ^{ns} no significant

Table 8. The pair wise comparison of genetic distance between green peafowl population from northern and western by using GENDIST.

	Green peafowl northern	Green peafowl western	Red jungle fowl
Green peafowl northern	-		
Green peafowl western	0.1956	-	
Red jungle fowl	0.1705	0.1974	-

เอกสารนี้ทำขึ้นเพื่อแจกในวาระครบรอบ 30 ปี การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย

ลำดับที่ 9

ความชุกชุมของสัตว์ผู้ล่าและกิจกรรมของมนุษย์ที่มีผลต่อความชุกชมของนกยูงไทยในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง

INFLUENCE OF PREDATOR ABUNDANCE AND HUMAN ACTIVITIES ON GREEN PEAFOWL (*PAVO MUTICUS*) ABUNDANCE IN HUAI KHA KHAENG WILDLIFE SANCTUARY

ธัญวรัตน์ ปิ่นทอง[1] และ วีณา เมฆวิชัย[2]

Tanwarat Pinthong[1] and Wina Meckvichai[2]

[1]Environmental science (interdisciplinary), Graduate school,
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

บทคัดย่อ : นกยูงไทย (*Pavo muticus*) ถูกจัดอยู่ในสถานะภาพสัตว์ป่าหายาก เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากจำนวนประชากรได้ลดลงมากจากในอดีต สาเหตุจากจากการสูญเสียถิ่นที่อยู่อาศัย การขาดความต่อเนื่องของถิ่นที่อยู่อาศัย และการรบกวนของมนุษย์ จากการศึกษาความชุกชุมของประชากรนกยูงเขียวในรอบปี ครอบคลุมฤดูแล้งและฤดูฝน ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม 2551 ในถิ่นอาศัยทั้ง 4 แบบ พบว่ามีความชุกชุมของประชากร นกยูงมากที่สุดในพื้นที่อนุรักษ์ที่ ใกล้แหล่งน้ำ และน้อยที่สุดบริเวณถนนในพื้นที่อนุรักษ์ (1.71 และ 0.06 ตัว/กิโลเมตร) เมื่อเปรียบเทียบความชุกชุมของประชากรนกยู งในพื้นที่เดียวกันกับการศึกษาที่ผ่านมา ในปี 2536 โดย สมชาย พลเยี่ยม และในปี 2549 โดย วีณา เมฆวิชัยและคณะ ผลปรากฏว่าประชากรนกยูงมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ภัยคุกคามจากมนุษย์ลดลงและสภาพป่าโดยรอบมีการฟื้นตัว

Abstract: In Thailand, Green peafowl (*Pavo muticus*) is classified as an endangered species, according to their heavily population decline in which due to habitat loss, fragmentation and human persecution. The abundance of Green peafowl were studied during January–December 2008 in four areas at Huai Song Thang, Huai Thab Slao, Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary Road and Wildlife breeding station Road. We examined and compared Green peafowl relative abundance between dry (November-April) and wet season (May-October) in 2008, compared relative abundance from the current study to the previous studies which conducted by Pon-Aiem in 1995 and Meckvichai and co-authors in 2006. We found that Green peafowl relative abundance was significantly difference among habitats ($P < 0.01$), The highest relative abundance was found in wildlife sanctuary area, in Huai Song Thang and Huai Tab Slao, and the lowest was found in Huai Kha Khaeng Road (1.71 and 0.06 bird/km.). According to results from previous study, Green peafowl seem to be recovering in Huai Song Thang and Huai Tab Slao areas.

Introduction: Green peafowl (*Pavo muticus*) is one largest ground bird inhabiting riverine habitat along main rivers in northern and western of Thailand. Largest population of Green peafowl in Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary is found in Western part of the

country, along Huai Kha Khaeng River. The highest abundance was found in Huai Aei Yo, 4 birds/km. and the lowest density was found in Huai Kra Ding, 0.14 birds/km. (Meckvichai, *et al.*, 2006).

However, the population of Green peafowl (*Pavo muticus*) is dramatically declining due to habitat loss and fragmentation in association with several threats e.g. over hunting, egg and chick collection, and chemical contamination to their food by intensive agricultural activities (Balen *et al.*, 1995; Meckvichai *et al.*, 2001; Brickle, 2002). The species is hence classified as vulnerable species by Bird Life International (2001) and IUCN (2007) and classified as endangered species by the Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (ONEP: 1997).

In order to investigate Green peafowl demographical changes pattern, through time and across different level disturbance, we examined and compared Green peafowl relative abundance in dry and wet season, compared relative abundance from the current study to previous studies and, moreover, among four areas which are differently protected and managed, including wildlife sanctuary area, the buffer area between wildlife sanctuary and community forest, community forest, and wildlife breeding station area.

Methodology: *Study sites* — we surveyed Green peafowl relative abundance along five transects in four areas. Three transects were laid in wildlife sanctuary area; one 4-km transect in Huai Song Thang, one 10-km transect in Huai Thab Slao, and one 6-km transect in Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary. One 3-km transect was located in buffer area between Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary and community forest. Lastly two transects were located in community forest, 1.9-km in Huai Tab Slao and 2.6-km in Wildlife breeding station area (Figure 1).

Peafowl survey — we monthly walked along five transects and counted number of signs which are; sighting, call, track, and scat of Green peafowl and potential predators, i.e. Felids, Viverids, Canids, and large raptors (Ponsena, 1988), from January-December 2008. Moreover, we recorded evidence of human activities, sighting, hearing, foot print, and all sign of poaching, along transects. Lastly, we monthly recorded level of environmental changes e.g. flooding and erosion.

Data analysis — we compared abundance form current study to previous studies using Chi-square test. Relative abundance of green peafowl in each season, transect and type of area were compared by using Mann-Whithney test. Lastly, we examined association between relative abundances of Green peafowl, predators' track, and human activities by Spearman's correlation tests. Critical values were set at 0.05 for all tests.

Results, Discussion and Conclusion: We found that Green peafowl relative abundance was significantly difference among habitats (Kruskal-Wallis chi-squared = 10.5483, $P < 0.01$). Highest relative abundance was found in wildlife sanctuary area, in Huai Song Thang1 and Huai Tab Slao1. Lowest relative abundance was found in Huai Kha Khaeng Road2. According to results from the previous study, Green peafowl seem to be recovering in Haui Song Thang1 and Huai Tab Slao1 areas. Predator's sign relative abundance was highest in wildlife sanctuary area and also around breeding research station. The lowest relative abundance in one area of wildlife sanctuary was explained by high human activity and environmental changes (Table1). However, relative abundance

were not seem to correlate with predator's abundance ($P = 0.009$, $r_s = 0.35$) and human activity ($P = 0.1772$, $r_s = 0.32$) and not correlated to environmental changes.

References:

1. Balen, S.; Prawiradilaga, D. M.; and Indrawan, M. (1995). The distribution and status of green peafowl *Pavo muticus* in Java. *Biological Conservation* 71(3): pp. 289-297.

2. BirdLife International. (2001).Green Peafowl: *Pavo muticus*. In N. J. Collar; A. V. Andreev; S. Chan; . J. Crosby; S. Subramaya; and J. A. Tobias (eds.) *The birdlife international red data book: Threatened birds of Asia.* England: The Red Data Book publication.

3. Brickle, N. W.; Nguyen Cu; Ha Quy Quynh; Nguyen Thai Tu Cuong; and Hoang Van San. (1998*). The status and distribution of green peafowl Pavo muticus in Dak Lak province, Vietnam.* Hanoi: BirdLife International Vietnam Programme.

4. International Union for Conservation of Nature and Natural Resource, IUCN. (2007). *2007 IUCN Red List Category.* Gland, Switzerland: IUCN.

5. Meckvichai, W.; Siripong, A.; and Srikwan, S. (2001). Biodiversity and management guideline approach for conservation ofpheasants at upper north of Thailand. *Proceeding of 6th BRT annual meeting 8-11 October 2001*, Phisanuloak Province.

6. Ponsena, P. (1988). *Biological characteristics and breeding behaviors of green peafowl (Pavo muticus (Linnaeus)) in Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary.* Master Thesis. Department of forest Biology, Kasetsart University.

7. วีณา เมฆวิชัยและคณะ . (2549). *รายงานการวิจัยโครงการแพร่กระจายและจำนวนประชากรไก่ป่า* . หน้า 5-6 (อัดสำเนา)

8. สมชาย พลเยี่ยม. (2536). *การศึกษาขอบเขตการแพร่กระจายและประชากรอย่างต่ำของนกยูงสีเขียวในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานีและจังหวัดตาก พ .ศ.2529-2530.* ปัญหาพิเศษ . ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Keywords: Green peafowl, *Pavo muticus*, abundance, habitat disturbance

Table1: Relative abundance of Green peafowl from one previous study (Pon-Aiem 1995; Meckvichai, et al. 2006) and current study, potential predators, and human activity

Habitat type	Transect name	Relative abundance (per Km.)				Human activity	Environmental
		Peafowl 1995	Peafowl 2006	Peafowl 2008 ***	Predator signs ***	Index ns	effect index *
Wildlife sanctuary	Huai Song Thang	0[a]	1.12[a]	1.61	0.39	0.03	0.56
	Huai Thab Salao1			1.71	0.06	0.04	0.56
	Huai Kha Kang 1	N/A	N/A	0.06	0	5.32	0.67
Buffer area	Huai Kha Kang 2	N/A	N/A	0.19	0.11	0.07	0.11
Community forest	Huai Thab Salao2	N/A	N/A	1.15	0.04	0.74	0.11
	Breeding station	N/A	N/A	1.19	0.21	16.84	0

Note: Result from comparison among transects as; ns = non-significant, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.0001$.

[a] denoted that relative abundance were estimated over both Huai Song Thang and Huai Thab Salao area

ลำดับที่ 10

The Natural History Journal of Chulalongkorn University 9(2): 189-200, October 2009
©2009 by Chulalongkorn University

Feeding Ability of *Micronecta grisea* Nymphal Instars and Adults on Third Instar *Aedes aegypti* Larvae

CHUTAPORN AMRAPALA[1], DUANGKHAE SITTHICHAROENCHAI[2*], USAVADEE THAVARA[3], APIWAT TAWATSIN[3] AND TITIYA CHITTIHUNSA[4]

[1]*Environmental Science (Interdisciplinary Program), Graduate School, Chulalongkorn University, 254 PhayaThai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand.*
[2]*Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 PhayaThai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330, Thailand.*
[3]*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, 11000, Thailand.*
[4]*Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom, 73000, Thailand.*

ABSTRACT.– **Pygmy waterboatmen, *Micronecta grisea*, were collected and used to establish laboratory cultures in order to study the predation rates and feeding behavior of nymphal instars (N) and adults upon third instar larvae (L3) of *Aedes aegypti* to assess their potential for biological control. The body length, head capsule size and head length of 330 nymphs and 71 adults of *M. grisea*, collected from Nonthaburi Province, Thailand, were measured using a stereo microscope. In contrast to head capsule size and head length, which yielded overlapping size distributions, five discrete nymphal instars (N1 – N5) plus adults could be classified by body length; the 1st (N1; 0.54 – 0.65 mm), 2nd (N2; 0.69 – 0.84 mm), 3rd (N3; 0.9 – 1.11 mm), 4th (N4; 1.29 – 1.56 mm) and 5th (N5; 1.74 – 1.98 mm) nymphal instars plus adults (2.07 – 2.43 mm). Using body length to define developmental stadia, nymphs were classified as three discrete size categories, small (N1 & N2), medium (N3 & N4) and large (N5), and together with adults these four clases were examined for predation rates and prey handling times when fed L3 *Ae. aegypti* at different predator to prey ratios. Prey searching and handling times decreased with increasing *M. grisea* size (developmental stadia), and were consistent with a Type II functional predator-prey response.**

KEY WORDS: *Micronecta grisea, Aedes aegypti*, nymphal instars, Thailand

INTRODUCTION

Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae), the yellow fever or dengue mosquito, is the principal vector for transmission of the dengue flavivirus in humans across the tropics and subtropical regions, including within Thailand, as well as for yellow virus in endemic regions. Infection with one of the dengue virus strains can cause Dengue or the more serious Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), and has been estimated to cause an average morbidity in some 40 million and 2-300,000 people annually worldwide, respectively, and some 30,000 cases a year in

* Corresponding author:
Tel: (662) 218-5256
Fax: (662) 218-5256
Email: dsitthi@hotmail.com

Thailand, although regional epidemics can be large. Urban *Ae. aegypti* populations are well adapted to human (their principal blood host) environments and breed in both indoor and outdoor water-storage containers, as well as a diverse array of other suitable temporal sources of relatively stagnant water, including empty coconut shells, flag pole holders, gutters, plant pot trays, refuse bins, etc. This makes total larval elimination or control unrealistic and restricts these measures to the control of the main breeding sites (human water storage containers) and attempted reduction of the minor sites so as to reduce adult mosquito numbers in the proximity of human habitations. To this end, larval control programs in Thailand are traditionally performed using a mixture of three imperfect approaches, that is physical (water container covers, upturning to drain dustbins, prevention of blockage of gutters and similar drainage channels to reduce pooled rainwater), chemical (e.g. use of the insect growth regulator pyriproxyfen) and biological (e.g. use of bacterial toxins such as *Bacillus thuringensis israelensis* or predators such as *Mesocyclops* copepods) control methods (Vu et al., 1998). However, the choice(s) available are somewhat restricted by whether the water is intended for human consumption or not and the ability to locate, and so treat, all such temporally dynamic potential breeding sites for *Ae. aegypti*. Thus, for example household water jars may be easily covered (physical) but external natural and man made water sources cannot all be located let alone be covered, whilst chemical control suffers from the same problem of the inability to locate and treat all breeding sites, increasing insecticide and larvicide resistance, and the fact that the larval rearing sites are in close proximity to humans, such as in the house or even drinking water reservoirs, and so is restricted by the risks of long term human exposure in addition to environmental and economic concerns. There is thus an increasing demand for alternative treatments, including environmentally acceptable biocontrol based methods, for the treatment of non-household water container based breeding grounds. Many biological control methods are, however, not mobile and so again are limited by the problem of locating and treating all the temporally dynamic breeding grounds, with loss of the control agent as a given site dries up or the mosquito moves away as a pharate adult. Thus mobile, prey seeking (or imago phoretic, such as, perhaps, microsporidia) biological agents would potentially offer an alternative weapon, being able to also control neighboring unlocated breeding sites and also new larval rearing sites as they become available.

Micronecta grisea Fieber (Heteroptera: Micronectidae), the pygmy waterboatmen, are true aquatic hemipteran insects with paddle-like legs that have all their developmental stages in water. They are excellent and active swimmers both on the surface and under water, feeding on insect larvae, including mosquito larvae, by capturing the prey in the water and then sucking out the haemolymph from the prey body. Combined with their widespread distribution from India and Sri Lanka to Taiwan and Indonesia and Java (Nieser & Chen, 1999), their relatively small size and water size requirements, mobility between water sites, their natural habitat being stagnant water or parts of streams with little current flow, broadly the same as *Aedes aegypti* larvae, and that they are potential predators of *Ae. aegypti* larvae (Lekprayoon, 2006), makes them potential alternative biocontrol agents in mosquito control programs.

A survey on the distribution of *Micronecta* spp. in all regions of Thailand, including

inspections of water-storage jars which were breeding sites of *Ae. aegypti*, reported that the presence of *Micronecta* spp. was found to be 100, 89, 62 and 25 % of the outdoor jars in the central and eastern, north-eastern, northern and southern parts of Thailand, respectively (Suphapathom et al., 2002).

As *Micronecta* spp., including *M. grisea*, are common species found throughout the country, this study was carried out to examine the body length, head capsule size and head length of *M. grisea* nymphal instars and adults, together with their predation efficiency and feeding ability upon L3 *Ae. aegypti* larvae as a potential biocontrol agent.

MATERIALS AND METHODS

Micronecta grisea

M. grisea were collected from water-storage clay jars at the Research Station for Mosquito Biology and Control, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Bang Bua Thong District, Nonthaburi Province, Thailand. All samples were brought to, and used to establish laboratory cultures at, the Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Laboratory cultures and experiments were performed at 25 ± 1 °C and an L: D period of 12:12. Five adult female and male *M. grisea* were kept in a 1.2 l clay jar for stock cultures and fed on *Ae. aegypti* larvae *ad libitum*. All clay jars used were covered with nylon meshes (1 mm mesh size).

Aedes aegypti larvae

Freshly laid *Ae. aegypti* eggs, attached on filter paper and dry, were obtained from the laboratory cultures of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, and were reared in 2 l plastic rectangular containers in the laboratory at Chulalongkorn University to obtain late L3 *Ae. aegypti* for use in the experiments. Excess larvae were not reared further but killed and in-house *Ae. aegypti* cultures were not established.

Tap water, for rearing all stadia of *M. grisea* and *Ae. aegypti* larvae, was dechlorinated by leaving to air in containers for 24 h. For *Ae. aegypti*, the dried eggs on filter paper were added to this water whereupon they hatched within 30 minutes and the larvae were fed daily with crushed "Pedigree" dog food at 0.1 g of food per 2 l of water containing 200 larvae, and maintained at 25 ± 1 °C and an L: D period of 12:12. After 3 – 4 days under these conditions, larvae molted to the L3 stadia, and when observed under a stereo microscope were within the size range of 6 – 8 mm long, which were then selected and used in the experiments.

M. grisea nymphal instars and adult

Measurements of the body length, head capsule size and head length were made on individual *M. grisea* nymphs and adults using a stereo microscope (32 x). *M. grisea* were put individually on the petri dish by using a dropper. After that, tissue paper was used to dry up the water surrounding the insect body. The three characters were measured once for each individual by a stage micrometer attached under the microscope. To determine the size range of each of the *M. grisea* nymphal instars, as well as adults, the data for the three measured characters for the nymphal instars and adults were analyzed by scatter graph plots. The individuals were then ascribed to a given nymphal instar or adult category based upon the size distribution scatter plot analysis (see results) and then each category was reanalyzed for size range and variation within and between each defined nymphal instar and adults. The nymphal instars were grouped into three

sizes; small (N1 & N2), medium (N3 & N4) and large (N5) for evaluation of their predation and feeding efficiencies and handling time of the different developmental stages of *M. grisea* at different predator (*M. grisea*) and prey (L3 *Ae. aegypti*) densities.

***Mosquito larvae* consumption**

Feeding tests were conducted to determine the ability of the three nymphal size categories, plus adults, of *M. grisea* to feed on L3 *Ae. aegypti* as determined by predation efficiency and handling times.

To broadly standardize the hunger level of *M. grisea* (predator), and thus the potential hunting desire and, when prey is not limiting, the total consumption rate, the three size categories of *M. grisea* nymphs (small, medium and large) and adults were selected randomly from stock cultures and kept separately without food for the same period of time, that is for 24 h prior to experimentation. *M. grisea* were housed at three different densities, *viz.* 5, 10 and 20 nymphs or adults in 1.2 l clay jars filled with 1 l of dechlorinated tap water. After that, third instar *Ae. aegypti* larvae at one of three different densities, *viz.* 10, 20 and 40 larvae, were put into each clay jar containing the *M. grisea* at different densities to start the tests. After 24 h the number of living larvae and the cadaver remains in the jars was recorded. In all experiments three replicates were performed for each combination.

The mortality numbers were adjusted by Abbott's formula (Abbott, 1925), and then used to calculate the percentage mortality of mosquito larvae in all experiments, and as a measure of predation levels. Plots of prey density against prey attacked were plotted to determine if the predator-prey relationship best fitted a type I or type II functional response.

Statistical analyses

Data for the mean sizes of the three measured parameters for nymphal instars and adults were subject to ANOVA and Duncan's multiple means tests with significant differences accepted at the $P \leq 0.05$ level. For evaluation of the predation levels, the data obtained from all experiments were calculated as the mean percentage mortality from all replicates and then the percentage means of *Ae. aegypti* L3 mortality induced by each *M. grisea* category (nymphal instar and adults), as a measure of predation efficiency, was analyzed by Mann –Whitney U-test to compare predator efficiency within 24 h.

Feeding behavior of *M. grisea*

During the feeding tests with L3 *Ae. aegypti* mosquito larvae as the prey, the searching and handling times of individual *M. grisea* waterboatmen nymphs and adults were recorded separately using a timer for each of the four size categories. Searching time started from the time when the prey (L3 *Ae. aegypti*) were put into containers until the time that the first prey was captured by a predator. The handling time started from the time the prey were captured until the time that predators released their prey or prey remnants, and included capturing, killing, eating and digesting (Holling, 1959).

The feeding time of *M. grisea* nymphs and adults were calculated by summation of both the searching and handling times.

TABLE 1. The range and mean (± S.E.) body length, head capsule size and head length of each developmental stage of *M. grisea*.

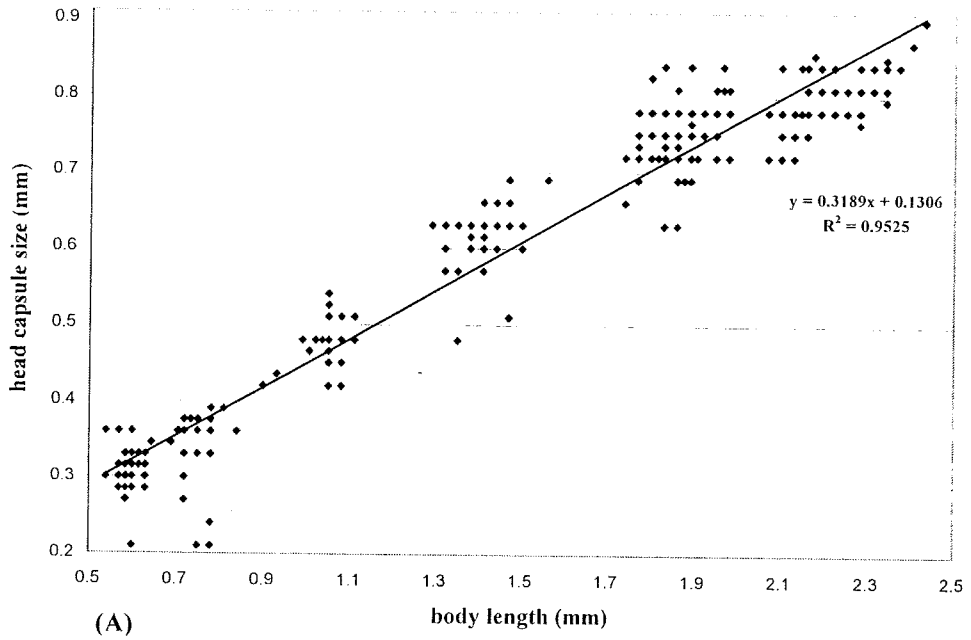
	N	Body Length (mm)			Head Capsule (mm)			Head Length (mm)		
		MIN	MAX	MEAN±SE	MIN	MAX	MEAN±SE	MIN	MAX	MEAN±SE
1st nymphal instar	73	0.54	0.65	0.60±0.002a	0.21	0.36	0.31±0.003a	0.06	0.15	0.11±0.002a
2nd nymphal instar	34	0.69	0.84	0.76±0.005b	0.21	0.40	0.35±0.008b	0.09	0.18	0.13±0.003b
3rd nymphal instar	63	0.90	1.11	1.03±0.005c	0.42	0.54	0.48±0.003c	0.12	0.23	0.17±0.003c
4th nymphal instar	70	1.29	1.56	1.40±0.006d	0.48	0.69	0.61±0.005d	0.12	0.27	0.22±0.004d
5th nymphal instar	90	1.74	1.98	1.86±0.007e	0.63	0.84	0.75±0.004e	0.18	0.38	0.28±0.003e
Adult	71	2.07	2.43	2.23±0.010f	0.72	0.90	0.81±0.004f	0.21	0.39	0.28±0.005e

* Means in the same column with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$; One-way ANOVA)

TABLE 2. Mean (± 1 S.E.) mortality (%) of third instar *Ae. aegypti* mosquito larvae observed within 24 hours using different instars and densities of *M. grisea* (M^*; predator) with different densities of *Ae. aegypti* larvae (A^*; prey).

M^*	S			M			L			ADULT		
A^*	5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
10	$0a^{1*}$	$0a^1$	$0a^1$	$33.3 \pm 8.8a^1$	$40 \pm 5.8a^1$	$46.7 \pm 3.3a^1$	$50 \pm 5.8a^1$	$80 \pm 5.78a^2$	$80 \pm 5.8a^2$	$96.7 \pm 3.3a^1$	$100 \pm 0.0a^1$	$100 \pm 0.0a^1$
20	$0a^1$	$0a^1$	$0a^1$	$31.7 \pm 7.3a^1$	$30 \pm 8.ab^1$	$43.3 \pm 4.4a^1$	$45 \pm 2.9a^1$	$71.7 \pm 4.4a^2$	$80 \pm 5.8a^2$	$95 \pm 5.0a^1$	$100 \pm 0.0a^1$	$100 \pm 0.0a^1$
40	$0a^1$	$0a^1$	$0a^1$	$19.2 \pm 4.2a^1$	$25.8 \pm 1.7b^1$	$35.8 \pm 5.1a^1$	$28.3 \pm 0.8b^1$	$50.8 \pm 0.8b^2$	$69.2 \pm 6.0a^3$	$95.8 \pm 3.0a^1$	$95.8 \pm 2.2a^1$	$100 \pm 0.0a^1$

* Means in the same column with different letters, or across rows (within the same size of predator) with different superscript numbers are significantly different($P \leq 0.05$; *Mann-Whitney U*-test).



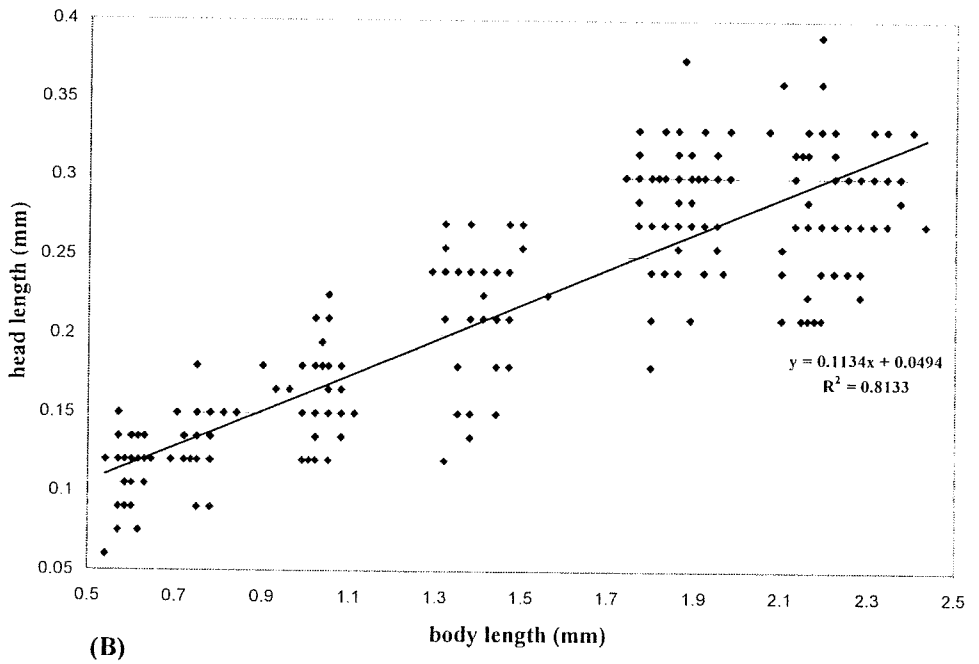


Figure 1. (A) [illegible] head capsule size (mm) and (B) body and head length (mm) of [illegible]

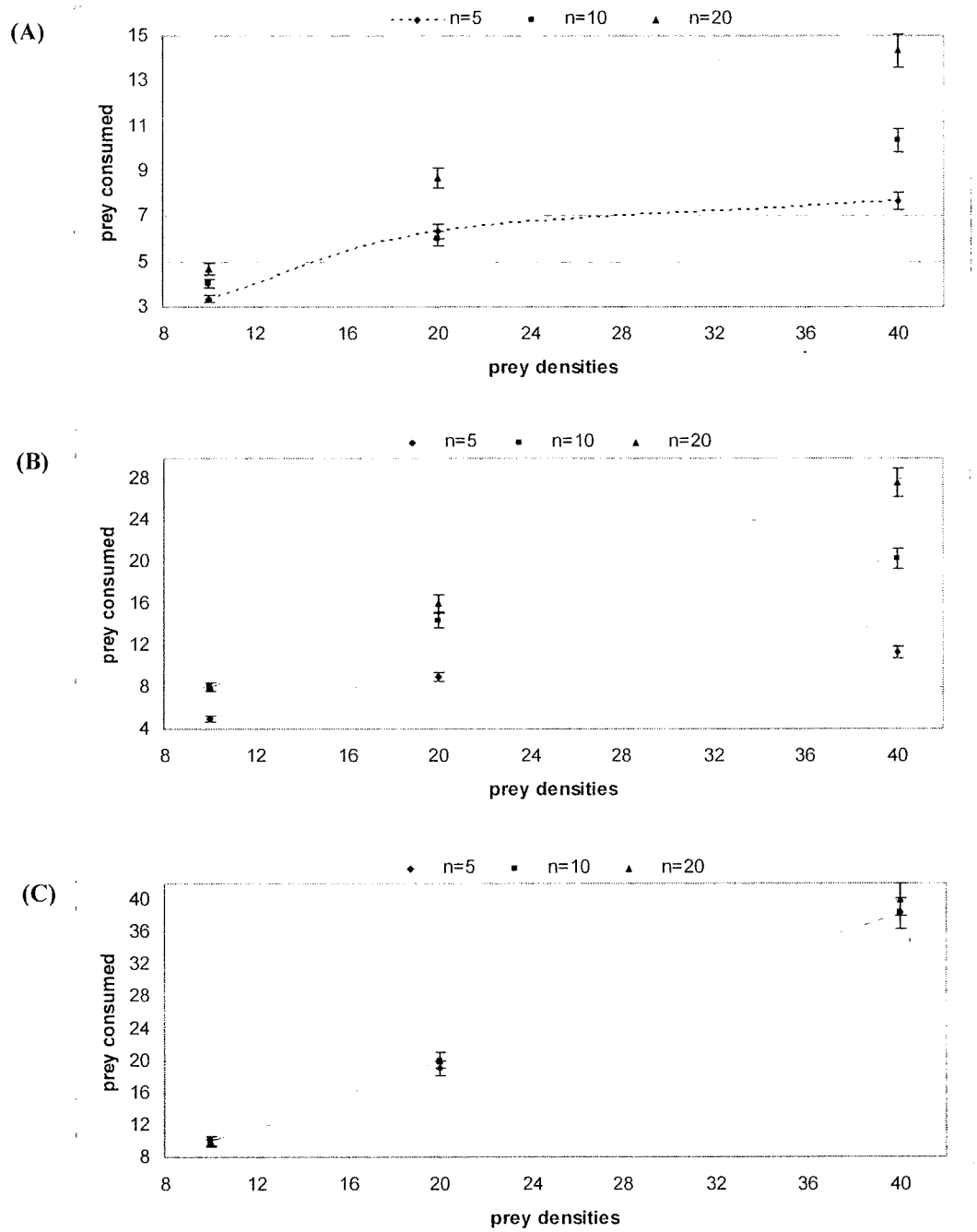


FIGURE 2. Type II functional response of the predator (*M. grisea*) – prey (L3 *Ae. aegypti*) relationship at different predator densities (n). Data, shown as the mean ± S.E. and derived from 3 repeat trials, are shown for (A) medium nymphs, (B) large nymphs and (C) adults of *M. grisea*.

RESULTS

Measurements of the body length, head capsule size and head length of 401 *M. grisea* specimens of mixed developmental stadia revealed six discrete developmental stages of *M. grisea*, comprised of five nymphal instars (N1–N5) and the adults, were recognized from the three measured characters when the data was analyzed by scatter graphs, as shown in Figs. 1A and 1B with $r^2 = 0.95$ and 0.81, respectively. No overlap in the body length distribution was found between each nymphal instar of the examined pygmy waterboatmen, whereas some overlap in the head capsule size and head length size distributions was noted between nymphal instars and also adults.

The normality test and homogeneity test showed that the data were normally distributed and the variances were significantly homogenous at $P \leq 0.05$. A one-way analysis of variance (ANOVA) with Duncan's multiple comparison tests on the data for the three different measurements for each instar of the pygmy waterboatmen showed a significant difference in the mean body length between each instar (df = 5, 395, F = 9383.19, $P = 0.000$), but no significant difference was found within each instar of pygmy waterboatmen. With discrete non-overlapping distributions between the five apparent nymphal instars plus the adults, the body lengths could be and were subsequently used for classifying these six discrete developmental stages of *M. grisea*, and as such split the 401 specimens into 73, 34, 63, 70, 90 and 71 individual N1, N2, N3, N4, N5 and adults of *M. grisea*, respectively. Analysis of the body length, head capsule size and head length within these six categories (developmental stadia) revealed that each nymphal instar and the adults were significantly different ($P \leq 0.05$), except for head lengths between the N5 and adults (Table 1).

Using the discrete body size distributions as markers for the different developmental stages of *M. grisea*, the nymphal instars were grouped into small (N1 & N2), medium (N3 & N4) and large (N5) size groups for the predatory feeding tests with L3 *Ae. aegypti*. The feeding tests were performed with four size categories of *M. grisea* at three different densities (5, 10 and 20 per 1 container), each of which was supplied with live L3 *Ae. aegypti* as prey at three different densities (10, 20 and 40 larvae per 1). The mean *Ae. aegypti* larval mortality within 24 h, used as the marker for predation rate, was evaluated and the data is summarized in Table 2. Analyses of the predator-prey relationship by plots of prey density against prey attacked were consistent with a Type II functional response (Fig. 2), and were tested using the Holling's disc equation. Predator satiation occurred to a slight extent in the M and L nymphs' functional response curves, but not in the adult's curve. The proportion of prey consumed by predators declined with increasing prey densities. Functional response curves revealed that the decreasing rate, as for five medium nymphs, five large nymphs and ten large nymphs, was due to prey saturation of the pygmy waterboatmen, while the constant consuming rate showed unsaturated conditions, higher prey densities were still available for predators to consume. The adult, medium and large nymphal categories predated the L3 *Ae. aegypti* in all experiments, whilst in contrast the small nymphs showed no evidence of predation upon L3 *Ae. aegypti* in all tests.

The normality test showed that the data were not normally distributed and the homogeneity test also showed the variances

to differ significantly at $P \leq 0.05$. Using *Mann-Whitney U*-test, the results revealed that as the prey numbers (and thus the prey: predator ratio) were increased no significant difference in the predation level (larval mortality) was observed for *M. grisea* of the same developmental stage at the same density ($P \leq 0.05$). Comparisons of larval mortality, as a marker for predation levels, amongst the different nymphal stages of *M. grisea* at different predator densities showed that only the large nymphal size category consumption caused a significantly different mortality amongst the different predator densities (Table 2).

For a density of five *M. grisea* with 10, 20 and 40 prey (L3 *Ae. aegypti*), the consumption by medium and large nymphs were numerically, but not statistically significantly, different, whereas adults, caused a significantly higher predation level than both medium and large nymphs at all prey densities (Fig. 3).

When the *M. grisea* density increased to 10 there were significant differences amongst the predation levels (mortality of L3 *Ae. aegypti*) between each size category of nymphal instars and adults of pygmy waterboatmen, with the predation levels increasing with increasing predator size (developmental stage).

TABLE 3. Mean (± S.E.) searching, handling and feeding times of medium (M) and large (L) size category nymphs and adults of *M. grisea* upon third instar *Ae. aegypti* larvae (One-way ANOVA) ($P \leq 0.05$)

M. grisea stage	No. of *M. grisea* : No. of mosquito larvae	Searching time (s)	Handling time (s)	Feeding time (s)
M-size	10 : 20	92.8 ± 13.1a*	1680 ± 312a	1773 ± 314a
L-size	10 : 20	57 ± 10.1b	867 ± 182b	924 ± 185b
Adult	10 : 20	13.8 ± 1.0c	480 ± 42b	494 ± 43b

* Means in the same column with the different letters are significantly different ($P \leq 0.05$; One-way ANOVA).

At predator densities of 20, the prey consumption of medium sized nymphs was significantly lower than that of large nymphs, with that of adults being significantly higher still.

The laboratory no-choice feeding tests with M. grisea (predator) feeding on L3 Ae. aegypti (prey) revealed that at a predator: prey ratio of 10:20 the searching and handling times of predators were significantly different between the medium and large nymphal stages and the adults (Table 3), with adult and medium sized nymphal M. grisea having the shortest and longest, respectively, searching and feeding times. Therefore, with feeding time being simply the summation of searching and handling times, then the same trend was noted with adults having the shortest feeding time and medium stage nymphs the longest. Note, however, that no data on searching, handling and feeding times is presented for the small M. grisea nymphs since no prey were ever caught or killed.

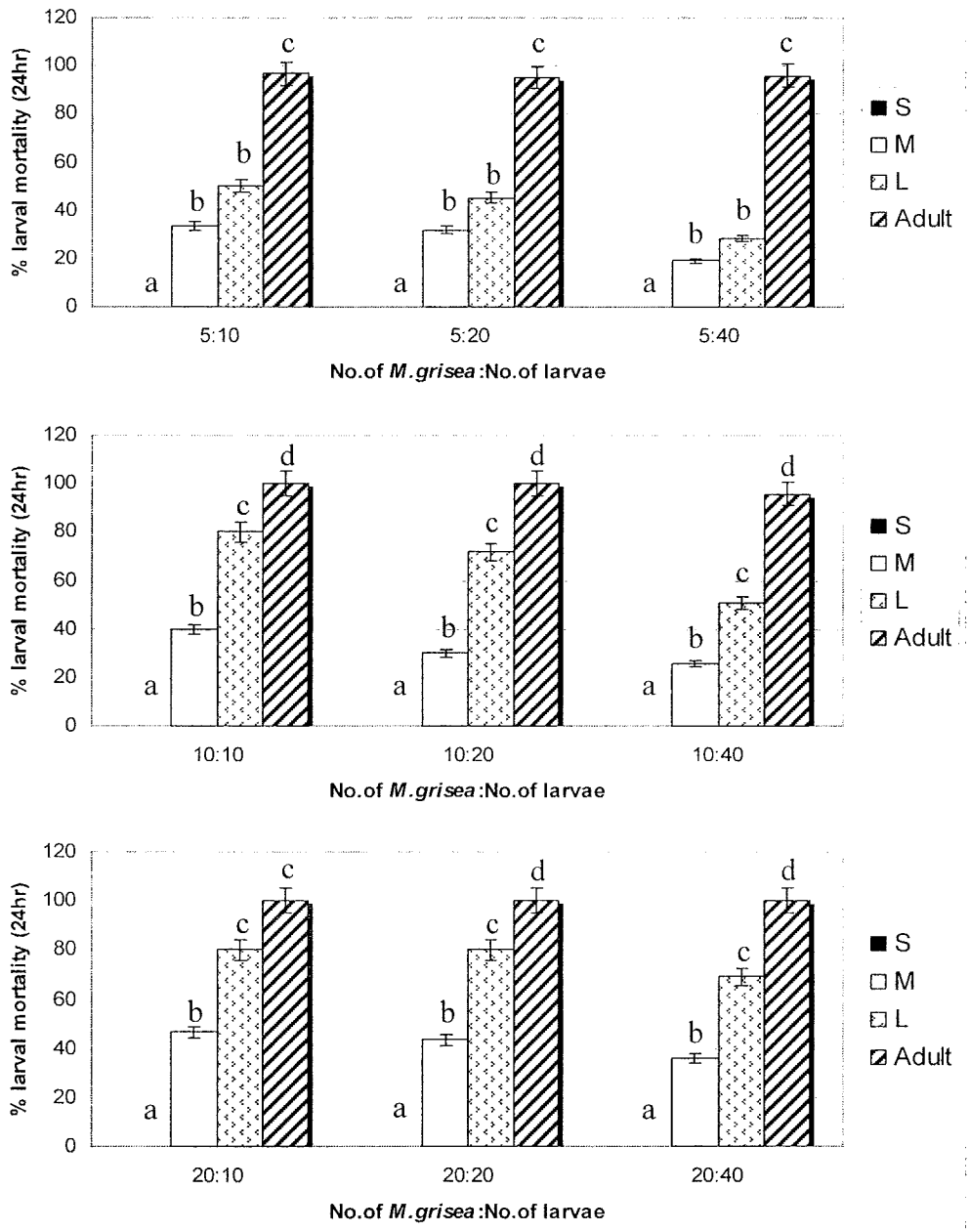


FIGURE 3. Mean mortality (predation) of third instar *Ae. aegypti* larvae by different instars of *M. grisea* at different densities (5, 10 and 20) with different densities of mosquito larvae (10, 20 and 40). Data are shown as the mean ± S.E. and derived from 3 repeats. Means with a different letter are significantly different ($P<0.05$; Mann-Whitney U tests)

DISCUSSION

Measurement of the body and head lengths and the head capsule size of different nymphal instars and adults of the pygmy waterboatman, *M. grisea*, revealed that five discrete nymphal instars, plus the adult stage, could be distinguished. Although no allometry was found between the three characters measured (analysis not shown), the body length was found to have a discrete and well separated distribution pattern between these six developmental stages, whereas both the head capsule size and head length showed some overlap in their size distribution profiles between related developmental stadia. This notion of five nymphal instars is consistent with studies in the biology of the related waterboatmen (Gerridae) and the backswimmers, *Enithares* sp., which have also been reported to have five preadult nymphal instars in their development (Chittihunsa, 1980).

The body lengths of each instar, showing no overlap, were used for classifying each *M. grisea* instar. The non-overlapping discrete body length ranges were 0.54 – 0.65, 0.69 – 0.84, 0.9 – 1.11, 1.29 – 1.56 and 1.74 – 1.98 mm for the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th (N1 – N5) nymphal instars, respectively, and 2.07 – 2.43 mm for adults. Although the adult size range is lower than that previously reported from the study of *M. grisea* in Singapore and Peninsular Malaysia, such as 2.6 – 3.2 mm (Nieser, 2002), it is in agreement with the results of a recent survey on the distribution of *Micronecta* spp. across all the regions of Thailand which found that adult *Micronecta* spp. were approximately 2 – 3.5 mm long (Suphapathom et al, 2002). This may be due to environmental conditions and diet sufficiency at different distribution regions.

In this study differences in the body length, head capsule size and head length (with no evidence of allometry between these three parameters) of each nymphal and adult stage were noted, except for the head lengths between the N5 and adult stages which were approximately the same. This may be due to the fact that the anterior part of the head segment in adults was hidden underneath during measurement leading to variable underestimates in their size.

Within the 24 h feeding window, the predation and feeding ability of the pygmy waterboatmen (*M. grisea)* on L3 *Ae. aegypti* differed amongst each size category. Adult waterboatmen showed the highest predation rates (as *Ae. aegypti* L3 mortality) followed by large, medium and small nymphs, in that order, with small nymphs revealing no detectable predation of L3 *Ae. aegypti* in all tests. Consistent with this observation is that under laboratory conditions larger sized backswimmers (*Enithares* sp.) caused a higher larval mortality (predation rate) than those of a smaller size (Chittihunsa, 1980). For the small sized nymphs of *M. grisea* in this study it seems likely that they were too small, compared with the prey size available (L3 *Ae. aegypti*) in these no-choice experiments, to capture their prey, whilst the newly hatched instar nymphs would also still have nutrients from the yolk available to them.

M. grisea of the same size categories (small, medium and large nymphal and adults) and at the same densities caused no significant difference in the larval mortality percentages (predation levels). Rather, within each size category *M. grisea* (predators) when at the same predator number (density), they consumed about the same amount of L3 *Ae. aegypti* prey items even when at higher prey densities, and so higher prey: predator ratios, suggesting that prey saturation may influence predator consumption. Of course, as the prey densities are increased for a given number of predators, and the total numbers

of prey consumed remain the same (satiation), the evaluated prey mortality percentages would appear to decrease.

Although in general, predators may spend time on three types of activities, searching, handling their prey and then satiation related activities, we observed the former two in these assays. At the same prey density, the searching times of adults, large and medium sized nymphs of *M. grisea* were significantly different. Adults showed the shortest searching time followed by large and finally medium sized nymphs, respectively. The handling time showed a similar relationship, except that the handling time for large nymphs and adults were not significantly different. Consequentially, feeding time paralleled the predator handling time.

Overall, adult *M. grisea* provided the highest L3 *Ae. aegypti* mortality in all tests with the shortest feeding times. This may be due to adults being more active and larger than nymphs, but it may also reflect the relatively large prey size used. Thus, whilst it remains important to evaluate the predation efficiency and feeding times of all developmental stages of *M. grisea* upon all larval developmental stages of *Ae. aegypti*, it also remains of interest to evaluate if different developmental stages of *M. grisea* preferentially feed upon different larval developmental stages of *Ae. aegypti*, as well as other prey items, since *Ae. aegypti* development in urban water resources is frequently derived from multiple females and is asynchronous.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Associate Professor Chariya Lekprayoon for pygmy waterboatman identification. We also thank the NIH for supplying *Ae. aegypti* mosquito eggs. We gratefully acknowledge the financial support from the Center of Excellence in Entomology and the Graduate School, both at Chulalongkorn University. We greatly appreciate Professor Dr. S. Mulla, Department of Entomology, University of California, Riverside, for assistance in proofreading this manuscript.

LITERATURE CITED

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.

Chittihunsa, T. 1980. Biology and efficiency of *Enithares* sp. (Hemiptera: Notonectidae) on the control of mosquito larvae. Master's Thesis. Department of Biology, Graduate School, Chulalongkorn University, 94 pp.

Holling, C. S. 1959. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. The Canadian Entomologist, 91: 385-398.

Lekprayoon, C. 2006. Water bugs of Western Thong Pha Phum National Park.; Bangkok: Jirawat Express, 56 pp.

Nieser, N. 2002. Guide to aquatic Heteroptera of Singapore and Peninsular Malaysia. IV Corixoidea. Raffles Bulletin of Zoology, 50: 263-274.

Nieser, N. and Chen, P. 1999. Sixteen new species of Neomorpha (Heteroptera) mainly from Sulawesi (Indonesia). Tijdschrift voor Entomologie, 142: 77-123.

Suphapathom, K., Sathantriphop, S., and Paeporn, P. 2002. The distribution of *Micronecta* sp. (Hemiptera: Corixidae) as the enemy of *Aedes aegypti* larvae in different regions of Thailand. Preceedings of the 3rd International Conference on Biopesticides, Kuala Lumpur, Malaysia, 267-271.

Vu, S. N., Nguyen, T. Y., Kay, B. H., Marten, G. G., Reid, J. W. 1998. Eradication of *Aedes aegypti* from a village in Vietnam, using copepods and community participation. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 59: 657-660.

Received: 25 February 2009
Accepted: 29 April 2009

ลำดับที่ 11

ความหลากหลายชนิดนกในพื้นที่รอบภูเขาทอง อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี ภายหลังการสร้างอ่างเก็บน้ำ

BIRD SPECIES DIVERSITY IN PHU KHAO TONG AREA KHANG KHOI DISTRICT, SARABURI PROVINCE AFTER RESERVOIR CONSTRUCTION

เลอสรรค์ วศิโนภาส, ชัชวาล ใจซื่อกุล และ วีณา เมฆวิชัย

Lerson Vasinopas, Chatchawan Chaisuekul and Wina Meckvichai
Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

บทคัดย่อ: การศึกษาความหลากหลายชนิดนกในพื้นที่ภูเขาทอง อำเภอแก่งคอย สระบุรี ในปี 2551 รวม 12 เดือน พบนกทั้งหมด 103 ชนิด เป็นนกประจำถิ่น 80 ชนิด นกอพยพ 21 ชนิด และนกอพยพผ่าน 2 ชนิด จากการแบ่งกลุ่มนกจากพฤติกรรมการกินอาหารที่พบชนิดนกมากที่สุด 4 กลุ่ม คือ นกกินสัตว์น้ำ นกกินแมลงตามใบไม้ นกร่อนกินแมลงระยะใกล้ และนกกินแมลง เมล็ดพืช และผลไม้ ตามลำดับ หลังการสร้างอ่างเก็บน้ำมีจำนวนชนิดสูงขึ้น 13 จาก 14 กลุ่ม นอกจากนั้นพบพื้นที่กระจายพันธุ์เพิ่มของนกกินปลีดำม่วง (*Nectarinia asiatica*) ซึ่งไม่มีรายงานการกระจายพันธุ์ในภาคกลาง และจำนวนชนิดนกที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการสร้างอ่างเก็บน้ำนั้น แสดง ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงแหล่งอาศัยของนกโดยการสร้างอ่างเก็บน้ำอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อจำนวนชนิดนกที่พบในพื้นที่

Abstract: Bird species diversity in Phu Khao Tong area Khang Khoi District, Saraburi Province, had been studied for 12 months in 2008 after a reservoir had been constructed in this area for 1 year. The total numbers of bird species were 103 species consisting of 80 residential birds, 21 migrated birds and 2 passive migrated birds. From feeding behavior, the highest species richness was found in 4 groups ranking from piscivore to foliage-gleaning insectivore to sweeping insectivore and to terrestrial insectivore/granivore/frugivore, respectively. The species richness of 13 from 14 groups by feeding behavior in post-reservoir construction in this study was higher than pre-reservoir construction from a study in 2005. Moreover, we found a new record of Purple Sunbird (*Nectarinia asiatica)* which had never been previously reported in central Thailand. The disturbance of human activity, such as reservoir construction, may be one of the effects that alter bird diversity.

Introduction: Phu Khao Thong area was previously a national reserve forest and currently undergoes a development under Chulalongkorn University initiative. Majority of the area is secondary forest mixing between deciduous forest and deciduous dipterocarp forest (Chulalongkorn, 2007). The area covers 549.12 hectare in Khang Khoi District, Saraburi Province, central Thailand adjacent to Khao Yai National park. The Phu Khao Thong area has many native bird species and is on migratory route of birds (Chulalongkorn, 2007). In 2007, a reservoir, approximately 10^7 m^3, was constructed in the area. However, the effect of reservoir construction on bird diversity in this area was unknown. Therefore, we studied the bird diversity in

post-reservoir construction comparing to the data from 2005 in pre-reservoir construction in the Phu Khao Thong area.

Methodology: Bird diversity in the Phu Khao Thong area was surveyed monthly in 2008 using point count method. In each one of five routes, birds were observed in 6 min at each of ten stations with 100 m apart along 1 km. Birds were identified to species using A guide to the bird of Thailand (Lekagul and Round 1991). Then, birds were categorized into 3 residential status which are residential, migratory, and passive migratory birds (Lekagul and Round 1991), and 14 feeding behaviors, which are arboreal frugivore (AF), insectivore/frugivore (AIF), bark-gleaning insectivore (BI), foliage-gleaning insectivore (FGI), grainivore (G), insectivore/nectarivore (IN), piscivore (P), raptor (R), sweeping insectivore (SwI), sallying insectivore (SaI), terrestial fauniore (TF), arborel terrestrial insectivore (TI) and terrestrial insectivore/granivore/frugivore (TIGF) (Kobkate, 1998). The bird diversity in post-reservoir construction was compared with the data from 2005 (Chulalongkorn, 2007) in pre-reservoir construction which birds were observed 4 times over a year.

Results discussions and conclusions: The total numbers of bird species were 103 species consisting of 80 residential birds, 21 migrated birds and 2 passive migrated birds [Figure 1]. The top three residential birds by density were Eurasian Tree Sparrow (*Passer montanus*), Sooty-headed Bulbul (*Pycnonotus aurigaster*), Black Drongo (*Dicrurus macrocercus*), respectively. The top three migratory birds by density were Barn Swallow (*Hirundo rustica*), Asian House Martin (*Delichon dasypus*) and Yellow-browed Warbler (*Phylloscopus inornatus*), respectively. The only two passive migrated birds were Japanese Sparrowhawk (*Accipiter gularis*), Crow-billed Drongo (*Dicrurus annectans*).

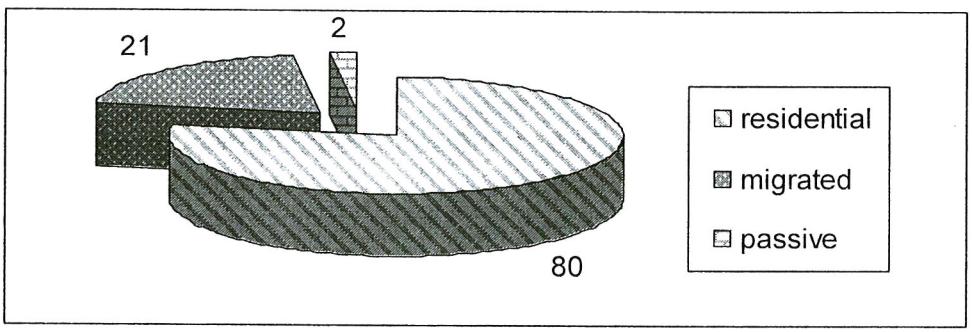


Figure 1 Number of bird species in each residential status in the Phu Khao Thong area surveyed monthly in 2008 using point count method

The highest species richness was found in 4 groups ranking from piscivore to foliage-gleaning insectivore to sweeping insectivore and to terrestrial insectivore/granivore/frugivore, respectively (Kobkate, 1998, Kobkate, 1999, Kobkate, 2000, Kobkate, 2001a, Kobkate, 2001b, Uttaruk, 2002.) [Figure. 2]. The prominent species of the above 4 groups were piscivore such as Heron species (*Ardeola spp.*), foliage-gleaning insectivore such as Prinia species (*Prinia spp.*), sweeping insectivore such as Black Drongo (*Dicrurus macrocercus*), and terrestrial insectivore/granivore/frugivore such as Eurasian Tree Sparrow (*Passer montanus*).

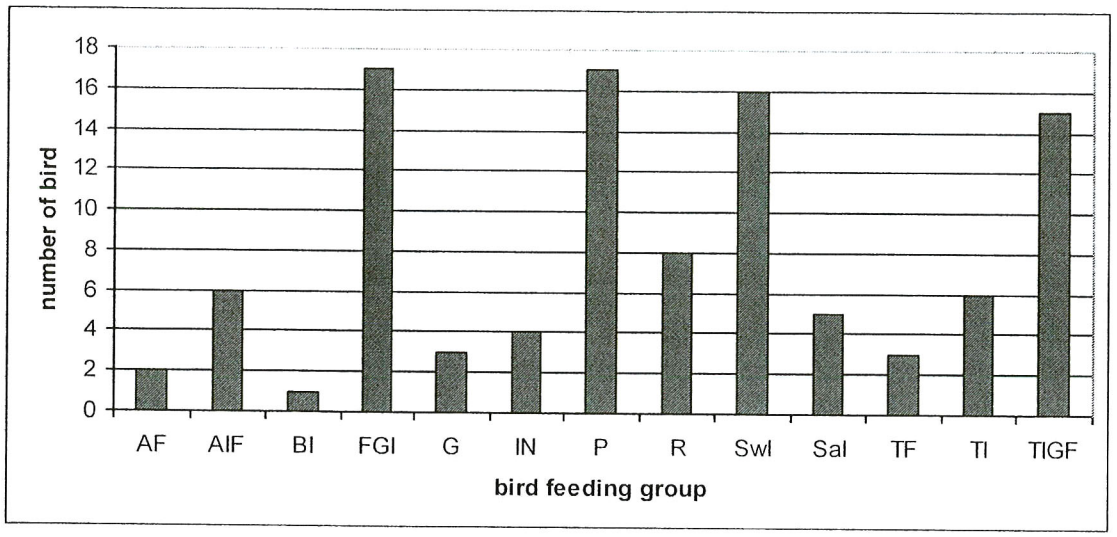


Figure 2 Number of bird species in each feeding group in the Phu Khao Thong area surveyed monthly in 2008 using point count method

Comparing to the data from 2005 (38 species in pre-reservoir construction), more bird species were found in 2008 (103 species in post-reservoir construction). Every group by feeding behavior except arborel insectivore/frugivore was increasing, particularly foliage-gleaning insectivore, piscivore, sweeping insectivore and terrestial insectivore/granivore/frugivore [Figure 3].

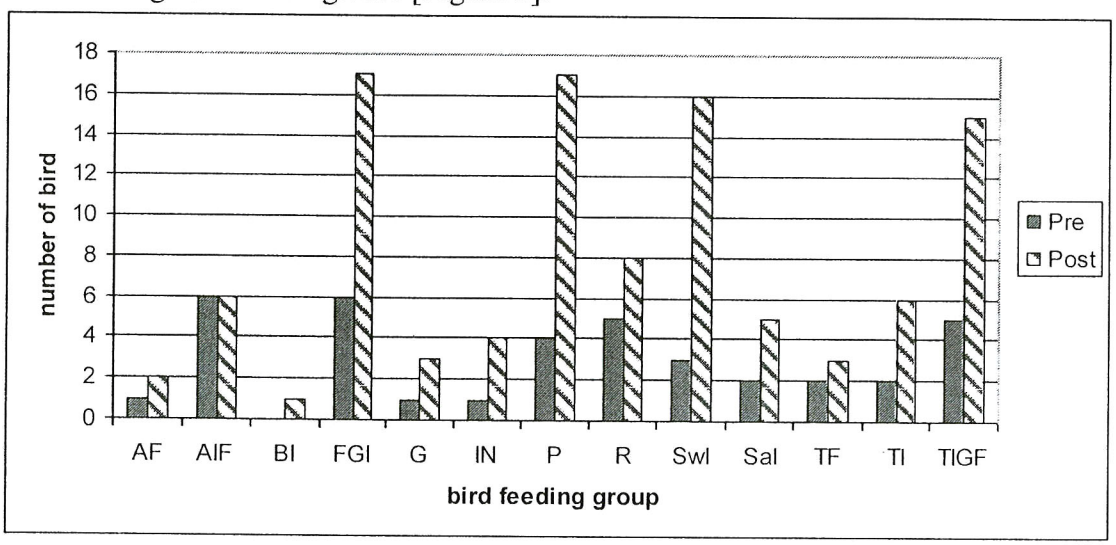


Figure 3 Comparison between number of bird species in each feeding group in pre- (2005) and post- (2008) reservoir construction in the Phu Khao Thong area

Moreover, we found a new record of Purple Sunbird (*Nectarinia asiatica*) which had never been previously reported in central Thailand [Figure 5].

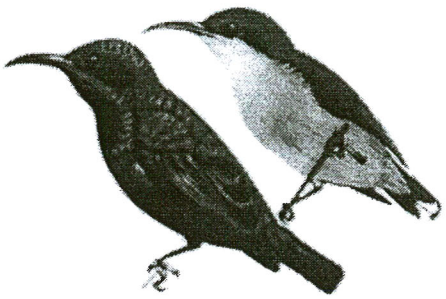



Figure 4 left Purple Sunbird (*Nectarinia asiatica*) in Phu Khao Thong area and right drawing of Purple Sunbird (*Nectarinia asiatica*) (Lekagul, B. and Round, P.D.,1991.)

From this study, we found more bird species in post-reservoir construction than pre-reservoir construction, partially due to increasing of habitat for piscivore feeding in reservoir and sweeping insectivore feeding off insect along the shore of the reservoir. However, higher species richness may be caused by more extensive observation in 2008 than in 2005, such as Fulvous-breasted Woodpecker (*Dendrocopos macei*) (BI), and Bushlark spp. (*Mirafra spp.*) (TIGF) [Figure 4]

References:

1. Chulalongkorn University. First progressive report Observation of biological and physiological environment and determine ecological status in Chulalongkorn University land development project Khang Khoi District, Saraburi Province (in Thai), 2007. 18-39.
2. Kobkete, O. Nok nai moung Thai (in Thai) 1, Bangkok. 1998.
3. Kobkete, O. Nok nai moung Thai (in Thai) 2, Bangkok. 1999.
4. Kobkete, O. Nok nai moung Thai (in Thai) 3, Bangkok. 2000.
5. Kobkete, O. Nok nai moung Thai (in Thai) 4, Bangkok. 2001a.
6. Kobkete, O. Nok nai moung Thai (in Thai) 5, Bangkok. 2001b.
7. Lekagul, B. and Round, P.D. A guide to the bird of Thailand, 1991. Bangkok.
8. Uttaruk, P. Comparison of bird communities between forest edge and forest interior of mixed deciduous forest, Khao Wang Khamen, Amphoe Sai-Yok, Changwat Kanchanaburi, 2002.

ลำดับที่ 12

การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา เชิงบรรยายของไก่ป่าตุ้มหูแดง (*Gallus gallus spsdiceus*) ในกรงเลี้ยง

MORPHOLOGICAL DESCRIPTION IN PLUMAGE CHANGES OF RED JUNGLEFOWL (*Gallus gallus spsdiceus*) IN CAPTIVITY

ฐาปนา จ้อยเจริญ[1] วีณา เมฆวิชัย[1] ตรศักดิ์ นิภานันท์[2]

Thapana Choicharoen[1], Wina Meckvichai[1], Tarasuk Nipanun[2]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

[2] Huai Kha Khaeng Wildlife Breeding Station, Lansak, Uthaitani, 61160, Thailand.

บทคัดย่อ: การศึกษาในครั้งนี้ มุ่งเน้นการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของไก่ป่าตุ้มหูแดงที่สัมพันธ์กับการเติบโตได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 13 ลักษณะ การพัฒนาของขน สีจะงอยปาก และสีแข้ง กลุ่มตัวอย่างเป็นเพศผู้ 27 ตัว เพศเมีย 17 ตัว ทำการศึกษาเป็นเวลา 1 ปี ตั้งแต่ มีนาคม 2008 ถึง กุมภาพันธ์ 2009 ผลการศึกษาพบว่า การเติบโตของไก่ป่าตุ้มหูแดงสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ ระยะแรก สัปดาห์ที่ 1-10 ขนปีก เริ่มพัฒนาเมื่ออายุ 1 สัปดาห์ ขนคลุมปีกพัฒนาในสัปดาห์ที่ 2-3 ขน natal plumage เปลี่ยนเป็น ขน juvenal plumage สมบูรณ์ ในสัปดาห์ที่ 8-10 ระยะที่ 2 สัปดาห์ที่ 11-20 เพศผู้และเพศเมียเริ่มมีความแตกต่างกันชัดเจนเมื่ออายุได้ 12 สัปดาห์ อายุประมาณ 20 สัปดาห์ ขน juvenal plumage เปลี่ยนเป็น ขน prenuptial plumage ระยะที่ 3 สัปดาห์ที่ 21-36 เพศผู้ขนคลุมปีก ขนสร้อยคอ และขนหาง มีสีเข้มขึ้นเป็นมันวาว เพศเมียมีขนลายน้ำตาลดำ ขน prenuptial plumage เปลี่ยนเป็น ขน nuptial plumage เมื่ออายุ 36 สัปดาห์

Abtract: The aimed of this study was to investigate growth rate and morphological changes of red junglefowl *Gallus gallus spsdiceus* (RJF) in captivity. Thirteen morphological characters, the developmental of plumage, bill color and tarsal color were descriptively studied from March 2008 to February 2009 in twenty seven males and seventeen females of Red junglefowl. Result of this studied could divided in to three stages. The first state from first week until the tenth week, the wing feathers started to develop at the first week whilst wing coverts started to develop at about the second to the third week and natal plumage changed to juvenal plumage at the tenth week. The second state from eleventh week until twentieth week, the sexual diamorphism of plumage compose of headed feather and the wing coverts occur at the age of twelve weeks old and Juvenal plumage changed to prenuptial plumage at the twentieth week. The third state from twenty first week until forty eighth week, prenuptial plumage changed to nuptial plumage at about the thirty sixth week of age.

Introduction: Red junglefowl (*G. gallus spsdiceus*) are found in Southeast Asia and might be the ancestry of all domesticated chicken. This kind of fowl is distributed in many part of Thailand except in the east. The morphological changes of RJF is hard to observed In the nature because they are highly sensitive when we become closer to them so it is need to study the descriptive morphology in captive. Purpose of this research was to study the morphological changes related to the growth of Red junglefowl beginning from hatching until 1 year old. Morphometrics data were

analyzed by t-test at 95% confidence and use the descriptive morphological characteristics to determine age of them.

Methodology: Twenty seven male and seventeen female of Red junglefowl were collected from breeding in captive at Huai Kha Khaeng Wildlife Breeding Station, Uthaitani Province. Thirteen morphological characters compose of weight, gap length, beak-nape length, eye length, head width, comb height, comb length, wing length, half-wing span, tarsal length, third digit length, claw length were morphometrically studied and the plumage development and color of beak and tarsus were descriptively studied. All of data were weekly recorded until the birds were 1 year old. The morphometrically measurements data were analyzed by t-test and descriptively characteristics compose of plumage, bill color and tarsal color were taken by photography and recorded.

Result, Discussion and Conclusion: Result of morphometrically studied are showed in table 1 and 2. Descriptively studied are showed in table 3. The morphometrically data compose of relative length between gap length-beak nape length, head width-beak nape length, wing length-half wing span, tarsal length-third digit length and descriptively data are useful for determine age of this bird. In morphometrics were taken on both male and female, the result show that average of all size in male and female were significantly different ($P<0.05$). In further all of morphometrics should be analyze with another method and use to classification age of this birds.

Table 1. Show morphometrics red junglefowl (*G. gallus* spsdiceus) from the age of 4 weeks until 48 weeks.

Morphological characters	Morphometrics mean(cm.)±SD							
	4 weeks		20 weeks		24 weeks		48 weeks	
	Male (n=27)	Female (n=17)	Male (n=27)	Female (n=17)	Male (n=27)	Female (n=17)	Male (n=27)	Female (n=17)
1.Weight	112.90±25.69	82.02±20.48	639.05±110.29	451.03±40.80	692.08±91.41	485.64±55.19	987.91±70.71	670.17±47.96
2.Gap length	1.85±0.15	1.52±0.14	2.79±0.10	2.52±0.10	2.83±0.09	2.55±0.11	3.02±0.13	2.72±0.12
3.Bill-nape length	3.98±0.42	3.57±0.21	6.04±0.18	5.51±0.16	6.09±0.21	5.54±0.15	6.45±0.26	5.90±0.17
4.Eye length	0.91±0.10	0.81±0.10	1.28±0.06	1.15±0.06	1.29±0.06	1.17±0.05	1.41±0.07	1.29±0.09
5.Head width	1.80+0.11	1.63+0.10	2.59±0.07	2.39±0.10	2.59±0.07	2.41±0.09	2.79±0.10	2.58±0.09
6.Comb height			0.54±0.20		0.54±0.30		4.32±3.86	
7.Comb length			1.41±0.59		1.36±0.48		6.86±6.77	
8.Wing length	11.32±1.60	8.41±1.26		17.82±0.45		18.05±0.44	22.02±0.38	19.18±0.63
9.Half-wing span	15.95±2.12	12.43±2.25	34.37±2.23	30.36±0.52	34.97±1.96	30.69±0.64	38.05±0.86	32.68±0.66
10.Tarsal length	4.10±0.54	3.33±0.31	8.33±0.47	6.82±0.32	8.51±0.48	6.88±0.32	9.11±0.40	7.26±0.39
11.Claw length	0.54±0.08	0.46±0.06	0.99±0.09	0.89±0.07	1.05±0.11	0.95±0.09	1.24±0.19	1.14±0.12
12.Third digit length	2.72±0.37	2.08±0.27	4.53±0.21	3.91±0.17	4.58±0.24	3.92±0.16	4.83±0.24	4.23±0.28
13.Spur length			0.55±0.00		0.48±0.09		1.60±0.39	

SD = standard deviation

Table 2. Show relative length of red junglefowl (*G. gallus spsdiceus*) from the age of 4 weeks until 48 weeks

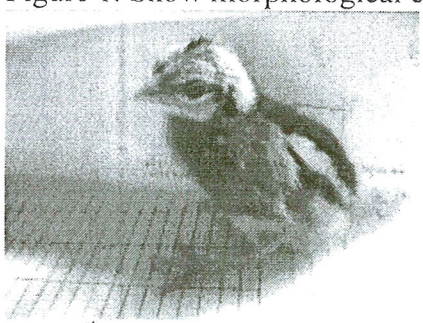
Morphological character	Relative length mean(cm.)±SD							
	4 weeks		20 weeks		24 weeks		48 weeks	
	Male (n=27)	Female (n=17)	Male (n=27)	Female (n=17)	Male (n=27)	Female (n=17)	Male (n=27)	Female (n=17)
1.Gap length / Beak-nape length	0.46±0.06	0.43±0.04	0.46±0.01	0.45±0.01	0.46±0.01	0.46±0.01	0.46±0.01	0.46±0.01
2.Head wide / Bill-nape length	0.47±0.10	0.45±0.03	0.42±0.01	0.43±0.02	0.42±0.01	0.43±0.01	0.43±0.02	0.43±0.01
3.Wing length / half-wing span	0.71±0.08	0.68±0.09	0.60±0.05	0.58±0.01	0.59±0.04	0.58±0.01	0.57±0.01	0.58±0.01
4.Thirddigit length / tarsal length	0.66±0.05	0.62±0.07	0.54±0.03	0.57±0.02	0.53±0.02	0.57±0.02	0.53±0.02	0.58±0.03

Table 3. Show descriptive morphology of red junglefowl (*G. gallus* spsdiceus) from the age of first date until 48 weeks.

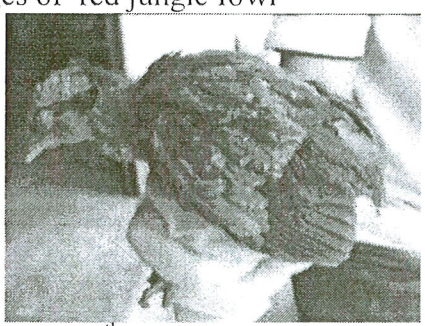
Age	Plumage	Tarsal color	Beak color	Notes
Day 1st	Chicks have yellow down feathers and dark brown strip from head until vent and across the eyes	Yellow	Yellow	-Natal plumage
Day 3rd	Chicks have yellowish-brown down feathers in the whole past of the body except wing feathers, the primary begin to develop, they still have brown down feathers at wing covert	Light brown	Light brown	-Primary occur
Week 1st	Rapid growth of wing feathers, tail feather occur	Light brown	Light brown	-Tail feather occur
Week 2nd	Primary wing coverts have been changes from down feathers to dark brown contour feathers, other parts are still cover with down feathers	Brown	Light brown	
Week 6th	Secondary wing coverts are changed from down feathers to contour feathers.	Grey	Dark brown	
Week 8th	Down feathers begin molting in the whole past of body, feather tracts at ventral cervical tract, spinal tract, ventral sternal tract, black primary and primary wing coverts are black, whilst secondary and wing coverts are dark brown	Dark grey	Dark brown	Comb occur
Week 10th	**1st molting period** Males have dark brown headed feathers, dark brown contour feathers at upper back, back, breast. They have black-brown of wing feathers and wing coverts, whilst flank and thigh are changed to grey semiplume. Females have dark yellow headed feathers, brown contour feathers in whole past of body. They have dark brown wing feathers and wing coverts, whilst flank and thigh are changed to grey semiplume.	Dark grey	Dark brown	-Downy birds are changed to feather birds
Week 12th	Males have dark brown headed feathers, body covered with black and dark brown feathers, primary and wing coverts are black. They have reddish-brown with a little black secondary and wing coverts, black tail. Females have dark yellow headed feathers, brown contour feathers in the whole past of body, brown wing feathers and wing coverts. they have dark tail. Can be differentiated sex between male and female.	Dark grey	Dark brown	-Juvenal plumage -Sexual dimorphism of plumage occour

Age	Plumage	Tarsal color	Beak color	Notes
Week 20th	**2nd molting period** Males have long dark yellowish-brown hackle, metallic color at wing coverts, back and tail , black beast, grey thigh and flank. Females have dark yellow hackle, dark brown wing feathers and wing coverts. They have dark brown tail, brown beast and grey thigh and flank.	Dark grey	Dark brown	-Juvenal plumage are changed to Prenuptial plumage
Week 36th	**3rd molting period** Males have red face comb and plumage, long golden yellow hackle, black breast, primary wing coverts are black. They have black and brown at secondary, metallic green crimson color at the wing covert and metallic green at tail feather. Middle pair of tail are longer than other. They have dark green and maroon at back, maroon color at upper back, white patch at the base of the tail and metallic green at shaft of tail, grey at flank and thigh. Females have red face yellowish-brown hackle, brown at upper back and back. They have dark brown tail. Wing feathers and wing coverts are brown with black spot, grey at flank and thigh, light-brown at breast.	Dark grey	Dark brown	-Prenuptial plumage are changed to nuptial plumage -Middle pair of tail feathers are longer than other
Week 48th	Males have red face, comb and colorful plumage, they have long golden yellow to yellowish-orange hackle, black breast, black at primary and primary wing covert, secondary are black and brown. Wing covert are metallic green crimson and maroon color, tail are luminescent color, back feather are dark green and maroon, upper back are maroon. They have white patch at the base of the tail and metallic green at shaft of tail , grey at flank and thigh. females have red face yellowish-brown hackle, brown at upper back, back. Tail are dark brown, wing feathers and wing covert are brown with black spot, grey at flank and thigh, light-brown breast.	Dark grey	Dark brown	-Nuptial plumage

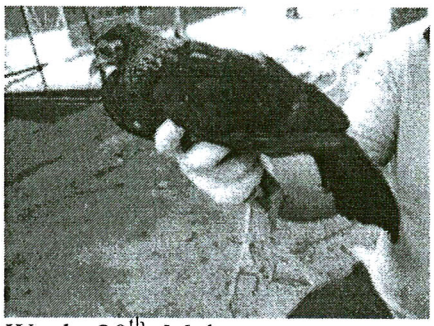
Figure 1. Show morphological changes of red jungle fowl



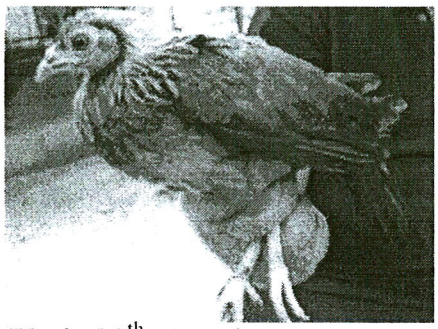
Day 1st



Week 4th



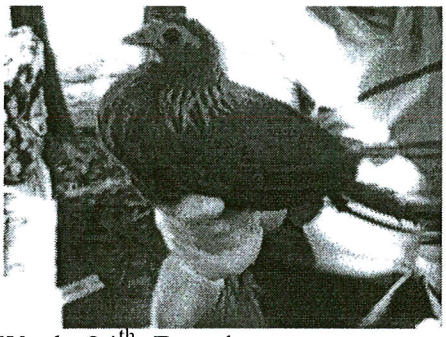
Week 20th Male



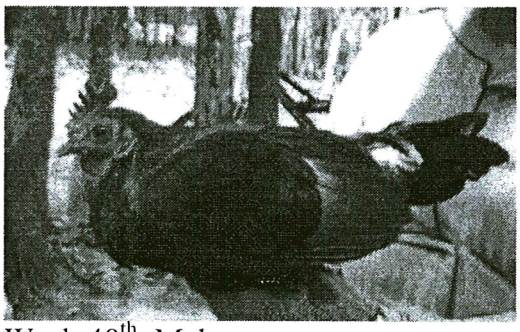
Week 20th Female



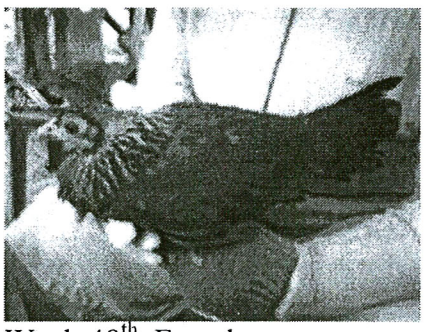
Week 24th Male



Week 24th Female



Week 48th Male



Week 48th Female

Reference :

1. Akishinonomiya, F. Miyaki, T., Sumi, S., Takada, M., Ohno, S., andKondo, N. 1994. One subspecies of Red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all Domestic breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91.* pp.1205-1209
2. Johnsgard, Paul A. 1997. *The pheasants of the world. 2nd ed.* Smithonian Institution Press. Washington, D.C. pp. 165-171
3. Larson, J.S. and R.D. Tarber.1980. Criteria of Sex and Age. In Sanford D.
4. Meckvichai, W. 2005. Morphological Characteristic of Native of Native Fowls. *The 2005 HCMR Congress in Tokyo.* pp. 27 – 31.
5. Meckvichai, W. 2006. Morphology of Red Junglefowl and Hybrid. *The 2006 HCMR Congress in Tokyo.* pp. 27 – 31.
6. Simpson, G.G. , A. Roe and R.C. Lewentin. 1960. *Quantitative Zoology.* New York: Harcourt, Brace and Company.
7. Zar, J. H.1999. *Biostatistical analysis.* 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall. 663 pp.

ลำดับที่ 13

KEW BULLETIN VOL. 65: 1 – 3 (2010)

Mnesithea thailandica a new species of Poaceae from Thailand

Paweena Traiperm[1,2], Thaweesakdi Boonkerd[3], Pranom Chantaranothai[4] & David A. Simpson[5]

Summary. *Mnesithea thailandica*, a new species of Poaceae subtribe Rottboelliinae from Thailand, is described and illustrated.

Key Words. *Coelorachis*, *Mnesithea*, *Mnesithea thailandica*, new species, Rottboelliinae, Thailand.

Introduction

The circumscription of *Mnesithea* Kunth is contentious. Clayton & Renvoize (1986) assigned just one species, *M. laevis* (Retz.) Kunth to the genus. However, they pointed out that paired sessile spikelets, a key feature of *Mnesithea*, also occur sporadically in neighbouring genera and these genera, including *Coleorachis* Brongn., are not well separated. Veldkamp *et al.* (1986) placed *Coelorachis* into the synonymy of *Mnesithea*. Recent treatments of subtribe Rottboelliinae in Thailand (Norsaengsri 2000; Traiperm 2007) and China (Phillips & Chen 2006) have followed this broader circumscription, which will be adopted in the forthcoming *Flora of Thailand* account of the subtribe (Traiperm *et al.* in prep.). About 30 species are distributed throughout the tropics (Veldkamp *et al.* 1986); seven species of *Mnesithea* have been recognised as occurring in Thailand. *Mnesithea thailandica* has recently been discovered which is new to science. This is described and illustrated below.

Mnesithea thailandica *Traiperm & Boonkerd* **sp. nov.** *M. geminatae* (Hack.) Ridl. similis, sed glumis spicularum sessilium triangularibus (vs lanceolatis), nodis et internodiis rachidum pubescentibus (vs glabris) differt. Typus: Thailand, NE31, Roi Et: Suwanaphoom Distr., Nayai, Ban Hang Hoey village, 10 June 1982, *Y. Paisooksantivathana & S. Sutheesorn* y1048-82 (holotypus BK).

http://www.ipni.org/urn:lsid:ipni.org:names:77105292-1

Perennial grass, caespitose. *Culms* small, erect, slender, c. 26 cm tall, internodes pilose to pubescent, nodes with densely ciliate hairs. *Leaf sheaths* loose, 2.5 – 6 cm long, pubescent. *Ligule* membranous with ciliate margins, c. 0.5 mm long. *Blades* 5 – 20 by 0.4 – 0.8 mm, pubescent on both surfaces, apex acute. *Inflorescences* racemose a compound, leafy panicle of spatheate racemes. Racemes solitary, subterete, c. 6 cm long, terminal. Rhachis internodes clavate, 2 – 2.5 mm long, pubescent, rhachis nodes pubescent; spikelets in pairs. Spikelets dorsoventrally compressed. *Sessile spikelets* slightly twice as long as the rhachis nodes, callus pubescent. Lower glume triangular, c. 4 by 2 mm, indurate, smooth, margins folded, pubescent on the back, apex with 2 narrow wings. Upper glume ovate or boat-shaped, c. 3 by 1.3 mm, keeled on the upper and pilose along keel; lower floret barren, with small palea. *Stamens* 3; anthers yellow, c. 1 mm long; stigmas 2, plumose. *Pedicelled spikelets* oblong, c. 1 mm long, pubescent, reduced to 2 asymmetrical glumes, keeled along the margins. Pedicels oblong or ribbon-like, c. 3 by 0.6 mm, pubescent. Fig. 1.

DISTRIBUTION. Endemic to Thailand.

SPECIMEN EXAMINED. THAILAND. NE31, Roi Et: Suwanaphoom Distr., Nayai, Ban Hang Hoey village, 10 June 1982, *Y. Paisooksantivathana & S. Sutheesorn* y1048-82 (holotype BK!).

HABITAT. Common in paddy fields; 100 m.

CONSERVATION STATUS. Only known from the type and best recorded as DD (Data Deficient) until further fieldwork is undertaken to assess the size and extent of the population.

PHENOLOGY. Flowers in June.

NOTES. Although only known from the type, *Mnesithea thailandica* is immediately distinguished from other *Mnesithea* spp. by the pubescence on the lower glume,

Accepted for publication May 2010

[1] Ph.D. Programme in Biological Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
[2] *Present Address:* Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.
[3] Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
[4] Applied Taxonomic Research Center, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.
[5] Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey. TW9 3AB, UK.

© The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, 2010

Published online: 17 June 2010

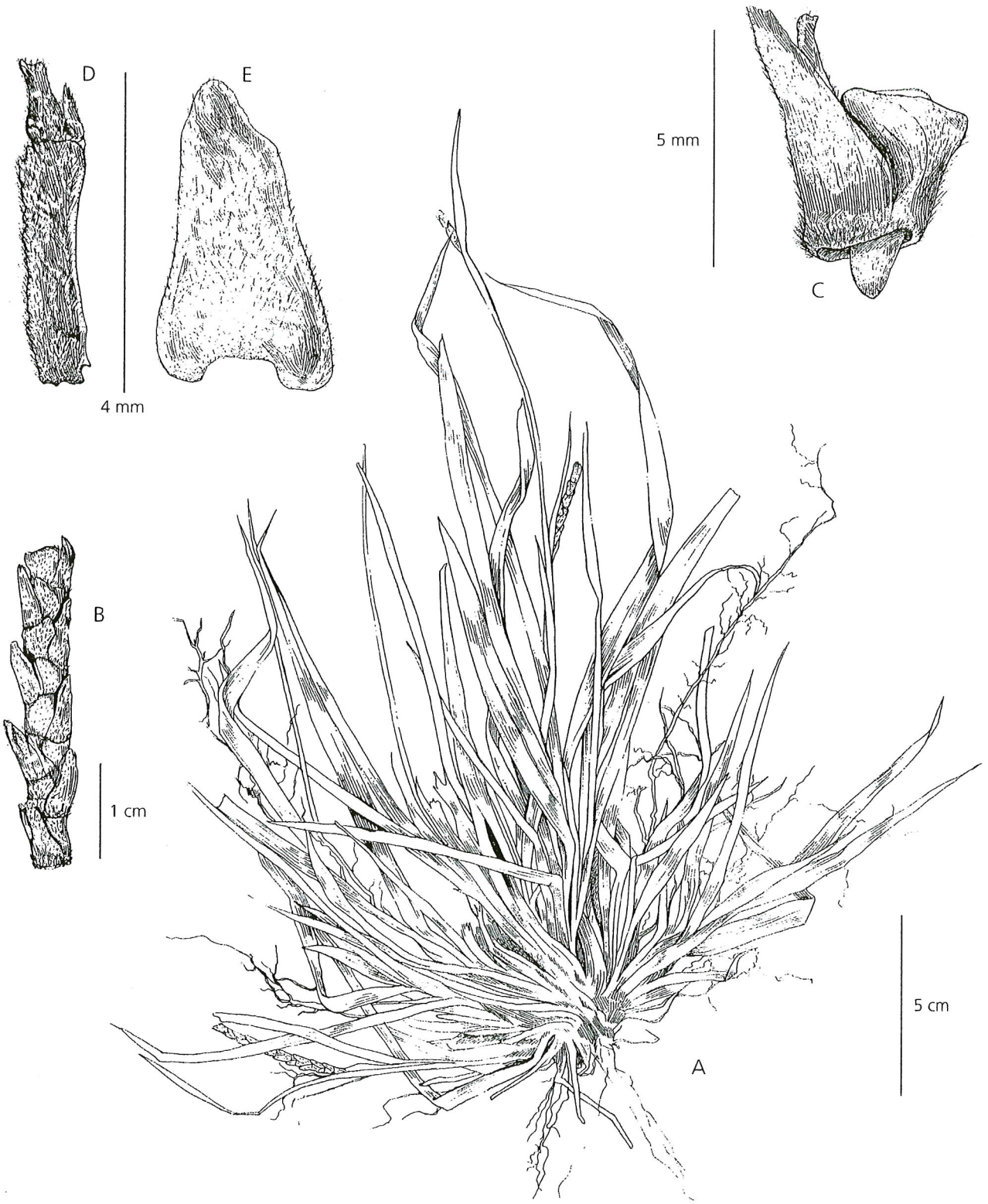


Fig. 1. *Mnesithea thailandica*. A habit; B part of inflorescence; C spikelet pair; D pedicelled spikelet with pedicel; E lower glume of the sessile spikelet. All from the type. DRAWN BY P. TRAIPERM

© The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, 2010

rhachis internodes, nodes and pedicels. It is similar to the Malaysian species *M. geminata* (Hack.) Ridl. but this has a lanceolate lower glume that is just hirsute below and is glabrous on the rhachis nodes, pedicels and rhachis internodes.

This species was described as common in paddy fields at the time of collection. Unfortunately the plants were not re-found at the type locality during the present work, probably due to the replacement of the agricultural land by industrial devevelopment.

Acknowledgements

The first author acknowledges receipt of the following grants to undertake this work: TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training Grant (BRT T_148023); the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University (CEB_D_3_2005); and a grant from Development and Promotion of Science and Technology Talents project of Thailand (DPST). We are indebted to Dr Benjamin Øllgaard for assisting with the latin diagnosis and to Drs Steve Renvoize and Tom Cope for their suggestions to improve the work and providing facilities while working in the Grass Section at Kew. We are also very grateful to the curators and staff of the following herbaria: AAU, BCU, BK, BKF, BM, CMU, K, KKU, L, P, PSU, QBG, TCD and Herb. Biology, Chiang Mai University for all information and their assistance during visits to their institutions.

References

Clayton, W. D. & Renvoize, S. A. (1986). *Genera Graminum: Grasses of the World.* HMSO, London.

Norsaengsri, M. (2000). *The family Gramineae in Phu Phan National park, Sakon Nakhon Province.* Unpublished M.S. thesis. Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Phillips, S. M. & Chen, S. L. (2006). Poaceae. In: Z. G. Wu & P. E. Raven (eds), *Flora of China* 22. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St Louis.

Traiperm, P. (2007). *Systematics of* Ischaemineae *and* Rottboelliinae (Poaceae) *in Thailand.* Unpublished Ph.D. thesis. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Veldkamp, J. F., De Koning, R. & Sosef, M. S. M. (1986). Generic delimitation of *Rottboellia* and related genera (Gramineae). *Blumea* 31: 281 – 307.

© The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, 2010

ลำดับที่ 14

The Natural History Journal of Chulalongkorn University 7(1): 67-70, May 2007
©2007 by Chulalongkorn University

Ischaemum hubbardii Bor (Poaceae), a New Record for Thailand

PAWEENA TRAIPERM[1], THAWEESAKDI BOONKERD[2*], PRANOM CHANTARANOTHAI[3] AND DAVID A. SIMPSON[4]

[1]*Ph.D. Programme in Biological Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.*
[2]*Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Bangkok 10330, Thailand.*
[3]*Applied Taxonomic Research Center, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*
[4]*Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AB, U.K.*

ABSTRACT.- **An addition to the known Thai grasses, a species of *Ischaemum*, has been found in Chiang Mai Province, northern Thailand. This newly recorded species is described and illustrated.**

KEY WORDS: *Ischaemum*, Poaceae, Gramineae, new record, Thailand

INTRODUCTION

Ischaemum was firstly described as a genus in the family Poaceae by Linnaeus (1753). The genus is annual or perennial, comprising about 75 species in the tropics and subtropics (Sur, 2001). Sixteen species of *Ischaemum* were recorded for Thailand by Nanakorn & Norsangsri (2001). In preparing the treatment of *Ischaemum* for the Flora of Thailand, it was found that *Ischaemum hubbardii* Bor is a new record. This species was previously known only from India. It was first described by Bor in 1938 and is commonly found in the Khasia and Jaintia hills at altitudes ranging from 4,000-5,000 m.

*Corresponding author:
Tel: (662) 218-5502-3
Fax: (662) 218-5502
E-mail: thaweesakdi.b@chula.ac.th

MATERIALS AND METHODS

This study is based on specimens collected from Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province, northern Thailand. For comparison, we also examined herbarium material deposited in AAU, K and L. Determinations were made with the help of a key to the species of *Ischaemum* from India presented by Sur (2001).

RESULTS

The morphological characters of the Doi Inthanon *Ischaemum* specimens (P. Traiperm 308 and S. Laegaard & M. Norsangsri 21669, 21728) matched well with the key to the species and description

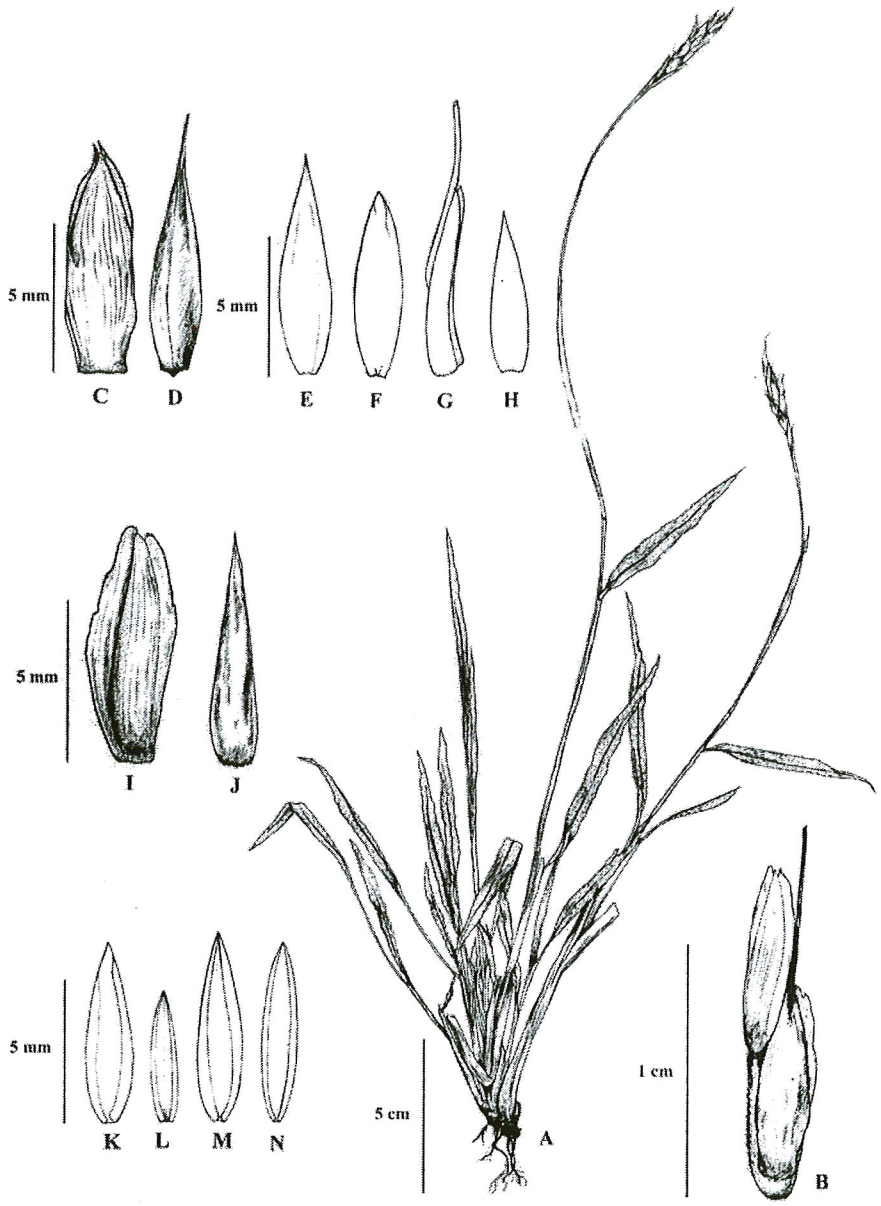


FIGURE 1. *Ischaemum hubbardii* Bor. **A.** Habit. **B.** Spikelet pair. **C.-H.** Sessile spikelet: **C.** Lower glume, **D.** Upper glume, **E.** Lower lemma, **F.** Lower palea, **G.** Upper lemma, **H.** Upper palea. **I.-N.** Pedicelled spikelet: **I.** Lower glume, **J.** Upper glume, **K.** Lower lemma, **L.** Lower palea, **M.** Upper lemma, **N.** Upper palea. All line drawings were drawn by P. Traiperm from specimen P. Traiperm 308.

of *Ischaemum hubbardii* in Sur (2001). It is also fitted well with the herbarium and type specimens, which are deposited in Kew. Accordingly, *Ischaemum hubbardii* is newly recorded for Thailand. The description below is based on the Thai material.

***Ischaemum hubbardii* Bor**

Bor in Indian Forest Rec. Bot. 1: 98. 1938; Grass. Burm. Ceyl. Ind. & Pakis.:179. 1960; Srivastava & Sinha in High. Pl. Ind. Sub-con. 9: 66. 2000; Sur in J. Econ. Taxon. Bot. 25(2): 417. 2001. Type: India, Assam, fairly common in the Khasia and Jaintia hills, alt. 4,000-5,000 m, *N.L. Bor* 2264 (holotype K!). Fig. 1.

Perennial, densely tussocking grass. *Culms* slender, terete, 25–60 cm tall, internodes and nodes glabrous. *Leaf-sheaths* tight, 4–7 cm long, glabrous or slightly pilose, margins thin. *Ligules* long membranous, 3.5–5 mm long, glabrous. *Leaf-blades* 5–15 by 0.3–1 cm, tuberculate-pilose on both surfaces, margins scabrous, apex acute. *Inflorescences* raceme, terminal, 3–5 cm long, conjugated with 2 racemes, rachis internodes oblong, 6–6.5 by *ca.* 0.1 mm, triangular in transverse section, pilose along central keel, nodes with a ring of long hairs, callus *ca.* 1 mm long, glabrous. *Sessile spikelet*: lower glume oblong, 6.5–8 by 2.5–2.8 mm, distinctly 10–14-nerved, subcoriaceous, transversely humped along the lower 1/3, glabrous on back, unequally narrowly laterally winged above, wing scabrous; upper glume boat-shaped, 8–9 mm by 1.8–2.2 mm, keeled, scabrous, margins ciliate, apex acuminate, with a small wing at the apex. *Lower floret*: lemma lanceolate, 7–7.5 by *ca.* 1.5 mm, hyaline, slightly folded, upper margins ciliate; palea elliptic, 5.5–6 by *ca.* 1.5 mm, hyaline, folded, apex muticous. *Upper floret*: lemmas *ca.* 7 by 1.5–1.8 mm, bifid, geniculately awned from sinus, awn twisted, 18–25 mm long; palea ovate, *ca.* 5 by 1.3 mm, apex acute, hyaline. *Lodicules* cuneate, 1–1.2 mm long. *Pedicelled spikelets*: pedicels 5.5–6 by *ca.* 1 mm, pilose along central keel. *Glumes*: lower glume obliquely-oblong, 7–7.5 by 2.7–3 mm, 6–8-nerved, with 2 subequal wings along whole length of the margins, glabrous on back, margins folded, apex bifid; upper glume boat-shaped, 7–8 by 1.5 mm, keeled along the upper of mid-nerve, scabrous on keel. *Lower floret*: lemma lanceolate, *ca.* 6 by 1.2 mm, hyaline, folded, glabrous, apex acute; palea oblong, *ca.* 5 by 0.8 mm, apex acute, hyaline, slightly folded. *Anthers ca.* 3 mm long. *Upper floret*: lemma ovate, *ca.* 5.5–6.5 by 0.9–1.4 mm, apex acute, hyaline, folded; palea oblong, *ca.* 4.5–6 by 0.8–1.2 mm, apex rounded, hyaline, slightly folded. *Caryopsis* ellipsoid, *ca.* 3 mm long.

Thailand.- NORTHERN: Chiang Mai [Doi Inthanon, Kew Mae Pan nature trail, 25 Nov. 2005, *P. Traiperm* 308 (BCU, BKF, KKU); Doi Inthanon, Kew Mae Pan nature trail 3 Oct. 2001, *S. Laegaard & M. Norsangsri* 21669 (AAU, K, L); Doi Inthanon National Park, along road from summit *ca.* 5 km towards entrance, 16 Oct. 2001, *S. Laegaard & M. Norsangsri* 21728 (AAU)].

Distribution.- India and Thailand.

Ecology.- Common along Kew Mae Pan nature trail or in lawn near pagoda, alt. 1,950- 2,650 m. Flowering period: October to November.

DISCUSSION

Ischaemum hubbardii is characterized by its tuberculate-pilose leaves together with a lower glume that has 10–14 distinct nerves, and a transverse hump on the lower

1/3 of the glume, which is glabrous on the back. It is similar to *I. indicum* (Houtt.) Merr. in having a glabrous surface on the back of the lower glume of sessile spikelets but differs in having the unequal narrow lateral wings above and hairs on both surfaces of the leaf-blades. The lower glume of the sessile spikelet in the Thai specimens has a transverse, nearly flat hump on the lower 1/3 of the glume although the hump is slightly convex on the back in the type specimen from India.

So far, this species has been found at high altitude in India and Thailand and seems to be a member of the so called Indo-Burmese elements. It should also occur somewhere in upper Myanmar. However, the available taxonomic data of this plant group from Myanmar are still scant. For our species this may, in part, be due to its preference for high altitude habitats which are difficult to get to in order to make collections. Further work in this area is needed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was kindly supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training Grant (BRT T_148023) and the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University (CEB_D_3_2005). The first author also wishes to thank the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project of Thailand (DPST) for funding of this research. We are indebted to the directors and curators of AAU, BCU, BKF, K, KKU and L for making their collections available for study. We would like to thank Brian Swale for his comments on the manuscript. Special thanks also to Monton Norsangsri and the students of the Taxonomy and Anatomy program of KKU for their company and assistance in field collections.

LITERATURE CITED

Bor, N.L. 1938. A List of the Grasses of Assam. Indian Forest Records (new series) Botany, 1: 98.

Linnaeus, C. 1753. Species Plantarum. The Ray Society, London. 560 pp.

Nanakorn, W. & Norsangsri, M. 2001. Species enumeration of the Thai Gramineae. The Herbarium Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai, Thailand. 92 pp.

Sur, P.R. 2001. A revision of the genus *Ischaemum* L. (Poaceae). Journal of Economic and Taxonomic Botany, 25: 407–438.

Received: 18 December 2006
Accepted: 11 April 2007

ลำดับที่ 15

The Natural History Journal of Chulalongkorn University 9(1): 99-104, April 2009
©2009 by Chulalongkorn University

Short Note
A First Record of *Microsorum musifolium* Copel. (Polypodiaceae) from Thailand

SAHANAT PETCHSRI[1,2], THAWEESAKDI BOONKERD[2*] AND BERNARD R. BAUM[3]

[1]*Biological Sciences Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*
[2]*Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand*
[3]*Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Ottawa, Ontario, K1A 0C6, Canada*

***Microsorum musifolium* Copel. is firstly discovered from Waeng, the southernmost district of Narathiwat Province, Thailand. The species is described and illustrated. A key, including all the additional species, for the Flora of Thailand is constructed. Taxonomic confusion of *Microsorum musifolium* Copel. with *Microsorum punctatum* (L.) Copel. is noted.**

The wart ferns, *Microsorum* Link, consist of about 50 species worldwide, and belong to the family Polypodiaceae in the order Polypodiales[1]. These species are widespread in the temperate and tropical parts of the Old World, extending from the Pacific Islands to northeast Australia, Malaysia, Southeast Asia, southern China, from the Indian subcontinent to Madagascar and tropical Africa. In Thailand, 11 species have previously been recorded[2]. In 2001 a new species of *Microsorum*, *M. thailandicum* T. Boonkerd & Noot., was found to occur in a limestone mountain in Chumphon Province, peninsular Thailand[3]. Then, a new record, *Microsorum insigne* (Blume) Copel. was collected from Phu Hin Rong Kla National Park, Phitsanulok Province, lower northern Thailand[4]. Recently, another calciphyte, *M. siamense* T. Boonkerd, was discovered from limestone mountains in Yala Province, peninsular Thailand[5]. Thus so far, 14 distinct species of *Microsorum* have been recorded in Thailand.

Here, we report an additional species in Thailand, *Microsorum musifolium* Copel., which was found during the botanical trip to the Sirindhorn Waterfall, Waeng District, Narathiwat Province, peninsular Thailand. It was previously known to occur in southern Myanmar, peninsular Malaysia, Sumatra, Indonesia, Borneo, Philippines and New Guinea[6]. The species was first described by Blume in 1828 as *Polypodium musifolium* Blume from the specimens collected in an area near Buitenzorg in Java[6].

Microsorum musifolium Copel.
(Fig. 1)

Microsorum musifolium Copel., Univ. Calif. Publ. Bot. 16: 112. 1929; Bosman, Monogr. *Microsorum*, Leiden Bot. Ser. 14: 94. 1991. – *Polypodium musifolium* Blume, Enum. Pl. Javae 2: 134. 1828. –*Pleopeltis musifolia* T. Moore, Index Fil. 78. 1857. –*Drynaria musifolia* J. Sm, Cat. Cult. Ferns 14. 1857.

*Corresponding author:
E-mail: thaweesakdi.b@chula.ac.th

Type: Java, near Buitenzorg, *Blume s.n.* (holotype, L!).

Rhizome moderately long creeping, cylindrical to dorso-ventrally slightly flattened, 5.5 - 8.4 mm in diameter, not waxy ; roots densely set forming a thick mat; phyllopodia obscure, up to 10 mm apart. Rhizome anatomy: vascular bundles in cylinder 17 - 21, bundle sheaths collenchyma - tous, sclerenchyma strands at least 50, scattered, ground tissue without cavities. Rhizome scales densely set at apex, appressed, peltate, widest below or about the middle, 3.2 - 5.0 by 1.2 - 1.6 mm, clathrate, marginal region hyaline, margin entire, apex acuminate, central region dark, glabrous, inner layer of thickened cell walls smooth. *Fronds* simple, well proportioned to the rhizome diameter; stipes absent or indistinct, up to 6 mm in diameter, with a few scales; widest about or above the middle, 35 - 98 by 5 - 11.2 cm, light green when living, subcoriaceous, with short glandular hairs and a few scales, acicular hairs absent, base truncate to obtuse, margin entire-undulate, apex acute to acuminate. *Venation pattern*: veins forming a more or less regular row of nearly equally sized areoles between each pair of adjacent secondary veins, all veins clearly distinct; secondary veins 7 - 15 mm apart, more or less straight, dichotomously branched near the margin of the lamina; tertiary veins catadromous, 6 - 10 between adjacent secondary veins, interconnected by some quaternary veins; smaller veins variously anastomosing; free included veins simple, once- and in part twice-forked, pointing to all sides. *Sori* superficial, round, sometimes in part confluent, 1.2 - 1.5 mm in diameter, spreading all over the lamina or restricted up to the distal ½, absent in the marginal areoles, occasionally present in all areoles, 33 - 46 per cm^2, not on tertiary veins, occasionally in part on quaternary veins, irregularly scattered on the smaller anastomosing veins and on the free included veins. Paraphyses uniseriate, 2- or 3-celled. *Sporangia*: annulus (18-) 19- or 20-celled, indurated cells (12) 13 or 14, hypo- and epistomial cells together 6 or 7. *Spores* concavo-convex, hyaline, 43 - 53 by 30 - 37 µm, colliculate, the elevations not very prominent, rounded, about 5 µm wide.

Specimens examined.– *Boonkerd & Pollawatn 243-2* (BCU); *Elmer 20871* (K, P); *Enders 4022* (L); *Iwatsuki et al. 3252* (K); *Kato et al. B3252* (L); *Bernardi 234* (B); *Blume s.n.* (L); *Zollinger 3005* (P); *Beddome 1911* (K); *Henderson 19704* (K), *19708* (BM); *King 192* (K); *Little 469* (L); *Matthew 1928* (K); *Turneau 836, 905* (K); *Lauterbach*

TABLE 1. Comparison of eight qualitative characters of *M. musifolium* and *M. punctatum*

Character	*M. musifolium*	*M. punctatum*
Rhizome surface	not waxy	often waxy
Attachment of scales	peltate	pseudopeltate
Spreading of scales	appressed	distinctly or slightly spreading
Scales margin	entire	dentate to denticulate
Presence of hyaline marginal region on rhizome scales	present	absent
Lamina base	truncate to obtuse	narrowly angustate to cordate
Visibility of veins	all veins distinct	all veins or secondary and smaller veins more or less immersed and vague (at least in living specimen)
Spores shape	concavo-convex	plano-convex

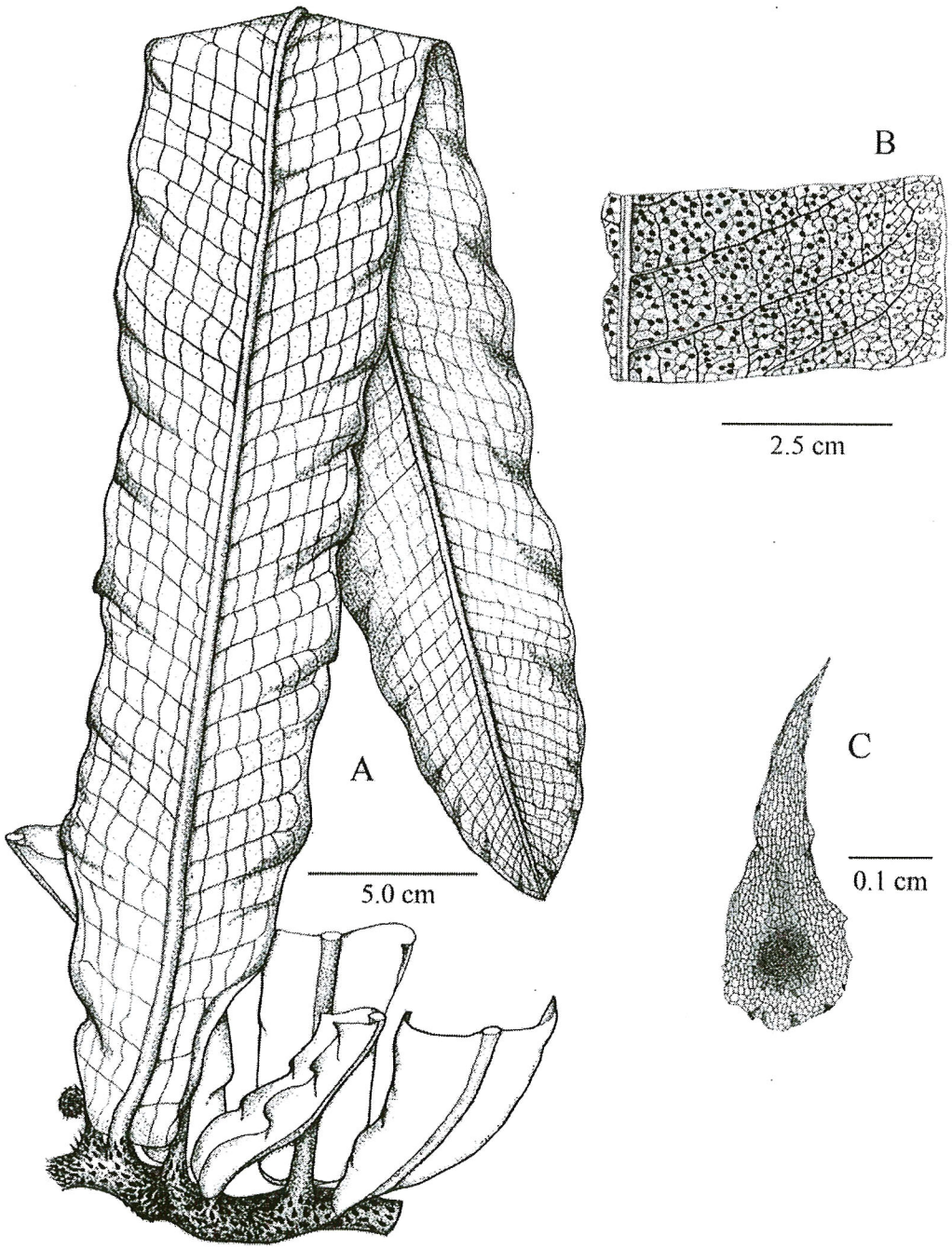


FIGURE 1. *Microsorum musifolium* Copel. (A) Habit, (B) Detail of sori and venation, (C) A rhizome scale. Drawn by Sahanat Petchsri from *T. Boonkerd & R. Pollawatn 243-2* (BCU).

TABLE 2. Measurements of 16 quantitative morphological characters of *M. musifolium* and *M. punctatum*

Characters	*M. musifolium*		*M. punctatum*	
	mean	± SE	mean	± SE
Lamina width (mm)	96.5[a]	16.5	57.8[b]	18.4
Lamina length (mm)	832[a]	157	736[a]	44
Stipe length (mm)	0.48[a]	0.11	101.4[b]	7.0
Stipe diameter (mm)	5.75[a]	1.04	4.53[b]	0.92
Diameter of phyllopodia (mm)	5.56[a]	1.33	4.39[b]	1.06
Phyllopodia length (mm)	6.13[a]	1.25	4.40[b]	1.27
Rhizome diameter (mm)	6.98[a]	1.40	5.74[b]	1.25
Distance between closest phyllopodia (mm)	12.5[a]	3.0	8.20[b]	1.88
Scale length (mm)	3.64[a]	0.40	3.30[a]	0.62
Scale width (mm)	1.42[a]	0.21	1.18[b]	0.24
Density of sori per cm^2	39.5[a]	6.6	38.4[a]	10.0
Diameter of sori (mm)	1.39[a]	0.15	1.28[a]	0.17
Diameter of sporangium (mm)	0.16[a]	0.01	0.17[a]	0.15
Number of annulus cell	18.9[a]	0.8	19.3[a]	1.0
Spore length (μm)	47.7[a]	4.9	51.7[b]	4.1
Spore width (μm)	33.3[a]	3.6	31.4[a]	3.1

Note: Values represent the mean ± 1 S.E., Mean with significant differences ($p<0.05$) denoted by different superscripts within each row.

567 (P); *Ledermann 7695, 8549, 8743* (B); *Schlechter 2764* (B); *Copeland 1537* (B); *Elmer 10500* (K, L); *Vanoverberg 3678* (P); *Gay 132* (K); *Hancook 342, 1892* (K); *Hose 1827* (BM); *J. Smith 1859* (BM); *Corner 30247* (K); *Haniff 21028* (K); *Brooks 357* (BM); *Lau 1796* (K); *de Wide & de Wide 12385* (L)

Thailand.– PENINSULAR: Narathiwat (Sirindhorn Waterfall).

Distribution.– Southern Myanmar, peninsular Malaysia, Sumatra, Indonesia, Borneo, Philippines and New Guinea.

Ecology.– Low epiphytes or lithophytes in tropical evergreen forests at low altitudes.

Note.– *Microsorum musifolium* was wrongly treated as a synonym of *Microsorum punctatum* (L.) Copel. by Nooteboom (1997)[7] despite their differences in at least eight qualitative characters, namely the rhizome surface, attachment of scales, spreading of scales, scale margin, presence of hyaline marginal region on rhizome scale, lamina base, visibility of veins and spore shape (Table 1). They also differed in some quantitative, vegetative characters (Table 2). Therefore *M. musifolium* should be recognized as a species of its own.

Previously, Tagawa and Iwatsuki (1989)[2] are likely to have made a mistake in describing fronds of *M. rubidum* as pinnate and so the key to species in the Flora of Thailand cannot be used to identify this species correctly. Likewise, a simple, entire frond-form of *M. pteropus*, which is commonly found, also has identification problems.

The key to the species of the *Microsorum* account[2], therefore, has been revised and includes all the new taxa for Flora of Thailand, viz. *M. thailandicum*, *M. insigne* and *M. siamense*.

Key to species of *Microsorum*

1. Sori superficial, not sunk in cavities
   2. Frond usually simple, entire or slightly undulate
      3. Rhizome slender, scandent, with fronds far apart.....**1. *M. superficial***

3. Rhizome thick, creeping, never scandent
4. Lateral main veins distinctly raised at least on lower surface
5. Sori in two regular rows between adjacent main veins.....**2. *M. zippelii***
5. Sori irregularly scattered, abundant
6. Stipe distinct, winged to the base; lamina thinly herbaceous to paperaceous, light to dark green
7. Stipe winged on upper portion. Usually occurs on wet rocks in stream-beds, in spraying water..... .....**6. *M. pteropus***
7. Stipe winged nearly to the base
8. Mountain plant; receptacles punctuate..... .....**3. *M. membranaceum***
8. Lowland plant; receptacles elongate..... .....**4. *M. heterocarpum***
6. Stipe indistinct or absent; lamina subcoriaceous, light green when living.....**15. *M. musifolium***
4. Lateral main veins hardly visible
9. Living frond light green in colour.... .....**5. *M. punctatum***
9. Living frond iridescent blue-green
10. Costa grooved on upper surface; hydathode absent..... .....**12. *M. thailandicum***
10. Costa slightly raised on upper surface; hydathode distinct on upper surface.....**14. *M. siamense***

2. Fronds of well-grown plants deeply lobed
11. Fronds trilobite. Stipes and midribs beneath scaly; dark green to blackish in colour..... .....**6. *M. pteropus***
11. Fronds pinnatifid with more than one pairs of lateral lobes
12. Fronds lobed to within 2-5 mm of the midrib; rhizome long creeping.....**13. *M. insigne***
12. Fronds lobed to about 1 cm from the midrib; rhizome short creeping.....**7. *M. dilatatum***

1. Sori sunk in cavities
13. Sori uniseriate on either side of midrib; main veins distinct
14. Frond pinnate usually with more than 12 pairs of pinnae. Sori slightly sunk in cavities..... .....**8. *M. cuspidatum***
14. Frond deeply lobed. Sori deeply sunk in cavities
15. Lamina light green. Lobes usually more than 15 pairs..... .....**9. *M. rubidum***
15. Lamina dark green. Lobes usually less than 12 pairs..... .....**10. *M. nigrescens***
13. Sori in two rather irregular rows on either side of midrib; veins hardly visible.....**11. *M. scolopendria***

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our thanks to anonymous reviewers for their valuable comments on the manuscript. We are indebted to the directors and curators of B, BCU, BKF, BM, K, L and P for making their collections available for study. This project was supported by the Thai government budget 2005, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity and the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University; Chulalongkorn University graduate scholarship to commemorate the 72nd anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej and the TRF/ BIOTEC

Special Program for Biodiversity Research and Training program (grant No. T_145007).

LITERATURE CITED

1. Mabberley, D.J. 2008. Mabberley's Plant-Book: A Portable Dictionary of Plants, their classification and uses. 3rd ed., completely rev., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1021 pp.
2. Tagawa, M. and Iwatsuki, K. 1989. Polypodiaceae. In: Smitinand T. and Larsen K. (Eds.). Flora of Thailand. 3, part 4, Chutima Press, Bangkok, pp. 523-534.
3. Boonkerd, T. and Nooteboom, H.P. 2001. A new species of *Microsorum* (Polypodiaceae) from Thailand. Blumea, 46: 581-583.
4. Boonkerd, T., Lindsay, S., Middleton, D.J. and Suddee, S. 2004. Additions to the pteridophyte flora of Thailand. Thai For. Bull. (Bot.), 32: 6-11.
5. Boonkerd, T. 2006. A New Species of *Microsorum* (Polypodiaceae) from Thailand. Blumea, 51: 143-145.
6. Bosman, M.T.M. 1991. A monograph of the fern genus *Microsorum* (Polypodiaceae). Rijksherbarium /Hortus Botanicus, Leiden, 161 pp.
7. Nooteboom, H.P. 1997. The microsoroid ferns (Po- lypodiaceae). Blumea, 42: 261-395.

Received: 25 December 2008
Accepted: 24 February 2009

ลำดับที่ 16

Bangladesh J. Plant Taxon. 16(2): 99-113, 2009 (December)
© 2009 Bangladesh Association of Plant Taxonomists

PHENETIC RELATIONSHIP BETWEEN *LEPISORUS* (J.SM.) CHING (PTERIDOPHYTA: POLYPODIACEAE) AND ITS RELATED GENERA

WANNACHAI CHATAN[1], THAWEESAKDI BOONKERD[1,2] AND BERNARD R. BAUM[3]

Biological Sciences Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand.

Keywords: *Lepisorus*; *Paragramma*; *Platygyria*; Cluster analysis; Canonical discriminant analysis.

Abstract

Multivariate analyses based on morphological and anatomical characters have been performed to investigate the phenetic relationship and to clarify the circumscriptions of the genus *Lepisorus* (J.Sm.) Ching and its related genera, namely *Neocheiropteris* Christ, *Paragramma* T. Moore and *Platygyria* Ching & S.K. Wu. The dendrogram of cluster analysis separated the plants into three groups at Gower similarity coefficient 0.75. Group 1 and Group 2 consisted of *Neocheiropteris palmatopedata* (Baker) H. Christ and four species of *Platygyria*, respectively. Group 3 was *Neocheiropteris ensata* Ching and two species of *Paragramma* deeply embedded in the *Lepisorus s.s.* Canonical discriminant analysis supported the classification inferred from the clustering results. Based on these results, *Platygyria* and *N. palmatopedata* should be recognized as distinct genera. On the other hand, *N. ensata* and the genus *Paragramma* should be merged to the genus *Lepisorus*.

Introduction

Lepisorus (J.Sm.) Ching *s.l.* (including *Paragramma* T. Moore) is the fern genus of Polypodiaceae, which comprised approximately 30 species (Verdcourt, 2001) or 70 species (Lin, 2000) naturally occurring in the tropical and subtropical Old World and extending northwards to the Far East of Russia with one species in Hawaii (Verdcourt, 2001). *Lepisorus s.s.* (excluding the *Paragramma*), however, was first treated by J. Smith in 1846 (in Zink, 1993) as a section of a highly heterogeneous *Drynaria*, and Ching (1933) raised the section *Lepisorus* to generic rank. The common features of *Lepisorus s.l.* are epiphytic, epilithic or terrestrial ferns with short- to long-creeping rhizome covered by clathrate scales; laminas are simple, entire and mostly naked; and sori are borne in single rows on either side of the midrib, and covered by clathrate paraphyses (Hennipman *et al.*, 1990; Verdcourt, 2001).

Until now, the generic circumscription of *Lepisorus* has remained controversial because it sometimes included or excluded its related taxa, namely *Paragramma* and *Platygyria* Ching & S.K. Wu. In addition, *Platygyria*, which is closely related to *Lepisorus s.l.* sometimes merged with the genus *Neocheiropteris* Christ.

[1] Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: wannachaichatan@gmail.com
[2] Corresponding author. E-mail: bthawees@gmail.com
[3] Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Ontario, Canada. E-mail: bernard.baum@agr.gc.ca

The genus *Paragramma* was founded by T. Moore in 1857 using *P. longifolia* T. Moore as the type species (Copeland, 1947). Until now, its separation from the *Lepisorus s.l.* has never been clear (Hovenkamp, 1998). The recognition to keep it as a distinct genus was followed by Ching (1940), Copeland (1947) and Pichi Sermolli (1977). Copeland (1947) used the combination characters of soral shape and the presence of lamina scales to distinguish the *Paragramma* from *Pleopeltis* (including *Lepisorus s.s.*). Two species, namely *Paragramma balteiformis* Copeland and the type species, were recognized by Copeland (1947). In contrast, Holttum (1954), Tagawa and Iwatsuki (1989), Hennipman *et al.* (1990) and Hovenkamp (1998) consented to unite *Paragramma* with *Lepisorus s.s.*

The Chinese fern genus *Platygyria* was erected based on the *P. waltonii* (Ching) Ching & S.K. Wu (Ching and Wu, 1980) and the characters of sporangium were used as the important defining characters. So, five species, namely *Platygyria sinuata* Ching & S.K. Wu, *P. inaequibasis* Ching & S.K. Wu, *P. variabilis* Ching & S.K. Wu, *P. kongtingensis* Ching & Y.X. Lin and *P. muliensis* Ching & S.K. Wu were recognized (Ching and Wu, 1980; Ching *et al.*, 1983). Likewise, Zhang *et al.* (2003) agreed to keep *Platygyria* at the genus level and treated *P. kongtingensis* and *P. muliensis* as two synonyms of *P. variabilis*. However, there were other two treatments of the genus *Platygyria*. The first involved reducing *Platygyria* under *Neocheiropteris* (Ching, 1933; Hennipman *et al.*, 1990), while the second involved merging *Platygyria* with *Lepisorus s.s.* (Yu and Lin, 1997). Therefore, the merging of *Platygyria* with either *Lepisorus* or *Neocheiropteris*, or its acceptance as a distinct genus needs to be assessed.

As the controversial generic circumscription or position of these taxa shown above, until now, there has been no taxonomic study aimed at clarifying these problems. Therefore, the objectives of the present work were, 1) to investigate the phenetic relationship and use the result to determine the suitability of the generic circumscription or position of the *Lepisorus* and the other three related genera, i.e. *Neocheiropteris*, *Paragramma* and *Platygyria*, and 2) to determine the important morphological or anatomical characters that can be used to distinguish these taxa. With the aforesaid objectives in mind, both cluster analysis (CA) and discriminant analysis (DA) were performed based on 53 qualitative and quantitative characters examining 487 herbarium specimens.

Materials and Methods

Plant materials: In the present study, about 2500 herbarium specimens collected from around the world and housed at the herbaria in Europe (BM, E, L, K and P) and Asia (BCU, BKF, BK, PE, KUN, PYU and TI) were studied (Herbarium abbreviations according to Holmgrens and Holmgrens, 2008). A total of 487 complete specimens were selected for examination constituting the Operational Taxonomic Units (OTUs). (Some

representative specimens are listed in Appendix I. A complete list is available upon request from the corresponding author.) The specimens that were included in this study belonged to *Lepisorus s.s.* and its related three genera, namely *Neocheiropteris*, *Paragramma* and *Platygyria*. These specimens included specimens of the type species of each genus. Most specimens were identified by examining type specimens or identifications were made by consulting literature, e.g. Ching (1933), Tagawa and Iwatsuki (1989), Zink (1993), Shieh *et al.* (1994), Hovenkamp (1998), Verdcourt (2001), and Zhang *et al.* (2003).

Morphological and anatomical characters: Fifty-three morphological and anatomical characters were examined for each of the 487 specimens. Measurement was carried out by using a Keiba digital caliper No. 111-101HB or specimens were measured under Stereomicroscope (Zeiss Stemi DV4) and light microscopes (Olympus CH30). Of these characters, 26 were quantitative including four ratio characters (Appendix II), and 27 were qualitative characters scored as binary or multi-state characters (Appendix III). These characters and their states were used to construct a data matrix.

Phenetic analysis: The phenetic relationships among the taxa were investigated by two types of multivariate analysis: cluster analysis (CA) and canonical discriminant analysis (DA). The CA was performed by using an unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) clustering implemented in the Multivariate Statistical Package (MVSP), Version 3.13 (Kovack Computing Services) to place individual specimen into groups. Because the characters submitted to analysis were both quantitative and qualitative, the Gower similarity coefficient (GSC) was calculated (Gower, 1971) and clustered by the group-average method of the MVSP program.

A subset of characters that maximized differences among the groups determined by CA or other groups (i.e. *Lepisorus s.s.*, *Paragramma*, *Platygyria* and *Neocheiropteris*) that were recognized by previous pteridologists as a distinct group were selected by stepwise discriminant analysis. Prior to performing discriminant analyses, the data matrix was modified, i.e. characters that did not satisfy the assumption of normal distribution were transformed by taking them with the natural logarithm. The canonical discriminant analyses was performed by using the CLASSIFY procedure in SPSS/PC for Windows, release 10.0 (Anonymous, 1999).

Results and Discussion

Cluster Analysis (CA): The UPGMA dendrogram that constructed using GSC measure showed three discrete groups (Fig. 1) at GSC 0.75. Group 1 included *Neocheiropteris palmatopedata* and Group 2 comprised the four species of *Platygyria*. In addition, Group 3 was the largest group consisting of *Lepisorus s.s.*, *N. ensata* and the two species of *Paragramma*.

At Gower similarity coefficient 0.71, these fern taxa were divided into two groups, i.e. Group 1 and a group composed of Groups 2 and 3 (Fig. 1). Group 1 is distinct from the rest mainly by the combination characters of pedatifid lamina, presence of large veins at the lamina base and lamina width (more than 120 mm) as shown in the key to the genera below. The result suggested that *N. palmatopedata* was far distinct from the rests while the genus *Platygyria* was more closely related to the genus *Lepisorus* and *Paragramma* than *N. palmatopedata*. In addition, genus *Lepisorus*, *N. ensata* and *Paragramma* are closely related to each other than the rest.

Canonical Discriminant Analysis (DA): DA was divided into two analyses based on the number of prior groups obtained: 1) four groups, including *Lepisorus s.s.*, *Neocheiropteris*, *Paragramma* and *Platygyria*, all of which were assigned based on previous recognized genera (such as Christ, 1905; Ching, 1940; Copeland, 1947; Pichi Sermolli, 1977; Ching and Wu, 1980; Zhang *et al.*, 2003); and 2) three groups, including Groups 1, 2 and 3, which were obtained from CA. Overall, 26 quantitative characters were used in these analyses with a purpose to test their groupings.

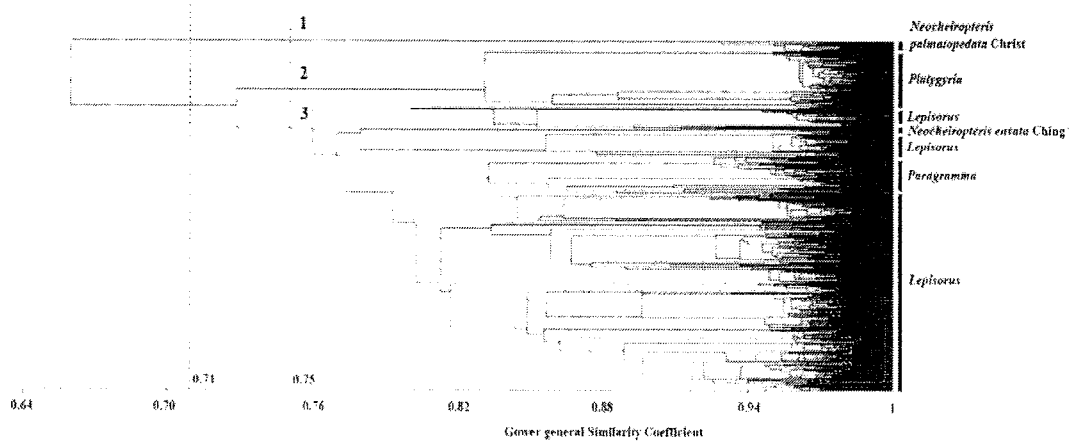


Fig. 1. UPGMA clustering of 487 Operational Taxonomic Units (OTUs) based on 53 quantitative and qualitative characters of *Lepisorus*, *Paragramma*, *Platygyria* and *Neocheiropteris*.

Once the stepwise analysis had been performed for all four groups, the linear discriminant function classification showed that 97.3% of the specimens had been correctly classified. The nature of the differences between the entries were shown by the pooled within canonical structure wherein canonical variable 1 was 97.3% correlated with the 26 quantitative characters and explained 86.2% of the total variance, which was highly associated with three characters (Table 1). Canonical variable 2 was 81.6% correlated with the quantitative characters and explained 9.7% of the total variance, which was highly associated with four characters. Canonical variable 3 was 68.1% correlated with the quantitative characters and explained 4.2% of the total variance, which was highly associated with seven characters (Table 1).

Table 1. Pooled within canonical structure of the four priori groups (i.e. *Lepisorus*, *Paragramma*, *Platygyria* and *Neocheiropteris*) as recognized by pteridologists, results based on 26 quantitative characters (Appendix II) scored in this study. Characters in bold were selected by stepwise discriminant analysis for further use in canonical discriminant analysis. *indicates the large absolute correlation between each variable and any discriminal functions.

Characters	Discriminant function		
	1	2	3
AW	.954*	-.018	.007
NM	-.079*	.058	-.032
SPOL	.055*	-.012	-.038
LL	-.049	.017	.034
LW	-.003	.520*	-.126
SL	-.014	.440*	.086
STL	.056	.364	.014
LLST	.087	.359*	-.007
PHD	-.086	.337*	.256
STPH	-.081	-.264	.201
RHDM	-.048	.232	.063
RSWI	-.061	.222	-.005
STD	-.097	.201	.195
RSLE	.034	.129	-.100
SPW	.041	-.054	.041
NSSR	-.091	-.055	.464*
PHL	-.045	.181	.390*
LLLF	.027	.075	.250*
RHLI	-.081	.135	-.218*
LFPL	-.026	.024	.210*
SW	-.010	-.036	-.192*
LLLT	.003	.129	-.178
LASL	-.031	.148	-.164
RHSI	-.020	.071	-.136
SPOW	.108	-.057	.133*
SPL	.045	.000	.049

The stepwise analysis was carried out for the three groups, i.e. these groups were split by the UPGMA dendrogram using GSC at 0.75. The nature of the differences between the entries was shown by the pooled within the canonical structure wherein canonical variable 1 was 97.2% correlated with the 26 quantitative characters and explained 89.7% of the total variance, which was highly associated with three characters (Table 2). Canonical variable 2 was 81.6% correlated with the quantitative characters and explained 10.3% of the total variance which was highly associated with seven characters (Table 2). The linear discriminant function classification (Table 3) obtaining from the program showed that the specimens had been 100% correctly classified; obviously, therefore, this

Table 2. Pooled within canonical structure of three groups (i.e. *Lepisorus* (including *Paragramma*), *Platygyria* and *Neocheiropteris*) obtained from CA based on 26 quantitative characters (Appendix II). Characters in bold were selected by stepwise discriminant analysis for further use in canonical discriminant analysis. * indicates the large absolute correlation between each variable and any discriminal functions.

Characters	Discriminant function		Characters	Discriminant function	
	1	2		1	2
AW	.968*	-.033	STPH	-.069	-.258
LLLF	.085	.082	PHD	-.008	.235
LL	-.070	.012	STD	-.072	.219
SPOW	.069	.022	RHDM	-.014	.205
SPOL	.056*	.013	RSWI	-.042	.159
NM	-.034	.019	**NSSR**	-.088	-.147*
LFPL	-.027*	-.023	RHLI	.013	.145
LW	-.002	.503*	SPW	.032	-.126
SL	-.014	.453*	SPL	.040	-.119
LASL	-.030	.333	RSLE	.059	.099
LLLT	.018	.310*	RHSI	.017	.093
LLST	.087	.310*	**PHL**	-.043	.092*
STL	.043	.306	**SW**	-.010	.033*

Table 3. Classification Function Coefficients of three groups (i.e. *Lepisorus* (including *Paragramma*), *Platygyria* and *Neocheiropteris*) obtained from CA based on the 26 quantitative characters (Appendix II). This linear discriminant function classification received from the program showed that the specimens had been 100% correctly classified.

Characters	Categories		
	Lepisorus (including *Paragramma*)	*Platygyria*	*Neocheiropteris*
NSSR	-0.201	-0.099	-0.026
PHL	-9.480	-6.281	-6.687
LW	13.926	3.554	4.198
SL	25.130	2.926	3.254
SW	-8.708	-3.013	-2.182
LFPL	2.936	7.615	7.031
SPOL	0.116	0.134	0.100
AW	0.302	1.306	0.365
LLST	0.119	0.290	-1.834
LLLT	1.230	-0.967	-1.146
(Constant)	-89.828	-163.867	-49.985

function could be used for further identification of these ferns. To identify an unknown specimen, one needs to multiply each character score by its coefficient in each column, compute the total for each column, the column with the highest total is the group to which the specimen belongs.

The ordination plot on the two canonical axes obtained from the four groups analysis (Fig. 2) showed that canonical axis 1 divided these plants into two main groups, one group included *Lepisorus s.s.*, *Paragramma* and *Neocheiropteris*, and the other consisting solely of *Platygyria*. However, canonical axis 2 was able to separate *N. palmatopedata* from the rest. Therefore, these two axes could divide these ferns into three groups. Furthermore, these results were similar when the plants were divided into three groups based on the result of CA (not shown).

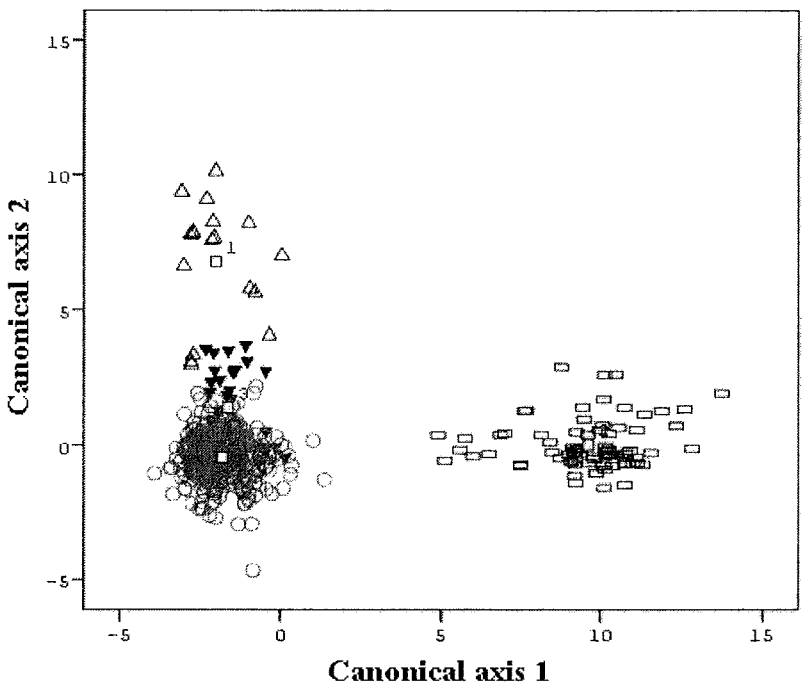


Fig. 2. Ordination plot on the canonical axes 1 and 2 of the four priori assigned groups (O: *Lepisorus*, ▼: *Paragramma*, □: *Platygyria*, △: *Neocheiropteris*).

Circumscription of Lepisorus *and* Paragramma

As far as the taxonomic position or circumscription of the *Paragramma* is concerned, there are two different forms of recognition so far, i) the form that maintains them as a distinct genus (Ching, 1940; Copeland, 1947; Pichi Sermolli, 1977) and ii) the form that combines the *Paragramma* with *Lepisorus s.s.* (Holttum, 1954; Tagawa and Iwatsuki, 1989; Hennipman *et al.*, 1990; Hovenkamp, 1998). The key characters that Copeland

(1947) used to distinguish *Paragramma* from his *Pleopeltis* (i.e. including *Lepisorus s.s.*) were the combination of its soral shape and the presence of lamina scales. In Copeland's key to genera of Polypodiaceae, as well as in his description, he showed that *Paragramma* had elongated, oblong or linear-oblong sori and that its lamina was not covered by peltate scales, while his *Pleopeltis* generally had round or elongate sori or fused sori, but the elongate-sori species had peltate scales on the lamina.

It was observed from this study that *Paragramma longifolia* and *P. balteiformis* had round sori together with elongate sori. *Paragramma longifolia*, however, had glabrous lamina while few clathrate scales occurred on the lamina of *P. balteiformis*. Moreover, both elongate sori and few scales on the lower surface of lamina could have occurred in some *Lepisorus* species, for example *L. angustus* Ching, *L. subconfluens* Ching and *L. scolopendrium* Tagawa. So, the combination of lamina scales and soral shape could not be used to separate *Paragramma* from *Pleopeltis*. Accordingly, *Paragramma* could not also be separated from *Lepisorus* by using these characters.

The results of both CA and DA strongly indicated that *Paragramma* and *Neocheiropteris ensata* were not distinct from *Lepisorus s.s.*, so the genus *Paragramma* should be treated as a synonym of the genus *Lepisorus*. Likewise, *N. ensata* should be treated as a species of the genus *Lepisorus*. Furthermore, Fraser-Jenkins (1997) noted that *N. ensata* is a misapplied name of *N. ovata* (Fée) Fras.-Jenk. Bosman *et al.* (1998), however, recognized *N. ensata* as *Microsorum ensatum* (Thunb.) H. Itô, but also noted that their justification was based on a single specimen from Malesia. They also added that *M. ensatum* is probably a hybrid between a species of *Lepisorus* and a true *Microsorum* species.

The results from this study, therefore, strongly support the recognition of Tagawa and Iwatsuki (1989), Hennipman *et al.* (1990) and Hovenkamp (1998) that the circumscription of the genus *Lepisorus* must include *Paragramma*. In addition, the new finding is that *N. ensata* should be transferred to the genus *Lepisorus*.

Circumscription of Neocheiropteris *and* Platygyria

For *Platygyria*, three taxonomic positions have been recognized, i.e. combining with *Lepisorus s.s.* (Yu and Lin, 1997; C.R. Fraser-Jenkins, personal communication), treating it under *Neocheiropteris* (Ching, 1933; Hennipman *et al.*, 1990) and maintaining the status of distinct genus (Ching and Wu, 1980; Zhang *et al.*, 2003). Firstly, the *Platygyria* was proposed as a genus of *Polypodiaceae* by Ching and Wu in 1980 wherein the characters used to define this taxon were the globose sporangium and the very broad annulus consisting of scarcely indurate cell walls. Fraser-Jenkins (1997) had an opinion that *P. variabilis* should belong to *Lepisorus clathratus* (C.B. Clarke) Ching and the rest of *Platygyia* appeared to belong to *Phymatopteris* Pic. Serm. because according to him the type-species, *Platygyia waltonii*, is in fact a *Phymatopteris*, another genus of the

Polypodiaceae. However, the genus *Phymatopteris* is not recognized by Hennipman *et al.* (1990) and Smith *et al.* (2006). It was suggested that annulus characters are not constant (C.R. Fraser-Jenkins, personal communication), while Zhang *et al.* (2003) determined that they are rather stable. After studying *Platygyria* in comparison with *Lepisorus*, *Neocheiropteris* and *Paragramma*, it was found that the annulus characters were not only important in separating *Platygyria* from *Neocheiropteris*, but also from *Lepisorus* and *Paragramma*. However, when herbarium specimens were examined, we found that some specimens having both sporangia which were globose, having very broad annulus (≥ 105 μm) and few indurate cells of annulus (i.e. indurate cells of annulus 1-5 or less than 1/5 of annulus or absent) and sporangia which were flat or slightly flat, having narrow annulus (<100 μm) and prominent indurate cells (i.e. more than half of annulus are indurate cell). It was found from this study that these specimens were mixed with specimens of *Lepisorus clathratus* and were placed in the folder of *Lepisorus clathratus* complex. However, they should be separated from *L. clathratus* and put into the genus *Platygyria*.

In addition, the position of the stomium is an important character to distinguish the *Platygyria* from the rest. According to Wilson (1959), the annulus was the whole ring of cells horizontally encircling the capsule and interrupted at the point of attachment to the stalk. Most ferns had a row of indurate cells for the annulus, and this row were also interrupted by thin wall cells of epistomium, stomium and hypostomium. The stomium in most ferns could occur between the epi- and hypostomium, but it could not occur on the row of indurate cells of annulus. In *Platygyria*, however, the annulus cells are homogeneous or slightly homogeneous, and most or all annulus cells had thin walls. For these reasons, the position of the stomium in *Platygyria* could not be of constant occurrence as in other ferns and can be present throughout or slightly throughout the annulus.

The tuft of hairs dorsally attached to the rhizome scales has been given much weight by Ching (1933) and Tagawa and Iwatsuki (1989) as a characteristic of their *Neocheiropteris s.l.* Examinations of this characteristic found that these hairs could also be found in *Neocheiropteris palmatopedata*, *N. ensata* and *Platygyria waltonii*, but they were not found in the other *Platygyria* species. In addition, they could be found in some *Lepisorus* species, i.e. *L. kawakami* Tagawa, *L. macrosphaerus* Ching, *L. marginatus* Ching and *L. monilisorus* (Hayata) Tagawa. Thus, this characteristic could not be considered as a diagnostic characteristic of *Neocheiropteris*.

Moreover, according to both CA and DA, *Platygyria*, *Lepisorus s.l.* and *Neocheiropteris* were split into three distinct groups (Figs 1 and 2). These results were supported by the recognition of Ching and Wu (1980) and Zhang *et al.* (2003) in maintaining *Platygyria* as a distinct taxon. Therefore, the characteristics of the *Platygyria* were globose sporangia, very broad annulus (≥ 105 μm) and few indurate cells of annulus

(i.e. indurate cell of annulus 1-5 or less than 1/5 of annulus or absent). In addition, the circumscription of *Platygyria* should include the species or specimens that have similar characters.

Neocheiropteris palmatopedata, the type species and one of the two representatives of the genus *Neocheiropteris* in this study should be kept under *Neocheiropteris*. The striking characters that have never been used as key characters to distinguish it and the other taxa are pedatifid laminas and the presence of large veins at the lamina base. Also, the lamina width is between 147-376 mm while less than 100 mm lamina width found in the rest taxa. Thus the result is also supported by CA and DA.

Previously, *Lepisorus s.s.* (Ching, 1933, 1940), *Paragramma* (Ching, 1940; Copeland, 1947; Pichi Sermolli, 1977) and *Platygyria* (Ching and Wu, 1980; Zhang *et al.*, 2003) were recognized as separate genera by some pteridologists. Also, *Neocheiropteris* was recognized as a distinct genus from the genera above (Christ, 1905). The results were examined in terms of morphology and anatomy, and the two multivariate analyses of which can be proven to recognize that *Platygyria* was a distinct taxon from *Lepisorus*, *Neocheiropteris* and *Paragramma*. Moreover, *N. palmatopedata* should be put into a different group. On the other hand, the circumscription of *Lepisorus* should include *N. ensata* and *Paragramma*.

This study found ten important quantitative characters that could be used for splitting *Lepisorus* (including *N. ensata* and *Paragramma*), *N. palmatopedata* (here it is recognized as a monotypic genus) and *Platygyria* by including the annulus width, sporangium length, length of the fertile portion of lamina, lamina width, sorus length, ratio of lamina length and lamina tip length, ratio of lamina length and stipe length, number of sclerenchyma strand in rhizome, phyllopodia length, and sorus width. Some of these characters, including annulus width and lamina width, and some useful qualitative characters i.e. lamina indentation, prominent large vein at lamina base, occurrence of indurate cells and stomium position were used to construct a key to genera as below:

Key to genera

1a.	Annulus width ≥ 105 μm, indurate cell of annulus 1-5 or absent, stomium not constantly positioned on annulus (rarely not as above)	**Platygyria**
1b.	Annulus width ≤ 95 μm, indurate cell are more than half of annulus cells, stomium between the thin wall epi- and hypostomium	**2**
2a.	Lamina pedatifid, lamina width ≥ 120 mm, large vein at lamina base present	**Neocheiropteris**
2b.	Lamina margin entire or undulate, lamina width < 120 mm, large vein at lamina base absent	**Lepisorus** (including *Neocheiropteris ensata* and *Paragramma*)

Acknowledgements

The authors sincerely appreciate the efforts of anonymous reviewer who reviewed this manuscript. We are grateful to the curators or keepers of the following herbaria: BKF, BM, E, K, KUN, L and PYU, who allowed access to and facilitated the study of the herbarium specimens. Many thanks are due to Dr. M.C. Roos (L) and Dr. M.J. Zink for supplying the literatures. The first author would like to thanks Dr. Liu Ende (KUN), Dr. Xiangjingying (KUN), Prof. S.K. Wu (KUN), Dr. Zhao-Rong He (PYU), Dr. David J. Middleton (E), Dr. P. Hovenkamp (L), Dr. H.P. Nooteboom (L) and Miss Suchada Wongpakam for their help or suggestions, and the curator or keeper of TI, who gave some type-specimen images to him. This project was partially supported by the Center for Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity, CEB_D_9_2006, the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training, Grant T_249003, and the Commission on Higher Education, Thailand (the Cooperative Research Network - CRN).

References

Anonymous, 1999. SPSS for Windows release 10.0, Standard Version [Computer Program]. SPSS Inc., Chicago.

Bosman, M.T.M., Hovenkamp, P.H. and Nooteboom, H.P. 1998. *Microsorum. In:* Kalkman, C. and Nooteboom, H.P. (eds), Flora Malesiana. Rijksherbarium/Hortus Botanicus, Leiden, the Netherlands, pp. 90-133.

Ching, R.C. 1933. The studies of Chinese ferns IX. Bull. Fan. Mem. Inst. **4**(3): 47-113.

Ching, R.C. 1940. On natural classification of the family Polypodiaceae. Sunyatsenia **5**(4): 201-270.

Ching, R.C. and Wu, S.K. 1980. *Platygyria* Ching & S.K.Wu. a unique new genus of the Polypodiaceae from China. Acta Bot. Yunn. **2**(1): 67-74.

Ching, R.C., Lin, Y.X. and Wu, S.K. 1983. A taxonomic revision on *Lepisorus clathratus* (C.B. Clarke) Ching complex in Sino-Himalayan region. Acta Bot. Yunn. **5**(1): 1-23.

Christ, H. 1905. Les collections de fougeres de la Chine au Muséum d'histoire naturelle de Paris. Bull. Soc. Bot. France 52, Mém. **1**(1): 1-69.

Copeland, E.B. 1947. Genera Filicum. Chronica Botanica, Waltham, Massachusett, USA, pp. 1-247.

Fraser-Jenkins, C.R. 1997. New Species Syndrome in Indian Pteridology and the Ferns of Nepal. International Book Distributors, Dehra Dun, India, pp. 1-403.

Gower, J.C. 1971. A general coefficient of similarity and some of it properties. Biometrics **27**: 857-872.

Hennipman, E., Veldhoed, P. and Kramer, K.U. 1990. Polypodiaceae. *In:* Kubitzki, K. (ed.), The Families and Genera of Vascular Plants. 1. Springer Verlag, Berlin, pp. 203-230.

Holttum, R.E. 1954. A Revised Flora of Malaya II. Ferns of Malaya. Government Printing Office, Singapore, pp. 1-653.

Holmgrens, P.K. and Holmgrens, N.H. 2008. Index Herbariorum. <http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>. Retrieved on 11 December 2008.

Hovenkamp, P.H. 1998. *Lepisorus* in Malesia. Blumea **43**(1): 109-115.

Lin, Y.X., 2000. Polypodiaceae subfamily Lepisorioideae Ching. *In:* Lin, Y.X. (ed.), Flora Reipublicae Popularis Sinicae **6**(2). Science Press, Beijing, pp. 32-115.

Pichi Sermolli, R.E.G. 1977. Tentamen pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi. Webbia **31**(2): 313-512.

Shieh, W.C., Devol, C.E. and Kuo, C.M. 1994. Polypodiaceae. *In*: Hsieh, C.F., Huang T.C., Keng, H., Shieh, W.C, Tsai, J.L., Hu, J.M., Shen, C.F., Yang, K.C. and Yang, S.Y. (eds), Flora of Taiwan (Pteridophyta and Gymnospermae). Vol. **1**. Sandos Chromagraph Printing Company, Ltd, Taipei, pp. 469-519.

Smith, A.R., Pryer, K.M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., and Wolf, P.G. 2006. A classification for extant ferns. Taxon **55**(3): 705-310.

Tagawa, M. and Iwatsuki, K. 1989. Pteridophytes. *In:* Smitinand, T. and Larsen, K. (eds), Flora of Thailand **3**(4). Chutima Press, Bangkok, pp. 481-639.

Verdcourt, B. 2001. Polypodiaceae. *In:* Beentje, H.J. and Smith, S.A.L. (eds), Flora of Tropical East Africa. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 1-37.

Wilson, K.A. 1959. Sporangia of the fern genera allied with *Polypodium* and *Vittaria*. Contr. Gray Herb. **185**: 97-127.

Yu, S.L. and Lin, Y.X. 1997. A study on systematics of genus *Lepisorus* (Polypodiaceae). Acta Phytotax. Sin. **35**(4): 341-347.

Zhang, X.C., Liu, Q.R. and Xu, J. 2003. Systematics of *Platygyria* Ching & S.K.Wu (Polypodiaceae). Acta Phytotax. Sin. **41**(5): 401-415.

Zink, M.J. 1993. Systematics of the fern genus *Lepisorus* (J.Sm.) Ching (Polypodiaceae-Lepisoreae), with special reference to Africa and including and annotated list to all names published so far. PhD dissertation, Universität Zürich, Zürich, pp. 1-147.

(Manuscript received 13 March 2008; revised on 17 December 2008)

Appendix I. A list of representative specimens of each species examined.

-Lepisorus amaurolepidus (Sledge) Bir & Trikha: Fraser-Jenkins et al. 24 (Ceylon); Jarrett 673 (India); Manickam 606 (India). ***-L. annuifrons*** (Makino) Ching: Faurie 5252 (Japan); Kano et al. 26 (Japan); Makino s.n. (Japan). ***-L. bampsii*** (Pic. Serm.) M.J. Zink (= ***L. excavatus*** Ching): Bamp 2962 (Rwanda). ***-L. bicolor*** (Takeda) Ching: Duclaux 5044 (China); Henry 2465 (China); Maxwell 94-1025 (Thailand). ***-L. boninensis* (Christ) Ching**: Tuyama 512 (Japan); Warburg s.n. (Japan). ***-L. clathratus*** (C.B. Clarke) Ching: Chola Rangle 4300 (India); Cischison183 (Afghanistan); Ludlow et al. 17223 (Bhuthan). ***-L. contortus*** (Christ) Ching: Fleming 879 (Nepal); Henry 6869 (China); Zimmerman 396 (Nepal). ***-L. eilophyllus*** (Diels) Ching: Henry 6859 (China); Purdom 90 (China); Wilson 2636 (China). ***-L. elongatus*** (Kaulf.) Ching: Gaudichaud s.n. (Sandwich Island); Hildebrand 18 (Hawaii). ***-L. excavatus*** (Bory ex Willd.) Ching: Burger 505 (Ethiopia); Ghose 39 (China); Pichi Sermolli 6793 (Ethiopia). ***-L. jakonensis*** (Blanf.) Ching (= ***L. pseudonudus*** Ching): Blanford 354 (India), s.n. (India). ***-L. mehrae*** Fraser-Jenk.: Datta 23475 (India); Steward 1494 (India). ***-L. kawakami*** (Hayata) Tagawa: Faurie s.n. (China); Tagawa 47 (China). ***-L. kuchenensis*** (Y.C. Wu) Ching: Cadiére 1126 (Indochina); Colani 2829 (Vietnam); Poilane 17045 (Vietnam). ***-L. lewisii*** (Baker) Ching: Henry 9194B (China); Shearer s.n. (China); Tsang 23481 (China). ***-L. loriformis*** (Wall. ex Mett.) Ching: C.B.Clarke 12947 (India); Fleming 1734 (Nepal), Wallich 271 (Nepal). ***-L. macrosphaerus*** (Baker) Ching: Cavalerie 3748 (China); Duclaux 3352 (China); Poilane 26824 (Vietnam). -

L. manus Hovenkamp: De Wilde & De Wilde-Duyfjes 1305 (Indonesia); Otto-Surbeck 365 (Indonesia); Surbeck 644 (Indonesia). ***-L. marginatus*** Ching: Zhang 1 (China). ***-L. megasorus*** (C.Chr.) Ching: Hancock 31 (China); Poilane 5113 (Indochina). ***-L. mildbraedii*** (Hieron.) Pic.Serm. (= ***L. excavatus*** Ching): Le Walle 1284 (Burundi), 2442 (Burundi); Taton 270 (Congo-Belge). ***-L. monilisorus*** (Hayata) Tagawa: Chang 4400 (Taiwan); Faurie 475 (China), 594 (China). ***-L. morisonensis*** (Hayata) H.Ito: Tagawa 417 (China). ***-L. nudus*** (Hook.) Ching: Ballard 1035 (Ceylon); Dharmsani 2028 (Nepal); Stewart 21047 (India). ***-L. obscure-venulosus*** (Hayata) Ching: Faurie 472 (China); Poilane 25575 (Indochina); Shimizu & Chuang 20418 (Taiwan). ***-L. oligolepidus*** (Baker) Ching: Cavalerie 34 (China); Henry 2049 (China); Matthew 31 (China). ***-L. onoei*** (Franch. & Sav.) Ching: Iwatsuki 1540 (Japan); Iwatsuki et al. 5566 (Japan); Ohba 662598 (Japan). ***-L. preussii*** (Hieron.) Pic.Serm.: Brunt 764 (Cameroon); Chapman 62 (Nigeria); Saxer 13 (Cameroon). ***-L. pseudonudus*** Ching: Luo 237(64) (China); Wilson 2633 (China). ***-L. pseudo-ussuriensis*** Tagawa: Faurie 591(China), 644 (China); Tagawa s.n. (China). ***-L. schraderi*** (Mett.) Ching: Chase 6568 (Rhodesia); Loveridge 392 (Uganda); Pichi Sermolli, P. 5141 (Tanzania). ***-L. scolopendrium*** (Ching) Mehra & Bir: Gamble 8212 (India); Hancock 104 (China); Smitinand et al. 1744 (Thailand). ***-L. sesquispedalis*** (J.Sm.) Fraser-Jenkins (= ***L. scolopendrium*** (Ching) Mehra & Bir): Chola Rangle 4399 (India); Duthie 5183 (India); Kari 176 (China). ***-L. subconfluens*** Ching: Hennipman 3141 (Thailand); Rock 8727 (China); Snitinand 4667 (Thailand). ***-L. sublinearis*** (Baker ex Takeda) Ching: Hancock 83 (China); Henry 9062A (China); Tagawa et al. 2878 (Thailand). ***-L. thunbergianus*** (Kaulf.) Ching: Cox et al. 198 (China); Taquet 3656 (Korea); Wilson 53179 (China). ***-L. tosaensis*** (Makino) H.Ito: Tagawa & Iwasuki 3716 (Japan). ***-L. ussuriensis*** (Regel & Maack) Ching: Furuse 7138 (Japan); Komrov 46 (China); Tagawa 764 (Japan). ***-Neocheiropteris ensata*** Ching: Tagawa and Iwasuki 539 (Japan); Gustav Mann. s.n. (India); Tagawa,Togashi and Kanoi s.n. (Japan). ***-N. palmatopedata*** Christ: Beauvais 830 (China); Chang 808 (China); Kokonor Tibet complex expedition 13339 (China); Qin 83 (China). ***-Paragramma balteiformis*** (Brause) Hovenkamp: Brass 23289 (Papua New Guinea), 12075 (Papua New Guinea). ***-P. longifolia*** (Blume) T. Moore: Boonkerd 1191 (Thailand); Cadière 791 (Vietnam); Edano 35625 (Philippines). ***-Platygyria inaequibasis*** Ching & S.K.Wu: Li & Wang 20658 (China); Wu et al. 75-771 (China); Zhang (Dian team) 1753 (China). ***-P. soulieana*** (Christ) X.C. Zhang & Q.R. Liu: Delavay 207/1 (China); Li 3 (China). ***-P. variabilis*** Ching & S.K.Wu: Ching 23475 (China); Chu & Feng, 747 (China); Sykes & Williams 3503 (Nepal). ***-P. waltonii*** (Ching) Ching & S.K.Wu: Littledale s.n. (China); Tibetean team 74-3626 (China); Walton s.n.(China).

Appendix II. A list of 26 quantitative characters with unit or character states used in the study of *Lepisorus* and its related genera.

Abbreviation	Characters
RHDM	rhizome diameter in mm
RHSI	shortest rhizome internode length in mm
RHLI	longest rhizome internode length in mm
NM	number of meristele in rhizome
NSSR	number of sclerenchyma strand in rhizome
RSLE	rhizome scale length in mm
RSWI	rhizome scale width in mm
STL	stipe length in mm
STD	stipe diameter at the middle of its length in mm
PHL	phyllopodia length in mm
PHD	phyllopodia diameter at the middle of their length in mm
LL	lamina length in mm
LW	lamina width in mm

Abbreviation	Characters
LASL	length of the apical sterile portion of lamina in mm
SL	sorus length in mm
SW	sorus width in mm
LFPL	length of the fertile portion of lamina in mm
SPOL	sporangium length in μm
SPOW	sporangium width in μm
AW	annulus width in μm
SPL	spore length in μm
SPW	spore width in μm
STPH	ratio of stipe length and phyllopodium length
LLST	ratio of lamina length and stipe length
LLLT	ratio of lamina length and lamina tip length
LLLF	ratio of lamina length and length of fertile portion

Appendix III. A list of 27 qualitative characters with unit or character states used in the study of *Lepisorus* and its related genera.

Abbreviation	Characters
RHS	rhizome surface: not glaucous (0), glaucous and not glaucous (1), glaucous (2)
RSA	apex of rhizome scale: obtuse (0), obtuse and acute (1), acute and acuminate (2), filiform (3)
RSB	base of rhizome scale: obtuse and round (0), obtuse and round and cordate (1), cordate (2)
RSM	margin of rhizome scale: entire (0), entire, dentate and denticulate (1), dentate and denticulate (2)
RSS	shape of rhizome scale: lanceolate and triangular and ovate (0), circular, lanceolate, triangular and ovate (1)
RSCL	clathrate appearance of rhizome scale: clathrate throughout (0), center clathrate with non clathrate margin (1), center clathrate with non clathrate margin, and center opaque with clathrate or non clathrate margin (2), center opaque with clathrate and non clathate margin (3)
RSOR	orientation of rhizome scale: appressed (0), appressed and slightly spreading (1), slightly spreading (2), strongly spreading (3)
RSCO	colour of rhizome scale: one colour (0), one and two colours (1), two colours (2)
RSAT	attachment type of rhizome scale: all scale basifixed (0), pseudopeltate, basifixed and peltate (1), all scale peltate (2)
RSUS	appearance of hairs on upper surface of rhizome scale: absent (0), present (1)
RSL	lobe of rhizome scale: absent (0), present (1)
RSIP	insertion point of rhizome scale: at base and close to base more than apex (0), at base, at the middle and close to base more than apex (1)
LI	lamina indentation: margin entire and undulate (0), auriculate (1), hastate and pedatifid (2)
LA	lamina apex: acute (0), acute and acuminate (1), acute, acuminate, obtuse and round (2), acute, obtuse and round (3), acuminate (4), acuminate, obtuse and round (5), obtuse and round (6)
LT	lamina texture: membranaceous and chartaceous (0), membranaceous, subcoriaceous and coriaceous (1), subcoriaceous and coriaceous (2)
ABL	abaxial surface of lamina: lamina glabrous (0), lamina covered by few to low density of scales near the base or near midrib or on midrib (1)
ADL	adaxial surface of lamina: lamina glabrous (0), lamina glabrous and covered by few to moderate density of scales near lamina base or near midrib or on midrib (1)
LPL	longitudinal posture of lamina margin : flat (0), slightly revolute (1), strongly revolute (2)

Abbreviation	Characters
LV	veins or lateral vein prominence on abaxial surface of lamina: inconspicuous (0), inconspicuous and conspicuous (1), conspicuous (2)
LBS	symmetry of lamina base: symmetric and nearly symmetric (0), present both symmetric and asymmetric base (1)
SODBA	sori distribution between lamina base and apex: only on upper half (0), on upper half and reaching to the lower half (1); only on lower half (2)
SORN	sorus row number between midrib or rachis, and the margin: one row (0), one row and more than one row (1), more than one row (2)
SOPO	sorus position between midrib and frond margin: only at the middle (0) at the middle to close to midrib (1); at the middle to close to the margin (2), close to midrib to close to the margin (3), only close to the midrib (4); only close to the margin (5)
SOR	sori orientaion when compare with the closest midrib: not oblique (0), present both oblique and not oblique sori (1), oblique (2)
STOP	stomium position: at the position between the thin wall epi- and hypostomium (0), not constantly positioned on annulus (1)
INDC	occurrence of indurate cells: more than half of annulus are indurate cells (0), indurate cell of annulus 1-5 or less than 1/5 of annulus or absent (1)
BALV	large vein at lamina base: absent (0), present (1)

ลำดับที่ 17

The Natural History Journal of Chulalongkorn University 9(1): 85-89, April 2009
©2009 by Chulalongkorn University

Short Note
Dendrobium hirsutum Griff. (Orchidaceae), a New Recorded Species from Northeastern Thailand

APIRADA SATHAPATTAYANON[1,2], TOSAK SEELANAN[1,2*] AND TOMOHISA YUKAWA[3]

[1]*Biological Science Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*
[2]*Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*
[3]*Tsukuba Botanical Garden, National Museum of Nature and Science, 1-1, Amakubo 4, Tsukuba 305-0005, Japan*

***Dendrobium hirsutum* Griff. was collected from Phu Luang Wildlife Sanctuary, Loei Province, northeastern Thailand. This is the first record for the country and the species is described and illustrated. This finding increases the taxonomic data for the Orchids Flora of Thailand Project.**

Dendrobium Sw. section *Formosae* (Benth. & Hook. f.) Hook. f. is comprised of about 55 species and occurs from the Himalayas to the Philippines and Sulawesi (Sathapattayanon, Yukawa and Seelanan, unpublished). Seventeen species of the section were enumerated from Thailand[1]. It is believed that section *Formosae*, formerly called section *Nigrohirsutae* (Lindl.) Schltr., can be distinguished from the other *Dendrobium* sections by the presence of blackish hairs on the leaf blades and leaf sheaths. However, several species from the Philippines and Borneo do not present this character. In fact, only the hard-textured flowers with white, greenish or yellow perianth lobes characterize the section[2]. Phylogenetic analyses of *Dendrobium* based on molecular data also indicated the polyphyly of section *Formosae*[3].

In the course of revisionary work of the *Dendrobium* section *Formosae* for the Orchids Flora of Thailand Project, we found that three *Dendrobium* specimens, from northeastern Thailand, were similar to *D. longicornu* Lindl[4]., although there is no previous record of this species from Thailand[1,5].

This study was based on three specimens collected from the Phu Luang Wildlife Sanctuary, Loei Province, northeastern Thailand. Determinations of identification were made with the help of the keys to species of the *Dendrobium* section *Formosae* by Seidenfaden[1,6] and Pradhan[7]. The original descriptions of relevant species were reviewed for further identification. For comparison, we also examined herbarium materials deposited at AAU, BCU, BM, BR, C, E, K, L, P, TNS and W[8].

SYSTEMATICS

All morphological characters of the *Dendrobium* specimens from Phu Luang roughly matched with those of *D. longicornu* in the keys provided by Seidenfaden (1992)[6] and Pradhan (1979)[7]. However, several features are different from

*Corresponding author:
E-mail: tosak.s@chula.ac.th

the protologue and type specimens of *D. longicornu*. We found that the Thai specimens agree very well with the original description and type specimen of *D. hirsutum* Griff.[9,10] described from Assam, India. Previously *D. hirsutum* has been interpreted as a synonym of *D. longicornu* because they have a similar floral morphology. The flowers are white with yellowish orange or yellow veins on the labellums and the mentums are narrowly conical. However, *D. hirsutum* is characterized by its widely obovate petals, transversely oblong and serrate mid-lobe of the labellum, whilst *D. longicornu* has lanceolate petals, ovate and fimbriate mid-lobe of the labellum. A taxonomic revision of this latter species complex will be published elsewhere (Sathapattayanon, Yukawa and Seelanan, in preparation).

We thus confirm that *Dendrobium hirsutum* Griff. is newly recorded for Thailand and the description, based on these Thai materials, is given below.

Dendrobium hirsutum **Griff.**

(Fig. 1)

Dendrobium hirsutum Griff., Not. Pl. Asiat. 3: 318, 1851; Icon. Pl. Asiat. 3: t. 305, 1851; Rchb.f., Gard. Chorn. 18: 488, 1884. Type: India, Assam, Khasia Mountain, Churra Ponjee, *Griffith s.n.* (holotype K-LINDL!) — *Dendrobium longicornu* var. *hirsuta* (Griff.) Hook.f., Fl. Brit. India 5(2): 720, 1890.

Flowering shoots erect, slender, cylindrical, green or light green, 31-48 cm long, internodes 2.9-4.4 cm long, 0.4-0.7 cm in diameter, more or less sulcate, leafy at the upper part of stem. *Foliage leaves* distichous, thinly coriaceous, spreading or slightly recurved, green or dull green, lanceolate or narrowly elliptic, 7.5-8.2 cm long, 1.2-1.8 cm wide, apex unequally bi-lobed, each lobe acute, mid-vein grooved above and ribbed below, young leaves covered with dense, black, hirsute hairs, adaxial surface of mature leaf becoming glabrous, more or less waxy, abaxial surface sparsely with short, black, hirsute hairs, becoming glabrous with age; leaf-sheaths 2.5-3.8 cm long, covered with caducous black hairs. *Inflorescences* abbreviated, solitary or 2-flowered, subterminal on leafy stem, raising from the base of leaf-sheaths opposite the blades; peduncle and rachis light green, 0.3-0.5 cm long, glabrous; floral bracts greenish brown or brown, oblong or elliptic-oblong, concave, 0.5-0.6 cm long, 0.3-0.4 cm wide, apex acuminate, abaxial surface covered with scattered black hairs, 3- to 5-veined. *Flowers* papyraceous, resupinate, unscented, up to 2.3-3.1 cm in diameter, veins obscured, visible when aged. *Sepals* white, spreading, slightly recurved at distal part, margin entire, abaxial surface waxy with distinct keel, wing-like at apex; dorsal sepal ovate or oblong-ovate, 1.5-1.9 cm long, 0.9-1.0 cm wide, apex acuminate, 6- to 7-nerved; lateral sepals obliquely oblong-triangular, posterior margin 1.9-2.1 cm long, anterior margin 3.5-4.3 cm long, 1.0-1.1 cm wide at base, apex acuminate, 7- to 8-nerved. *Mentum* white or pale orangish white from outside, narrowly conical, straight, 2.4-2.7 cm long, 0.3-0.5 cm in diameter at base, 0.2-0.4 cm in diameter at apical part, apex obtuse. *Petals* white, obovate or widely obovate or elliptic, spreading, slightly recurved, 1.8-2.0 cm long, 0.9-1.3 cm wide, apex obtuse, margin entire, 10- to 12-nerved. *Labellum* 3-lobed, 4.0-4.4 cm long, 2.6-3.0 cm wide across side lobes; claw orange, narrowly triangular, 1.4-1.6 cm long; side lobes white with creamy or yellowish orange or yellow

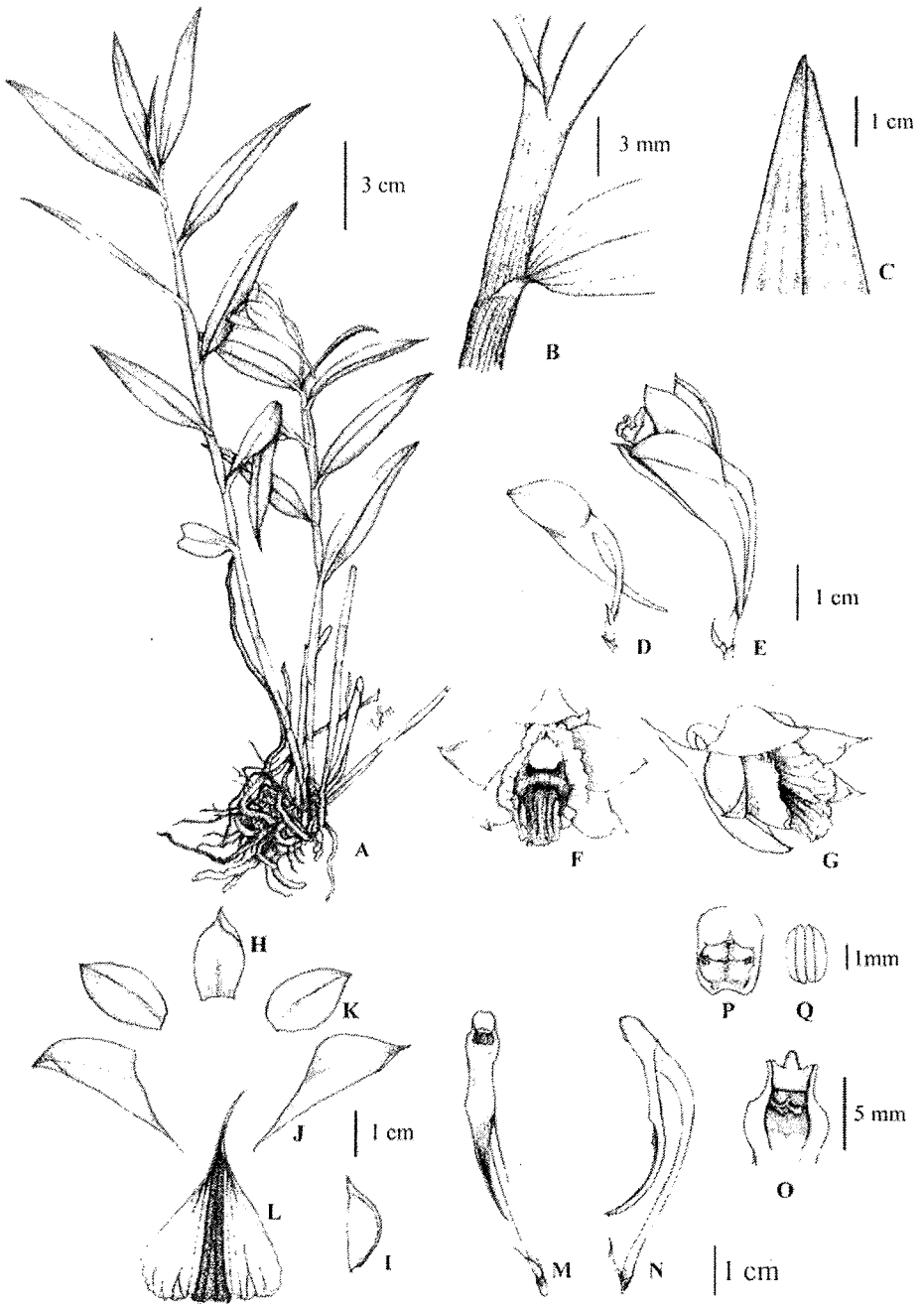


FIGURE 1. *Dendrobium hirsutum* Griff. **A.** Whole plant; **B.** Blackish hairs on leaf blades and leaf sheaths; **C.** Leaf apex; **D.** Unopened flower, side view; **E.** Flower, side view; **F.** Flower, front view; **G.** Flower, oblique view; **H.** Dorsal sepal; **I.** Side view of dorsal sepal, note the abaxial keel on surface; **J.** Lateral sepal; **K.** Petal; **L.** Labellum; **M.** Column and column foot, from below; **N.** Column and column foot, side view; **O.** Apical part of column, anther cap excised; **P.** Anther cap; **Q.** Pollinia. All line drawings were drawn by Mr. Yotsawate Sirichamorn from *W. Wichainsin et al. s.n.*

veins on adaxial surface, obliquely ovate or

obliquely elliptic, apex obtuse, margin crenate and slightly undulate, 6- to 7-slightly elevated veins running along each side lobe, each vein covered with short hair-like callus along distal half; disc thickening, narrowly oblong, smooth, becoming 3-keeled with hair-like callus at distal end; mid-lobe white or yellowish orange, transversely oblong, 0.3-0.5 cm long, 0.6-0.9 cm wide, apex 2-lobed or indistinctly 2-lobed, margin serrate or irregularly lobed, 2 to 4 yellowish orange veins, bearing hair-like callus, continuing from side lobes and 3 yellowish orange keels, bearing hair-like callus, continuing from disc. *Column* white or very pale orange, 3.5-4.0 mm long, 3.0-4.0 mm wide; foot orange or yellowish orange, slightly concave, tapering downwards to narrowly conical mentum, 8.8-9.2 mm long, minutely papillose; stigmatic cavity white or ivory white, elliptic; stelidia triangular; connective narrowly triangular; anther cap white, obovate, 2.5-3.0 mm long, 2.2-2.7 mm wide, apex rounded or truncate, basal margin ciliate, surface very minutely papillose, adaxial surface sulcate; pollinia 4, yellow, each pollinium narrowly elliptic, without caudicle and visidium. *Pedicellate ovary* white or greenish white, narrowly clavate, curved, 3.0-3.3 cm long, glabrous, somewhat waxy with 6-grooves. *Capsule* not seen.

Thailand.— NORTHEASTERN: Loei [Phu Luang Wildlife Sanctuary, 12 Nov. 1998, *W. Wichainsin s.n.* (transparency slides, BCU); Phu Luang Wildlife Sanctuary, 29 Oct. 1999, *W. Wichainsin et al. s.n.* (spirit specimen, BCU); Phu Luang Wildlife Sanctuary, 20-28 Oct. 2000, *W. Wichainsin s.n.* (spirit specimen, BCU)].

Distribution.— China, India, Myanmar, Laos and Vietnam.

Ecology.— The plants grow on muddy rocks near Huay Loei Nga Stream, in lower montane coniferous forest, at an altitude of 1,200-1,300 m a.m.s.l. Flowering period: October to November.

Note.— *Dendrobium hirsutum* was first discovered and described by William Griffith[9]. On the basis of data from herbarium specimens, the species is widely distributed from India through southern China, Myanmar, Laos to northern Vietnam. This orchid species occurs from 1,000 to 1,800 m above mean sea level. Therefore, the distribution of *D. hirsutum* in northeastern Thailand is not surprising, but it seems likely that this species is rare and only three specimens were collected from the same location.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was kindly supported by 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund, Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund, Graduate School, Chulalongkorn University (3000047) and also supported by the Thai government budget 2006, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity and the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University (CEB_D_10_2006). The first author also would like to thank the Collaborative Research Network (CRN) of Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand for financial support, in part. Our thanks are due to Colonel Wipas Wichainsin for his valuable specimens and Mr. Chadchai Prammaharach for his suggestions in field collecting. Our thanks are also extended to Mr. Kazuhiro Suzuki for his skillful cultivation of this species complex used in morphological comparison, to Mr. Yotsawate Sirichamorn

for the line drawing and to Ms. Suchada Wongpakam for improving the manuscript. We are indebted to the directors and curators of AUU, BCU, BM, BR, C, E, K, L, P, TNS and W for making their collections available for study. We would like to thank Dr. Obchant Thaithong for her comments on the manuscript, Dr. Jeffrey J. Wood and Mr. André Schuiteman for their suggestions on the type specimen citation.

LITERATURE CITED

1. Seidenfaden, G. 1985. Orchid Genera in Thailand XII, *Dendrobium* Sw., Opera Botanica, vol. 83. Copenhagen, 295 pp.
2. Yukawa, T. 2004. Two species of *Dendrobium* section *Formosae* (Orchidaceae) from Vietnam. Annals of the Tsukuba Botanical Garden, 23: 21-27.
3. Wongsawad, P., Handa, T. and Yukawa, T. 2005. In: Nair, H. and J. Arditti (Eds), Molecular phylogeny of *Dendrobium Callista-Dendrobium* complex. Proceedings of the 17th World Orchid Conference, Shah Alam, Malaysia, 131-133.
4. Lindley, J. 1830. *Dendrobium longicornu*. In: Edwards, S.T. (Ed), Edwards's Botanical Register, vol. 16. James Ridgway, London.
5. Thaithong, O. 1999. Orchids of Thailand. Bangkok, Office of Environmental Policy and Planning, 239 pp.
6. Seidenfaden, G. 1992. The Orchids of Indochina. Opera Botanica, vol. 114. Copenhagen, 460 pp.
7. Pradhan, U.C. 1979. Indian Orchids: Guide to Identification and Culture, vol. 2. Kalimpong, India, 557 pp.
8. Holmgren, P.K., Keuken, W. and Schofield, E.K. 1981. Index Herbariorum. Utrecht, The Netherlands, 452 pp.
9. Griffith, W. 1851. Notulae ad Plantas Asiaticas, vol. 3. Bishop's College Press, Calcutta.
10. Griffith, W. 1851. Icones Plantarum Asiaticarum, vol. 3. Bishop's College Press, Calcutta.

Received: 28 October 2008
Accepted: 7 December 2008

ลำดับที่ 18

Zoological Studies **49**(5): 640-650 (2010)

Zoological Studies

Distribution of the Big-Headed Turtle (*Platysternon megacephalum*, Gray 1831) in Thailand

Kruewan Pipatsawasdikul[1], Harold K. Voris[2], and Kumthorn Thirakhupt[3,*]

[1]*Inter-department of Environmental Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand*
[2]*Department of Zoology, Field Museum of Natural History, 1400 South Lake Shore Drive, Chicago, IL 60605, USA*
[3]*Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand*

(Accepted March 31, 2010)

Kruewan Pipatsawasdikul, Harold K. Voris, and Kumthorn Thirakhupt (2010) Distribution of the big-headed turtle (*Platysternon megacephalum*, Gray 1831) in Thailand. *Zoological Studies* **49**(5): 640-650. The distribution of the big-headed turtle *Platysternon megacephalum*, Gray 1831 in Thailand was studied from Dec. 2006 to Apr. 2009. Mountain streams of protected and unprotected areas throughout Thailand, except in the southern peninsular region, were ground surveyed. This study confirms the occurrence of *P. megacephalum* in 1 new and 9 previously reported river basins in the northeastern part of Thailand. Among these, 22 new localities at elevations of 430-1350 m were reported. Most *P. megacephalum* individuals were found at night in small, often rapidly flowing mountain streams in dry dipterocarp and montane rainforests. The water temperature of these streams ranged 15.5-20.3°C ($\bar{X}$ = 19.04 ± 2.10°C, n = 33), pH values ranged 5.32-8.07, and water depths were 14.0-95.0 cm ($\bar{X}$ = 41.67 ± 25.30 cm, n = 33). The turtles appeared to be most abundant at elevations of 630-720 m. *Platysternon megacephalum* populations face serious threats from habitat loss, human consumption, and commercial harvest of turtles. This species urgently needs an aggressive conservation program to ensure its survival. http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/49.5/640.pdf

Key words: *Platysternon megacephalum*, big-headed turtle, distribution, Thailand.

The big-headed turtle *Platysternon megacephalum* is one of 5 endangered turtles and tortoises in Thailand (Nabhitabhata and Chan-ard 2005). It is classified as an endangered species on the *IUCN Red List* (2008) due to threats posed by habitat degradation and by hunting and trapping for consumption related to traditional Chinese medicine, for the pet trade, and for ex *situ* captive breeding programs (van Dijk and Palasuwan 2000). This small to medium-sized turtle is best known for its huge head that cannot be withdrawn into its shell and a long tail (Burnie and Don 2001).

The geographic range of *P. megacephalum* includes southern China and mountainous areas of Vietnam, Laos, Cambodia, Thailand, and Myanmar (Ernst and Barbour 1989, Bonin et al. 2006). In Thailand, the 1st records of *P. megacephalum* were from Mae Hong Son, Phetchabun, Chaiyaphum, and Kanchanaburi Provinces (Gairdner 1915). Later, Wermuth (1969) extended the range to Chiang Mai Province while Taylor (1970) confirmed that the species had been taken in Chiang Mai, Loei, and Kanchanaburi Provinces (a map showing the provinces of Thailand can be found at http://en.wikipedia.org/wiki/ Provinces of Thailand). This range was later extended to include Skon Nakhon Province (Nutaphand 1979, Humphrey and Bain 1990) and also new sites in Lampang (Unakornsawas 1995) Tak, and Kanchanaburi Provinces (Thirakhupt and van Dijk 1995). Thus, Nabhitabhata and Chan-ard (2005) summarized the species distribution in Thailand as including

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Tel: 66-2-2185259. Fax: 66-2-2185260.
E-mail:kumthorn.t@chula.ac.th

Chiang Mai, Mae Hong Son, Loei, Phetchabun, Chaiyaphum, Kanchanaburi, Phrae, and Tak Provinces.

From the above published reports, this species has been found in ten of the 25 main river basins of Thailand: Mae Nam Salawin, Mae Nam Ping, Mae Nam Kok, Mae Nam Wang, and Mae Nam Yom in the north, Mae Nam Pasak in the center, Mae Nam Khong Mae Num Moon and Mae Nam Chi in the northeast, and Mae Nam Mae Klong in the west.

Prior to this study, our knowledge of the distribution and status of this species was somewhat limited and out of date. The purpose of this study was to explore the present-day distribution of and habitat use by *P. megacephalum* in Thailand and to provide baseline data required for conservation decisions. To this end, we surveyed mountain streams throughout non-peninsular Thailand, compiled literature and museum records, and conducted a questionnaire survey.

MATERIALS AND METHODS

Museum surveys

Specimen data records for *P. megacephalum* from Thailand were requested from numerous major museums. Museum collections containing *P. megacephalum* specimens from Thailand were as follows: American Museum of Natural History (AMNH), NY, USA; Chulalongkorn Univ. Museum of Zoology (CUMZ), Bkk, Thailand ; Field Museum of Natural History (FMNH), Chicago, IL, USA; Florida Museum of Natural History (FLMNH), Gainesville, FL, USA; Institute and Natural History Museum (SMF), Senckenberg, Germany; Museum of Comparative Zoology, Harvard Univ. (MCZ), Cambridge, MA, USA; Museum of Zoology, Univ. of Michigan (UMICH), Ann Arbor, MI, USA; Natural History Museum & Biodiversity Research Center, Univ. of Kansas (KU), Lawrence, KS, USA; Natural History Museum (NHMB), Basel, Switzerland; Thailand Natural History Museum (THNHM), PT, Thailand; The Natural History Museum (BMNH), London, UK; Smithsonian Institution, National Museum of Natural History (USNM), Washington DC, USA; and Zoological Museum, Univ. of Copenhagen (ZMUC), Denmark. Catalog information, including locality data, from each reference specimen was assessed and then used along with the results of the questionnaire survey to plan the ground surveys.

Questionnaire surveys

An initial survey concerning *P. megacephalum* was conducted by mailing 263 brief questionnaires to local forestry offices within Thailand. The offices included national parks, sanctuary units, wildlife research units, and non-hunting units of the national parks, the Wildlife and Plant Conservation Department, and the fisheries offices of the Department of Fisheries, throughout Thailand with the exception of the southern peninsula which lies well outside this turtle's known range. The results of the survey were gathered over a 1-yr period (2006-2007) and they were used to identify localities that merited ground surveys. In addition, based on other informal reports and personal communications, several other parks, sanctuaries, and unprotected areas were surveyed for *P. megacephalum*. The survey questions were in the Thai language and primarily sought knowledge of 1st-hand observations of the big-headed turtle.

Ground surveys

From Dec. 2007 to Apr. 2009, intensive investigations were carried out in areas about which we had positive sighting information. To gain positive confirmation sightings of *P. megacephalum*, we drew upon the knowledge and experience of local hunters and forest rangers who spend at least some of their time in the field. Photographs of the big-headed turtles were used to insure good communication with local rangers, and advice was sought as to which catchments were thought to have turtles. Night surveys were conducted between 19:00 and 24:00 on mountain streams that had been identified. The survey team consisted of one of us (KP), a team of 3 or 4 from the Chiang Dao Wildlife Research Station, and several local rangers. In addition, in some cases, several local villagers joined the search. The search included stream banks, stream riffles and pools, and areas under large rocks and logs within the stream. In addition, some streams were searched during daylight hours. At each location, up to 5 night surveys were conducted per stream depending on sightings. Surveys at a site were discontinued as soon as 1 *P. megacephalum* was observed.

When an animal was observed, it was captured and ecological and morphological data were recorded. Straight-line measurements of

each specimen were taken with dial calipers accurate to 0.1 mm for the carapace length (CL), carapace width (CW), plastron length (PL), plastron width (PW), head length (HL), and tail length (TL).

To assess the overall range of *P. megacephalum* in Thailand, locations of all recent findings were plotted on a map which includes river basins (Fig. 1). In presenting the detailed locality data in figure 1, we have carefully considered both the practical and ethical implications raised by Fong and Qiao (2010). We recognize that there is a risk of the data being used to facilitate exploitation, but because many of the same localities are already published (e.g., Fong and Qiao 2010) or accessible on the Internet (e.g., the EMYS system), we have decided to provide the information to further advance turtle research.

RESULTS

Museum surveys

In total, collection localities of 29 museum specimen records were reviewed. Eight of the 29 specimens were recorded as coming from Thailand, without additional locality details (Table 1). One locality record simply consisted of Laotian mountains. The remaining specimens had detailed location data within Thailand and are shown in figure 1.

Questionnaire surveys

Of the 263 questionnaires distributed, 111 (42.2%) were completed and returned. Of these 111 responses, 63 (~57%) reported some evidence of *P. megacephalum* in their region. Positive reports came from 18 provinces and included 11 of the 25 river basins of Thailand. Each area that had a positive response was visited, and ground surveys were conducted to attempt to verify the current presence of *P. megacephalum*.

Ground surveys

In total, 40 locations were surveyed. At 6 locations, no turtles were observed. At 34 of the 40 locations, *P. megacephalum* was observed within streams. This survey documents that *P. megacephalum* is widely distributed in the same 9 previously reported river basins (Mae Nam Salawin, Mae Nam Ping, Mae Nam Kok, Mae Nam Wang, and Mae Nam Yom in the north; Mae Nam Khong and Mae Nam Chi in the northeast; Mae Nam Pasak in the center; and Mae Nam Mae Klong in the west) plus 1 new river basin (Mae Nam Nan in the north).

Most of these turtles were observed in streams during dry periods between Nov. and Apr. They were observed both at night and during the day, and although nearly all were collected under water, a few were observed resting above the water line on a log or rock within the streambed. Based on the results of this study, *P. megacephalum* was found in 22 new localities in 10 river basins in Thailand (Table 1). *Platysternon* is found in Thailand as far north as the Fang District, Chiang Mai Province in the Mae Nam Kok river basin (20°3'30.6"N, 99°7'14.7"E) and as far south as the Thong Pha Phum District, Kanchanaburi Province in the Mae Nam Mae Klong river basin (14°41'25.7"N, 98°24'28.9"E). In fact, the latter is one of the most-southern localities that has recently been confirmed for the species. Elevations of the localities ranged 430-1350 m.

From observations made in this study, *P. megacephalum* is primarily nocturnal as reported by Kirkpatrick (1995). During the daytime, they were observed underwater beneath logs or rocks and wedged into cracks between boulders near either a small waterfall or a location with rapidly flowing water. At night, they were observed walking along the stream bottom apparently searching for food or waiting for prey. They were seen in rocky mountain streams ranging in width from < 1 to 6.7 m in dry dipterocarp and montane rainforests. The weight of the 34 turtles ranged 15-1625 g, and the following sections present essential new information on traditional morphological characters associated with the 34 *Platysternon* turtles observed in the ground survey.

Carapace and plastron

Among the 34 individuals, 1 dead and 15 live turtles had CLs of < 140 mm and were considered juveniles. The smallest juvenile had a CL of only 52.4 mm and was observed in the Thung Jor watershed management unit. The largest female among the 4 adult females captured was observed at Phu Suan Sai National Park. She had a CL of 209.6 mm and a CW of 148.1 mm. Her plastron measured 164.2 mm long and 121.7 mm wide. The CL ranged 145.2-209.6 mm among the 4 females, while the CW ranged 104.7-148.1 mm. The PL ranged 115.0-164.2 mm among the 4

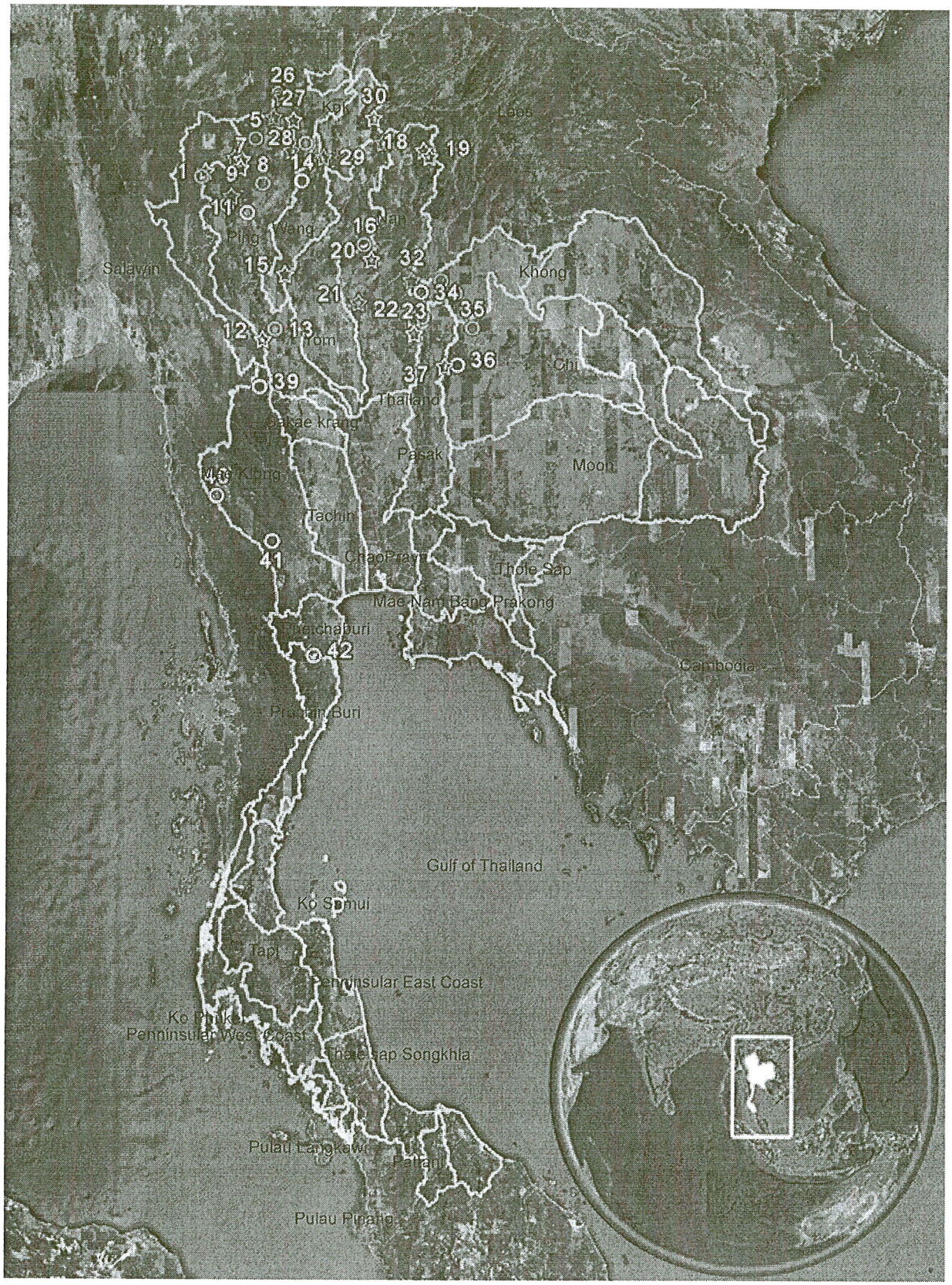


Fig. 1. Distribution of *Platysternon megacephalum* in Thailand combining previously known localities (circles) and 22 new localities (stars). Details on the numbered localities are given in table 1.

Table 1. Localities for *Platysternon megacephalum* in Thailand. In the 2nd and 3rd columns, the numbers in parenthesis refer to the locality numbers in figure 1 and the uppercase letters refer to the following: D, district; P, province; NP, national park; WS, wildlife sanctuary; WU, watershed management unit; DE, dipterocarp forest, MT, montane rainforest

River basin	Locality confirmed from this study	Site	Geo-referenced record		Elevation (m)	Forest type	Authority
			Latitude (N)	Longitude (E)			
Northern							
Mae Nam Salawin	Khun Yuam (D), Mae Hong Son (P, 1)	Mae Surin Waterfall (NP)	18°54'34.4"	98°6'18.6"	1120	DE	Nabhitabhata et al. 2000; Nabhitabhata and Chan-ard 2005, this study
		Mae Hong Son (P)					CUMZ(R) 2008.09.30.1
	Mueang (D), Mae Hong Son (P, 2)	Maesamad (WU)	18°59'18.2"	98°9'24.0"	1300	MT	This study
	Pai D, Mae Hong Son (P, 3)	Mae Lao-Mae Sae (WS)	19°10'21.4"	98°33'5.8"	1004	DE	This study
Mae Nam Ping	Mae Taeng (D), Chiang Mai (P, 4)	Tung Jor (WU)	19°8'59.4"	98°38'43.3"	1250	DE	This study
	Chiang Dao (D), Chiang Mai (P, 5)	Chiang Dao (WS)	19°25'48.3"	98°49'18.9"	920	DE	Nabhitabhata et al. 2000; Nabhitabhata and Chan-ard 2005, this study
	Phrao D, Chiang Mai (P, 6)	Si Lanna (NP)	19°16'4.4"	99°18'50.6"	860	DE	This study
	Samoeng (D), Chiang Mai (P, 7)	Samoeng (WS)	19°2'1.7"	98°37'48.9"	1189	DE	This study
	Mueang (D), Chiang Mai (P, 8)	Doi Suthep-Pui (NP)	18°48'41.2"	98°56'6.7"	605	DE	Nabhitabhata et al. 2000; Nabhitabhata and Chan-ard 2005; this study
		Doi Suthep	18°48'	98°55'			USNM 101652
		Doi Suthep					ZMUC R2402
	Mae Wang (D), Chiang Mai (P, 9)	Khun Wang (WU)	18°38'49.6"	98°31'6.8"	1160	DE	This study
	Mae Chaeam (D), Chiang Mai (P, 10)	Doi Inthanon (NP)	18°31'16.9"	98°27'29.2"	1031	MT	Nabhitabhata et al. 2000; Nabhitabhata and Chan-ard 2005; this study
	Chom Thong (D), Chiang Mai (P, 11)		18°25'	98°44'			USNM 101665
	Mueang (D), Tak (P, 12)	Lan Sang (NP)	16°43'57.6"	98°58'42.4"	900	DE	This study
	Me Taw (D), Tak (P, 13)		16°52'	99°08'			MCZ 29535
		Upper Me-ping at Muang Kuan					SMF 70531
Mae Nam Wang	Mueang Pan (D), Lampang (P, 14)	Chae Son (NP)	18°50'50.1"	99°27'25.1"	700	DE	Unakornsawas 1995; this study
	Si Satchanalai (D), Sukhothai P (15)	Si Satchanalai (NP)	17°35'47.8"	99°15'26.6"	430	DE	This study
Mae Nam Yom	Mueang (D), Phrae (P, 16)	Lum Nam Nan (NP)	17°58'50.6"	100°18'19.7"	1100	DE	Wongkom 2004; CUMZ(R) 2008.09.30.2-5; this study
	Song Khwae (D), Nan (P, 17)	Tham Sakoen (NP)	19°22'15.4"	101°33'21.8"	663	DE	This study
Mae Nam Nan	Pua (D), Nan (P, 18)	Doi Phu Kha (NP)	19°15'53.4"	101°6'25.1"	850	DE	This study
	Bo Khau (D), Nan (P, 19)	Khun Nan (NP)	19°10'32.1"	101°11'8.5"	960	DE	This study
	Nam Pad (D), Uttraradit (P, 20)	Klong Tron Waterfall (NP)	17°47'12.9"	100°24'19.8"	603	DE	This study
	Tha Pla (D), Uttraradit (P, 21)	Lum Nam Nan (WS)	17°13'0.3"	100°14'15.9"	497	DE	This study
	Nakhon Thai (D), Pitsanulok (P, 22)	Phu Hin Rong Kla (NP)	17°0'42.0"	100°58'27.7"	1204	MT	This study
	Khao Kho (D), Phetchabun (P, 23)	Thung Salaeng Luang (NP)	16°48'24.6"	100°58'37.6"	654	DE	This study
Mae Nam Kok	Chai Prakan (D), Chiang Mai (P, 24)	Pha Daeng (NP)	19°44'1.4"	99°3'40.2"	860	DE	This study
	Fang (D), Chiang Mai (P, 25)	Doi Pa Hom Pok (NP)	20°3'30.6"	99°7'14.7"	1350	MT	Nabhitabhata et al. 2000; Nabhitabhata and Chan-ard 2005; this study
	Mae Ai (D), Chiang Mai (P, 26)	Doi Pa Hom Pok (NP)	20°0'42.4"	99°10'11.9"	1310	MT	This study
	Mae Suay (D), Chiang Rai (P, 27)	Doi Wieng Pha (NP)	19°41'20.5"	99°19'50.2"	837	DE	This study
	Wieng Papao (D), Chiang Rai (P, 28)		19°22'	99°30'			USNM 101666
		Northern Thailand					SMF 66464
		Pa Melung, N. Thailand					BMNH 1921.4.1.195-6

females, while the PW ranged 91.8-121.7 mm. The largest male among the 14 adult males was captured at Tad Mog National Park and was nearly as large as the largest female with a CL of 192.3 mm and a CW of 144.5 mm. His plastron measured 148.9 mm long and 144.0 mm wide. The CL ranged 141.1-182.3 mm among the 14 males, while the CW ranged 106.4-144.5 mm. The PL ranged 114.2-148.9 mm among the 14 males, while the PW ranged 95.5-144.0 mm.

The carapace of both sexes is quite flat, squared-off anteriorly and rounded posteriorly. The carapace coloration of adults was variable: light brown, reddish-brown, olive, yellowish-brown, and dark gray (Fig. 2). Carapacial scutes lacked growth annuli in old adults, and had a radiating pattern in young adults. The plastron color also varied: yellow, brownish, olive with yellowish and dark gray with dark brown or light brown seams and a large black blotch in the center (Fig. 2). The

Table 1. (continued)

River basin	Locality confirmed from this study	Site	Geo-referenced record		Elevation (m)	Forest type	Authority
			Latitude (N)	Longitude (E)			
Northern							
Mae Nam Khong	Meaung (D), Prayao (P, 29)	Doi Luang (NP)	19°10'26.3"	99°45'3.9"	685	DE	This study
	Phu Sang (D), Prayao (P, 30)	Phu Sang (NP)	19°42'43.3"	100°25'32.9"	676	DE	This study
Mae Nam Khong	Phu Ruea (D), Loei (P, 31)	Phu Ruea (NP)	17°29'56.9"	101°20'18.5"	1099	DE	Taylor 1970; Nabhitabhata et al. 2000; Nabhitabhata and Chan-ard 2005; this study
	Na Haeo (D), Loei (P, 32)	Phu Suan Sai (NP)	17°30'46.2"	100°56'33.7"	940	DE	This study
	Phu Luang WS, Loei P (33)	Phu Luang (WS)	17°20'1.4"	101°31'48.5"	1220	DE	Chan-ard 2005, THNHM 13561, this study
	Ban Nong Wai, Dan Sai, Loei P (34)		17°21'	101°04'			USNM 141782
Mae Nam Chi	Phu Kradung (D), Loei (P, 35)	Phu Kradung (NP)	16°52'19.5"	101°45'24.9"	1287	MT	Taylor 1970; Nabhitabhata et al 2000, Nabhitabhata and Chan-ard 2005; this study
	Phu Khiao (D), Chaiyphum (P, 36)	Phu Khiao (WS)	16°23'11.1"	101°33'2.8"	891	DE	Kumsook et al. 2006
Central							
Mae Nam Pasak	Mueang (D), Phetchabun (P, 37)	Tat Mog (NP)	16°22'35.7"	101°22'51.3"	652		This study
	Lomlo Mt. Nam Nao (D), Phetchabun (P, 38)		17°01'	101°05'			KU 40084, KU 129716
		Nam Nao, Phetchabun					Gairder 1915; Nabhitabhata et al. 2000; Nabhitabhata and Chan-ard 2005
West							
Mae Nam Mae Klong	Umphang (D), Tak (P, 39)	Umphang (WS)	16°6'10.6"	98°56'54.6"	645	DE	Thirakhupt and van Dijk, 1995; Nabhitabhata et al , 2000; Nabhitabhata and Chan-ard, 2005; this study
	Thong Pha Phum (D), Kanchanaburi (P, 40)	Thong Pha Phum (NP)	14°41'25.7"	98°24'28.9"	933	DE	Thirakhupt and van Dijk 1995; Nabhitabhata et al. 2000; Nabhitabhata and Chan-ard 2005; this study
	Sai Yoke, Kanchanaburi (P, 41)		14°07'	99°08'			NHMB 8416
Eastern							
Mae Nam Phetchaburi	Mount Angka, Phetchaburi (P, 42)		12°40'	99°41'			MCZ 43056
No specific locality known		Laotian mountains Thailand					BMNH 1882.10.7.1 AMNH R96944; FLMNH 85197-8; 85288-9; 99178; 99561; SMF 72682

carapace of juveniles was more brightly colored; dark brown, greenish-brown, and green with a serrated posterior at the carapacial rim, while the plastron was orange with a large black blotch in the center (Fig. 3).

Head

The head is oversized and triangular such that the turtle cannot withdraw its head into its shell. HW ranged 50.5-70.3 mm, and HL ranged 53.0-88.9 mm in 18 adult animals over 140 mm CL. The following ratios describe the head in proportion to carapace measurements: HW/CW 0.38-0.51 ($\overline{X}$ = 0.47 ± 0.03, n = 18), HW/CL 0.31-0.37 ($\overline{X}$ = 0.34 ± 0.02, n = 18), HL/CW 0.44-0.68 ($\overline{X}$ = 0.54 ± 0.06, n = 18), and HL/CL 2.05-2.87 ($\overline{X}$ = 2.53 ± 0.26, n = 18). The top and sides of the turtle's head are covered with large horny scales. The head is yellowish-brown to olive and dorsally may have some dark yellow or brown spots. The snout, chin, jaws, and throat are brown with yellow, orange, pink, or red mottling. The mouth may show either dark or light mottling. Pink or brown blotches also appear in their cheeks or neck.

Limbs

The toes are slightly webbed with strong claws. Four toes of the forelimbs and 5 toes of the hindlimbs are light to dark brown and are covered with large scales. Pink or brown blotches seldom appear on the thighs.

Tail

The tail is long and whiplike, covered with large scales, and is usually as long as the carapace (tail length 140.0-227.6 mm in adult animals over 140 mm CL, TL/CL 0.97-1.39 ($\overline{X}$ = 1.15 ± 0.11, n = 18)).

DISCUSSION

A comparison of historical data on the distribution of *P. megacephalum* in Thailand from the literature and museum specimens with the results of our current field surveys show some changes in occurrence over time. We surveyed a

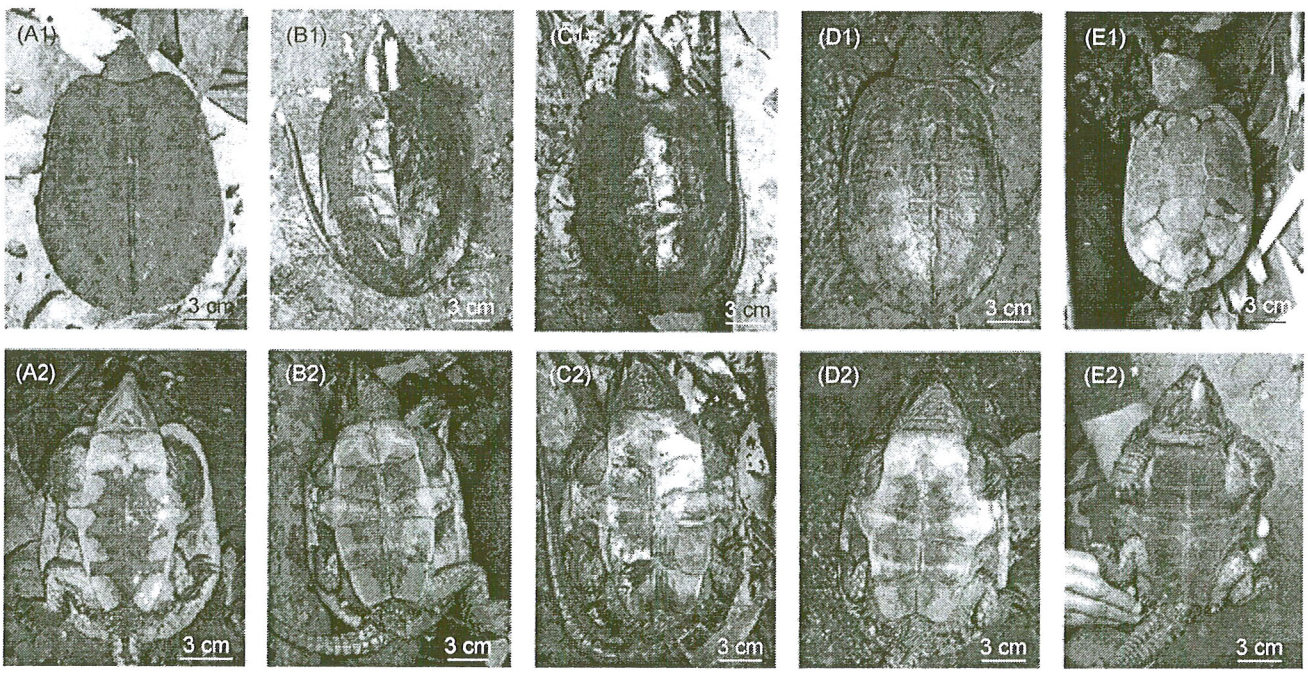


Fig. 2. The different color morphologies of the carapaces of adult big-headed turtles; (A1) brown, (B1) reddish-brown, (C1) olive, (D1) yellowish-brown and (E1) the new morph, dark gray; all with a squared-off front and rounded back end. The plastrons are usually (A2, D2) yellow, (B2) brownish, (C2) olive with yellowish and (E2) the new dark gray morph. These specimens are from (A) the Mae Samard Watershed Management Unit, Mae Hong Son Province in the Salawin river basin, (B) the Umphang Wildlife Sanctuary, Tak Province in the Mae Klong river Basin, (C) the Tad Mok National Park, Phetchabun Province in the Pasak river basin, (D) the Pha Daeng National Park, Chiang Mai Province in the Kok river basin and (E) the Phu Suan Sai National Park, Loei Province in the Khong river basin.

from researchers 20-30 yr ago (Nutaphand 1979, Humphrey and Bain 1990), our recent ground survey did not find *P. megacephalum* in the Mae Nam Moon river basin. Although records of *P. megacephalum* in Phu Khiao District, Chaiyaphum Province in the Mae Nam Chi river basin exist and we obtained positive sightings information from the questionnaire, we could not confirm this by survey due to local security restrictions upon access to the area. In this area, Kamsook et al. (2006) reported that 3 big-headed turtles were found at elevations of 870, 876, and 891 m. Moreover, in the Mae Nam Pasak river basin, *P. megacephalum* was reported in Nam Nao National Park, Phetchabun Province, on several occasions over earlier and recent times (Gairdner 1915, Nabhitabhata et al. 2000, Nabhitabhata and Chan-ard 2005); yet in our study, we did not find any big-headed turtles in Nam Nao National Park, but rather observed them in nearby Tat Mog National Park, Mueang District, Phetchabun Province.

The coloration of *P. megacephalum* shells was reported to be quite variable, ranging from yellowish-brown to olive (Ernst and Barbour 1989, Kirkpatrick 1995, Bonin et al. 2006). In this study, we observed 2 new color morphs: dark-gray carapace in old adults and greenish-brown carapaces in juveniles (Figs. 2, 3). In addition, we noted that the same carapace color was often found at several localities thus questioning the value of color morphs as a marker of subspeciation. In view of this within-locality variation and our small sample sizes, the 3 subspecies proposed by Nutaphand (1979) and Wermuth (1969) are not recognized in this study. However, a comprehensive study of geographic variations in coloration, morphology, and genetic markers is needed to address relationships among big-headed turtle populations within Thailand.

Previous to our work, *P. megacephalum* in Thailand was reported to occur only above 800 m and in streams that are usually narrower than 1 m wide and < 10 cm deep (Kirkpatrick 1995, van Dijk 2002). In contrast, we found that *P. megacephalum* occurred at 430-1350 m with the most common elevations at 630-720 m (n = 7). Moreover, *P. megacephalum* was found in streams both wider and narrower than 1 m, with water depths of 14.0-95.0 cm. Furthermore, while *P. megacephalum* was reported to be restricted to locations with rapidly moving water (Ernst and Barbour 1989, Kirkpatrick 1995), we found 2 individuals in still water, albeit during the dry season. *Platysternon* is known to live in waters at temperatures of 12-17°C (Ernst and Barbour 1989, Kirkpatrick 1995) and even up to 24°C (van Dijk 2002). Our results (15.5-20.3°C) fall within these values.

Results from informal interviews with local people at the various localities visited suggest that *P. megacephalum* is less common now than in the past due to hunting. However, our ground surveys suggest that a few large populations may be present in remote areas that are difficult to access or near villages where turtles are not regularly sold or eaten. These findings strongly support the notion that a monitoring program is needed to detect trends in numbers of big-headed turtles in Thailand.

Unfortunately, in many of the areas visited, we found that *P. megacephalum* was regularly consumed and occasionally traded between villagers or sold at local markets. During this study, the Royal Thai Police seized 81 big-headed turtles (17 live and released, 64 dead) in Loei (4 Dec. 2007); 26 individuals in Phrae (29 Jan. 2008); 25 turtles in Lampang (7 Mar. 2008); 6 dead in Loei (29 July 2008); 5 animals in Loei (2 Aug. 2008); and 2 big-heads in Nan Province (3 Sept. 2008). These incidents demonstrate that *P. megacephalum* is threatened by continued poaching for local consumption and trade. Although the cited raids and confiscations of *P. megacephalum* are known to villagers, recent information indicates that the illegal trade continues. Notwithstanding this situation, Thailand is truly one of the last strongholds of this monotypic genus of turtle. *Platysternon* is far worse off in adjacent countries that are more heavily impacted by the strong Chinese demand for this turtle (Stuart and Timmins 2000).

Habitat availability for big-headed turtles is of major importance and fortunately most areas of occurrence in Thailand are largely within protected areas (van Dijk and Palasuwan 2000). Although *P. megacephalum* was found in protected areas in this and earlier studies, we still know that turtles are being illegally harvested and are likely declining in numbers. Important factors in the long-term persistence of big-headed turtles are the maintenance of appropriate natural forest ecosystems and the elimination of poaching. Based on their current limited distribution and threats, *P. megacephalum* should remain an endangered species in Thailand. Further, we recommend strong legislative action to protect this species and a long-term monitoring program to detect future changes in distribution

and population numbers (e.g., see Chen and Lue 2009). Enforcement authorities should be encouraged to be more vigilant in preventing the consumption and trade. Educational programs that foster national pride in natural resources and conservation awareness should be developed within local communities that share their land with big-headed turtles.

Acknowledgments: We are grateful to the authority of the National Park, Wildlife and Plant Conservation Department for permission to conduct these surveys in Thailand. We thank Mr. P. Rotchanadilok (Doi Chiang Dao Wildlife Research Station, CM, Thailand), and P. Crow (Kadoorie Farm and Botanic Garden, Hong Kong) for invaluable help in the initial stages of this project. Thanks also go to all villagers and forest rangers for their assistance in surveying and to Dr. G. Koehler (Institute and Natural History Museum Senckenberg, Germany), Dr. C. McCarthy (The Natural History Museum, London, UK), A. Resetar (Field Museum of Natural History, Chicago, IL, USA), Dr. K.L. Krysko (Univ. of Florida, Gainesville, FL, USA), D. Dickey (American Museum of Natural History, NY, USA), Dr. G. Schneider (Univ. of Michigan, Ann Arbor, MI, USA), Dr. N. Rasmussen (Univ. of Kansas, Lawrence, KS, USA), Dr. G. Zug (Smithsonian Institution, Washington DC, USA), Dr. A. Aowphol (Kasetsart Univ., Bkk, Thailand), and Mr. S. Makchai (Thailand Natural History Museum, PT, Thailand) for specimen information. Special thanks go to Dr. R. Butcher, Research Division, Faculty of Science, Chulalongkorn Univ. (Bkk, Thailand) for his helpful comments and suggestions. We also thank an anonymous reviewer and Jonathan Fong for numerous helpful suggestions for improving the manuscript. This research was funded by the J.D. and C.T. MacArthur Foundation under collaboration with The Field Museum of Natural History, TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training grant BRT T_251002 and the Thai government budget 2006, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity and the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University (CEB_D_12_2006).

REFERENCES

Bonin F, B Devaux, A Dupré. 2006. Turtles of the world. Translated by PCH Pritchard. Baltimore MD: Johns Hopkins Univ. Press, 140 pp.

Burnie D, EW Don, eds. 2001. Animal: the definitive visual guide to the world's wildlife. London, UK: Dorling Kindersley, 257 pp.

Chen T, K Lue. 2009. Changes in the population structure and diet of the Chinese stripe-necked turtle (*Mauremys sinensis*) inhabiting a disturbed river in northern Taiwan. Zool. Stud. **48:** 95-105.

Ernst CH, RW Barbour. 1989. Turtles of the world. Washington DC and London: Smithsonian Institute Press, 313 pp.

Fong JJ, G Qiao. 2010. New localities of endangered Chinese turtles from museum specimens and the practical and ethical challenges using and reporting natural history collection data. Zootaxa **2393:** 59-68.

Gairdner KG. 1915. List of the mammals, birds, reptiles and bratrachians obtained in the Ratchaburi and Petchaburi Districts. J. Nat. Hist. Siam Soc. **1:** 146-156.

Humphrey SR, JR Bain. 1990. Endangered animals of Thailand. Flora and fauna handbook no. 6. Gainesville, FL: Sandhill Crane Press, 468 pp.

IUCN. 2008. IUCN red list of threatened species. Available at http://www.redlist.org Accessed 16 Apr. 2009.

Kamsook M, K Somsri, W Puangsai. 2006. Amphibian and reptile diversity in Phu Khieo Wildlife Sanctuary, Chaiyaphum, Thailand. BRT Res. Rep. **2006:** 270-284.

Kirkpatrick D. 1995. The big-headed turtle, *Platysternon megacephalum*. Reptile Amphibian Mag. **Nov./Dec.:** 40-47.

Nabhitabhata J, T Chan-ard. 2005. Thailand red data: mammals, reptiles and amphibians. Bangkok, Thailand: Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning, 234 pp.

Nabhitabhata J, T Chan-ard, Y Chuaynkern. 2000. Checklist of amphibians and reptiles in Thailand. Bangkok, Thailand: Office of Environmental Policy and Planning. 152 pp.

Nutaphand W. 1979. The turtles of Thailand. Bangkok, Thailand: Siamfarm Zoological Garden, 222 pp.

Stuart BL, RJ Timmins. 2000. Conservation status and trade of turtles in Laos. pp. 58-62. *In* PP Van Dijk, BL Stuart, AGJ Rhodin, eds. 2000. Asian turtle trade: proceedings of a Workshop on Conservation and Trade of Freshwater Turtles and Tortoises in Asia. Chelonian Research Monographs 2. Lunenburg, Canada: Chelonian Research Foundation, 164 pp.

Taylor EH. 1970. Turtle and crocodiles of Thailand and adjacent waters, with a synoptic herpetological bibliography. Univ. KS Sci. Bull. Lawrence **49:** 87-179.

Thirakhupt K, PP van Dijk. 1995. Species diversity and conservation of turtles in western Thailand. Nat. Hist. Bull. Siam Soc. **42:** 207-259.

Unakornsawas Y. 1995. Some biology of the big-headed turtle. Lampang, Thailand: Department of Fishery, 89 pp.

van Dijk PP. 2002. The legal status of tortoises and freshwater turtles in Asia. Paper presented to the Technical Workshop on Conservation of and Trade in Freshwater Turtles and Tortoises in Asia, Kunming, Yunnan Province, China, 25-28 Mar. 2002.

van Dijk PP, T Palasuwan. 2000. Conservation status, trade, and management of tortoises and freshwater turtles in Thailand. *In*: van Dijk PP, BL Stuart, and AGJ Rhodin (eds.): Asian turtle trade: proceedings of a workshop on conservation and trade of freshwater turtles and tortoises in Asia. Chelonian Research Monographs 2, 23 pp.

Wermuth H. 1969. Eine neue Grosskopfschildkröte, *Platysternon megacephalum vogeli*, n. ssp. Aquar.-Terr. Zeitsch. **22:** 372-374.

Wongkom K. 2004. Population characteristics and distribution of the big-headed turtle (*Platysternon megacephalum*) in Ban Na Tong and Ban Num Jom, Phrae, Thailand: Department of National Parks, Wildlife and Plants Conservation, 55 pp.

ลำดับที่ 19

Environmental and Experimental Botany xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental and Experimental Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envexpbot

Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress

Siriporn Sripinyowanich[a,e], Pongsathorn Klomsakul[a], Bongkoj Boonburapong[b], Thapana Bangyeekhun[a], Tadao Asami[c], Hongya Gu[d], Teerapong Buaboocha[a,b], Supachitra Chadchawan[a,*]

[a] *Environment and Plant Physiology Research Unit, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*
[b] *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*
[c] *RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan*
[d] *College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China*
[e] *Biological Sciences Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 August 2009
Received in revised form 20 January 2010
Accepted 25 January 2010

Keywords:
Rice
Oryza sativa L.
Salt stress
Abscisic acid
Proline
Calmodulin

ABSTRACT

Abscisic acid (ABA) applied exogenously at 100 μM prior to and during the salt-stress period induced salt tolerance in both the salt-susceptible (LPT123) and the genetically related salt-resistant (LPT123-TC171) rice lines, enhanced the survival rate by 20%, and triggered proline (Pro) accumulation earlier than that by salt-stress alone, supporting a role for Pro as an osmoprotectant. In both rice lines, salt-stress induced *OsP5CS1* gene expression, suggesting that proline accumulation occurs via *OsP5CS1* gene expression during salt stress. An increase in the endogenous ABA level was required for the induction of *OsP5CS1* gene expression by salt stress. Under salt stress, topical ABA application-induced *OsP5CS1* gene expression only in the salt-resistant line but up-regulated *OsP5CR* gene expression in both rice lines, suggesting that the increased proline accumulation and salt resistance induced by topical ABA application may result from the up-regulation of *OsP5CR* and not, directly at least, from *OsP5CS1*. Moreover, exogenous ABA application up-regulates *OsCam1-1* (the salt-stress-responsive calmodulin) gene expression, and calmodulin was shown to play a role in the signal transduction cascade in proline accumulation during salt stress. These data suggest the role of the calmodulin signaling cascade and the induction of *OsP5CR* gene expression in proline accumulation by exogenous ABA application.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Green plants are some of the most specious eukaryotes on terrestrial earth after insects and nematodes, with some 500,000 species, and probably diversified from a single land colonization. However, terrestrial plants are subject to often extreme and hostile changes in their environment, but, in contrast to many animals and prokaryotes, as sessile organisms they are essentially unable to move away from rapidly changing adverse environmental conditions. Therefore, they have evolved a remarkable ability to cope with highly variable environmental stresses, including cold, drought and soils with changing salt and nutrient concentrations, as part of their successful colonization of the ever changing terrestrial habitats. With respect to domesticated plants, the inability to respond to, or the trade-off costs of such stress responses to, these changing environmental stresses together represent the primary cause of crop losses across the world (Boyer, 1982), reducing average yields for most major crop plants by more than 50% (Bray et al., 2000). In contrast, this can be compared to the estimated yield loss caused by pathogens, which although well known and researched as a problem, actually account for typically only around 10–20% loss (Kreps et al., 2002). In addition to competitive economic issues, the ever increasing demand for both food and material crops, including green fuels, against the decreasing availability of new land for agriculture, means that increased efficiency of existing agricultural practices is essential. Therefore, the reduction of crop yield loss through stress is one important prime target along with pathogen and disease reduction. A number of attempts have been pursued to significantly reduce the effects of environmental stress, such as screening and selective breeding for new plant cultivars with desired stress-tolerant characters, and the investigation of stress-tolerant plants as model systems to evaluate the stress-tolerant mechanisms.

Exposure to desiccation, salt stress and low temperature are generally accompanied by an increase in endogenous abscisic acid (ABA) levels prior to activation of a number of water- and

* Corresponding author. Tel.: +66 2 2185485; fax: +66 2 2528979.
E-mail address: s_chadchawan@hotmail.com (S. Chadchawan).

0098-8472/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

Please cite this article in press as: Sripinyowanich, S., et al., Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environ. Exp. Bot. (2010), doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

salt-stress-induced genes (Chandler and Robertson, 1994), the products of which are thought to be involved in protection of the cell or in recovery from the stress-mediated physiological insult. Indeed, ABA is an important signal for triggering plant responses to adverse environmental conditions during vegetative growth (Leung and Giraudat, 1998; Nambara and Marion-Poll, 2005), and ABA coordinates many of these stress responses, including the immediate stomatal closure, osmolyte accumulation and the induction of the synthesis of stress-related proteins, such as late embryogenesis abundant and heat shock proteins, reactive oxygen scavengers, etc. However, whilst many abiotic-stress-inducible genes are controlled by ABA, some are not, which indicates that both ABA-dependent and ABA-independent regulatory systems are involved in stress-responsive gene expression (Bray et al., 2000; Zhu, 2002).

In support of this, there are observations that the application of exogenous ABA to both whole plants, and in tissue culture explants or protoplasts, facilitated the adaptation to subsequent increased salinity (salt stress) in several phylogenetically diverse plants. ABA treatment prior to an increased salinity insult was reported to improve the growth of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) (Khadri et al., 2007), to reduce leaf abscission and increase salt tolerance in citrus plants (Gómez-Cardenas et al., 2003), and to induce salt adaptation in jojoba (*Simmondsia chinensis*) shoots grown *in vitro* (Mills et al., 2001).

Moreover, exogenous ABA application was shown to reduce the sodium concentration or its translocation to shoots, resulting in a salt-tolerant adaptation in both the cereal grass *Sorghum* (Amzallag et al., 1990) and the common bean (Khadri et al., 2007), whilst the increase in the K^+/Na^+ ratio in rice following exogenous ABA application correlated with the increased salinity tolerance (Bohra et al., 1995).

Adaptation by plants to stress involves morphological, physiological and biochemical changes, including the accumulation of osmolytes such as proline (McCue and Hanson, 1990; Demiral and Türkan, 2006), which are thought to play an adaptive role during osmotic stress (for review, see Delauney and Verma, 1993; Türkan and Demiral, 2009). Under salt-stress conditions, the elevated ABA levels inhibit Na^+ and Cl^- transport to shoots in intact bean seedlings (Karmoker and Van Steveninck, 1979), and it has been suggested that the resultant changes in ion concentrations together with the increase in endogenous ABA levels generate the signal for the induction of stress-induced genes. If correct, ABA may play an important role in the tolerance of plants to increasing salinity.

Proline is a dominant organic molecule that accumulates in many organisms (Sawahel and Hassan, 2002) following exposure to environmental stresses, and especially under salt-stress conditions (Delauney and Verma, 1993; Jiménez-Bremont et al., 2006; Tripathi et al., 2007; Xue et al., 2009). However, the role of proline accumulation in salt tolerance is contradictory and unresolved. Some researchers have suggested that proline accumulation may be related to the degree of salt (Igarashi et al., 1997; Demiral and Türkan, 2006) or osmotic (Hien et al., 2003) tolerance in rice whilst, in contrast, others have suggested that it is a symptom of salt-stress injury rather than an indicator for resistance (Lutts et al., 1996; Bangyeekhun et al., 2004). Nevertheless, within this controversy, Hien et al. (2003) suggested that for rice cultivars proline accumulation is a possible indicator of osmotic tolerance.

Some support for a potentially general protective rather than symptomatic role for proline accumulation and salt-tolerance comes from the observations that the exogenous topical application of ABA to non-stressed plants triggers proline accumulation in the cereals barley (Pesci, 1987), maize (Ober and Sharp, 1994) and rice (Chou et al., 1991), as well as *Brassica* and *Arabidopsis* (Finkelstein and Somerville, 1990). In addition, under salt-stressed conditions, a low level of ABA (1 μM) increased proline accumulation in the shoot of the common bean which also correlated with enhanced salt tolerance (Khadri et al., 2007).

Proline is synthesized from glutamate via two intermediates, glutamic γ-semialdehyde and Δ′-pyrroline-5-carboxylate. The first step is catalyzed by Δ′-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) and is rate-limiting (Delauney and Verma, 1993; Hu et al., 1992; Kavi Kishor et al., 1995; Yoshiba et al., 1995; Igarashi et al., 1997; Hong et al., 2000).

Homologous *P5CS* genes have been isolated from various plant species, including two *P5CS* gene homologues in rice (*Oryza sativa* L.), *OsP5CS1* and *OsP5CS2* (Igarashi et al., 1997; Hien et al., 2003). However, their partial characterization to date reveals different transcript expression patterns between them. Thus, *OsP5CS1* transcripts are up-regulated by NaCl, osmotic, dehydration and cold shock (Igarashi et al., 1997), whilst *OsP5CS2* transcripts are additionally up-regulated by mannitol (Hien et al., 2003). In addition, although both genes are up-regulated by exogenous ABA under normal conditions, the kinetics differ with a faster and stronger up-regulation of *OsP5CS1* transcripts compared to that for *OsP5CS2* in whole indica rice seedlings, and differential expression levels in different tissues (Hur et al., 2004). This is in good agreement with the differential expression patterns of the two homologous genes in *Arabidopsis*, *AtP5CS1* and *AtP5CS2*, in terms of tissue tropism and the kinetics and levels of transcript expression (Strizhov et al., 1997; Yoshiba et al., 1999; Abraham et al., 2003).

The data summarized above raise the issue of whether *OsP5CS1* gene expression is related directly to salt stress and ABA function in *O. sativa* L., since it remains unknown if *OsP5CS1* acts via an ABA-dependent pathway under salt stress. Thus, as a required prelude to evaluate such, the objective of the present investigation was to determine the appropriate concentration of exogenous ABA application that can induce salt tolerance and also trigger proline accumulation and, additionally, to establish the relationship between *OsP5CS1* gene expression levels and ABA function. Based on previous reports, where exogenous ABA treatment increased *P5CS* transcript levels in *Arabidopsis thaliana* (Strizhov et al., 1997; Yoshiba et al., 1999; Abraham et al., 2003), we considered the possibility that *OsP5CS* might be regulated by ABA in rice. If that is the case, we speculate that exogenous ABA application at a dose that induces salt tolerance and proline accumulation should induce *OsP5CS1* transcript levels. However, if not, other genes in the proline biosynthesis pathway should be investigated.

The proline synthesis pathway with glutamate as a precursor requires two enzymes, pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS), and pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR). In *Arabidopsis*, during osmotic stress, only *P5CS*, but not *P5CR*, gene expression was well correlated with proline content (Yoshiba et al., 1995; Savouré et al., 1997). In maize and wheat the activity of P5CR during water stress was increased in correlation with the accumulation of proline, whilst increased Ca^{2+} levels also led to the elevated accumulation of proline in both plant species (Nayyar, 2003). The calmodulin antagonist, trifluoperazine, decreased P5CR activity and proline content, suggesting the involvement of Ca^{2+} and calmodulin in P5CR function (Nayyar, 2003).

Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins indicated that there are 243 proteins in the rice genome that possibly have an 'EF-hand' motif. These include five *O. sativa* L. *Cam* (*OsCam*) genes and 32 *O. sativa* L. *Cam*-like (*OsCML*) genes (Boonburapong and Buaboocha, 2007). The *OsCam1-1* gene expression level was shown to be rapidly (1 h after stress) and highly increased in response to salt stress (0.15 M) (Phean-o-pas et al., 2005, 2008), and then slowly decreased 2 and 4 h after the treatment. This result indicates that

Please cite this article in press as: Sripinyowanich, S., et al., Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environ. Exp. Bot. (2010), doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

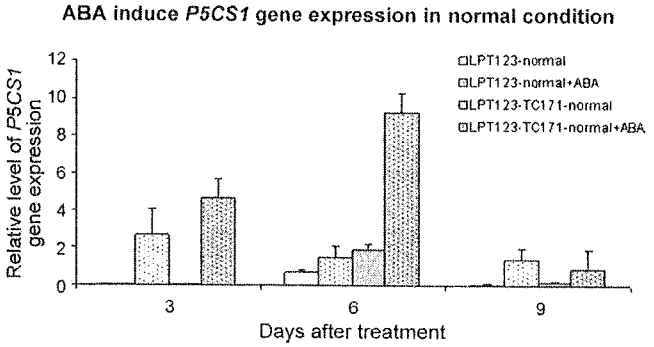


Fig. 4. The effects of topically (exogenous) applied 100 μM ABA on *OsP5CS1* transcript expression levels in the salt-sensitive (LPT123) and salt-tolerant (LPT123-TC171) indica rice lines grown under normal conditions. The data are shown as the mean ± 1 SD and are derived from 3 repeats.

higher than that in the LPT123 cultivar. Although the potential maximum proline accumulation levels in leaves were attained at the same time as in the treatment without ABA, at Days 9 and 12 for LPT123 and LPT123-TC171, respectively, the maximum levels attained for both rice lines were higher after ABA application and were essentially the same between them (Fig. 3).

3.4. ABA regulates OsP5CS1 transcript expression in both rice lines

The potential involvement of ABA in modulating the *OsP5CS1* transcript levels was investigated by following the *OsP5CS1* transcript levels after topical exogenous application of 100 μM ABA or by topical leaf (SG1) or topical leaf and root (systemic) (SG2) application of abamine SG, an inhibitor of ABA biosynthesis (Kitahata et al., 2006). After 3 days of exogenous topical ABA application, significant increases in the *OsP5CS1* transcript levels were clearly seen in the two-week-old seedlings of both the salt-sensitive (LPT123) and the salt-tolerant (LPT123-TC171) rice lines compared to those grown under normal conditions. However, the numerically higher induced *OsP5CS1* transcript levels seen in the LPT123 cultivar than those in the LPT123-TC171 line was not statistically significant (Fig. 5). After 6 days the transcript levels had fallen in the salt-susceptible LPT123 cultivar to the same level as those seen from the plants without ABA application, whereas in the salt-tolerant LPT123-TC171 line the transcript levels were further and significantly increased reaching some 2-fold higher levels than those on Day 3. In both of these indica rice lines the *OsP5CS1* transcript levels 9 days after ABA treatment had returned to near the basal levels and showed only weakly elevated transcript levels compared to the controls (Fig. 4). Thus, relative to the salt-sensitive line, the salt-tolerant line appears to have a higher induction level, and a more prolonged response, of elevated *OsP5CS1* transcript levels.

Although salt stress was found to induce the *OsP5CS1* transcript expression in both rice lines, the magnitude and kinetics markedly differed (Fig. 5) from that induced by topical ABA application (Fig. 4). After only 2 days of salt stress, the *OsP5CS1* transcript levels were some 8-fold higher in both rice lines, but with higher basal and salt-stress-induced transcript levels in the salt-resistant line compared to that in the salt-sensitive cultivar (Fig. 5). Interestingly, the salt-stress-induced elevation (e.g. at 2 days after treatment) of the *OsP5CS1* transcript expression was reduced by the topical (SG1), and especially the topical leaf and root plus (systemic) (SG2), administration of abamine SG (Fig. 5). Moreover, this inhibition was more marked in the salt-resistant line. Taken together, these data support the involvement of ABA in the control of *OsP5CS1* gene expression in both rice lines, even though the two lines exhibited slightly different responses to ABA.

To confirm that the application of abamine SG causes a reduction in the ABA content and also inhibits other ABA-responsive genes, both the ABA content in leaves and the expression of the ABA-induced *OsCIPK15* (Xiang et al., 2007) and *OsCYP707A5* (Yang and Choi, 2006) transcript levels, were evaluated by RT-PCR. Application of abamine SG caused an approximately 10–12-fold reduction in the ABA content in leaf tissues after 2 days of treatment (Fig. 6). It should be noted that measurement of the ABA content had to be determined within this short period because rice seedlings subjected to both salt stress and abamine SG application did not survive for a longer period.

With respect to *OsCIPK15* gene expression, under normal conditions a reduction in the *OsCIPK15* expression level was clearly seen on the second day of the treatment and this reduction was comparable in both rice lines. However, abamine SG treatment caused a further significant reduction in the transcript levels in both the LPT123 and LPT123-TC171 rice lines grown under both normal and salt-stress conditions, with the exception of the salt-resistant LPT123-TC171 line grown under salt stress, in which only a slightly reduced transcript level was found (Fig. 7). Under the salt-stress condition, the reduced *OsCIPK15* transcript levels was only detected after 2 days of combined salt stress and abamine SG treatment.

With respect to the expression of *OsCYP707A5*, abamine SG treatment clearly resulted in a reduced transcript level in both rice lines, when grown under normal conditions (Fig. 7). Salt-stress alone induced a significant up-regulation of *OsCYP707A5* transcript levels in both rice lines, but the magnitude of the up-regulation was reduced with abamine SG treatment. Moreover, the expression of *OsCYP707A5* was different between these two tested rice lines, with the salt sensitive LPT123 cultivar showing a lower transcript level than the salt-resistant LPT123TC171 rice line. With abamine SG treatment under normal growth conditions, a reduction in the *OsCYP707A5* transcript level was clearly detected after 1 day of treatment in both rice lines, but under the salt-stress conditions, transcript levels only decreased towards normal levels after 2 days of treatment.

3.5. Induction of OsP5CS1 gene expression by salt stress is decreased in the LPT123 cultivar and delayed in the LPT123-TC171 line by exogenous ABA

A significant induction of *OsP5CS1* transcript levels by salt stress was clearly detected in both rice lines after 3 days of salt-stress treatment, with an almost 2-fold higher level being observed in the LPT123-TC171 line compared to that of the salt-sensitive cultivar (Fig. 8). The expression levels declined thereafter, but the LPT123-TC171 line still showed highly elevated transcript levels after 6 days compared to the more rapid decrease back towards basal levels that was observed in the LPT123 cultivar. Interestingly, given the proposed involvement of ABA as an inducer of *OsP5CS1* transcripts, the topical application of 100 μM ABA onto seedlings markedly decreased the level of *OsP5CS1* transcripts induced by salt stress in both rice lines after 3 days of treatment, and numerically slightly (but not statistically significantly) thereafter at Days 6 and 9 for the LPT123 cultivar. However, after 6 days of exogenous ABA application together with salt stress, the *OsP5CS1* transcript levels appeared to be up-regulated in the salt-tolerant LPT123-TC171 line. After 9 days of treatment, no significant effect of topical exogenous ABA application upon the *OsP5CS1* transcript levels was observed in both lines (Fig. 8).

These results indicate that in the LPT123 and LPT123-TC171 rice lines the exogenous ABA application during salt stress reduced and delayed, respectively, the salt-stress-mediated induction of *OsP5CS1* gene expression, and suggests that *OsP5CS1* is not directly

Please cite this article in press as: Sripinyowanich, S., et al., Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environ. Exp. Bot. (2010), doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

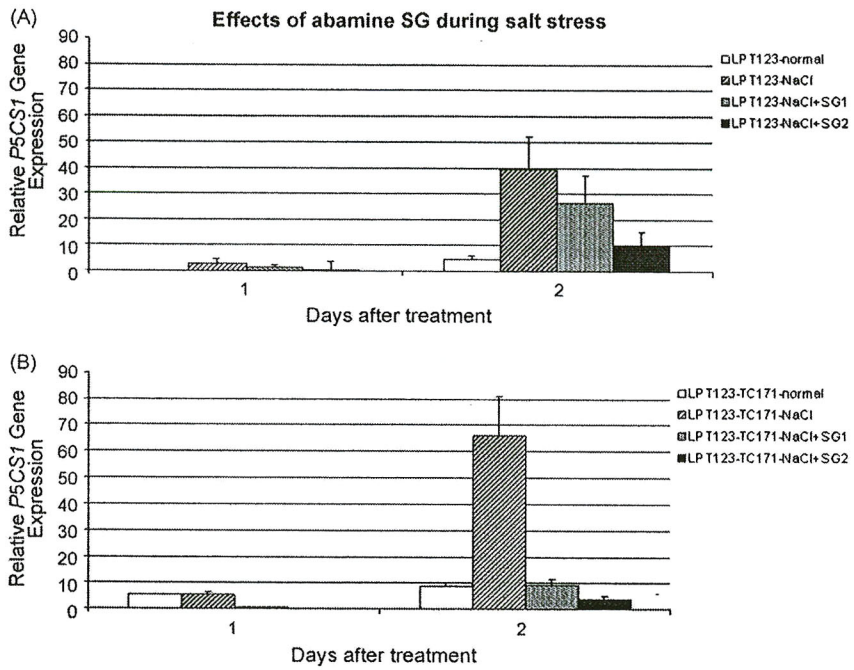


Fig. 5. The effects of topical abamine SG application on *OsP5CS1* transcript expression levels during growth under normal or salt-stress (NaCl) conditions. Abamine SG was sprayed on the rice leaves (SG1) or sprayed and additionally added (50 μM) to the nutrient solution (SG2). The data are shown as the mean ± 1 SD and are derived from 3 repeats.

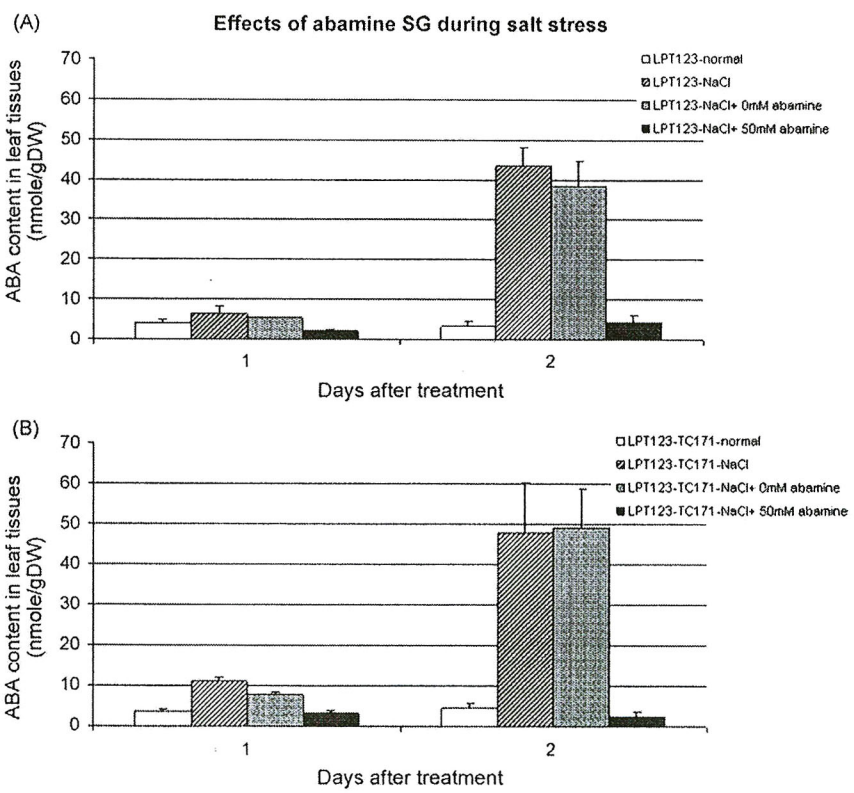


Fig. 6. The effects of 50-μM abamine SG on the endogenous ABA accumulation in the leaves of the two rice lines (LPT123 and LPT123-TC171) grown under normal (WP) or salt-stress (NaCl) conditions. The data are shown as the mean ± 1 SD and are derived from 3 repeats.

Please cite this article in press as: Sripinyowanich, S., et al., Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environ. Exp. Bot. (2010), doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

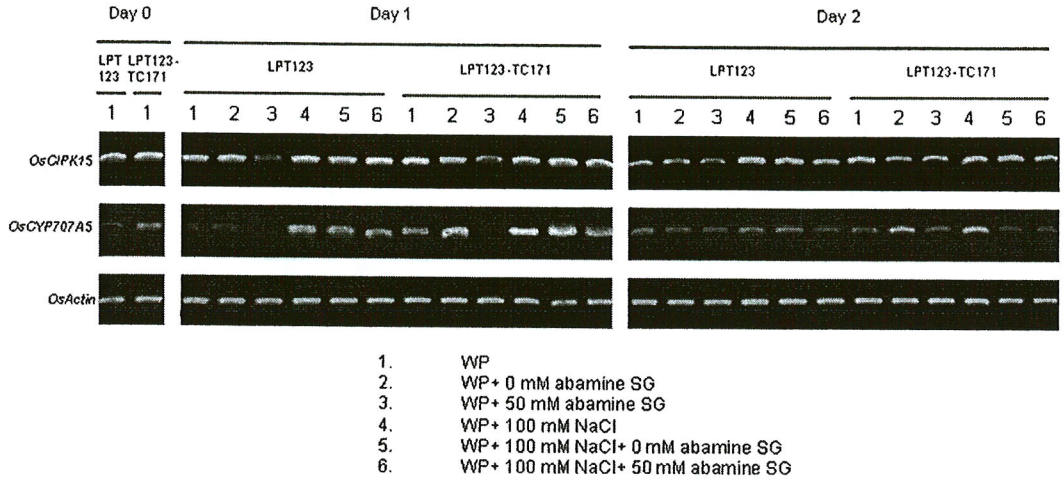


Fig. 7. The effects of 50-μM abamine SG on *OsCIPK15* and *OsCYP707A5* gene expression levels during normal (3) and salt-stress (6) conditions. The controls were performed using untreated plants (1) and the plant grown under either normal (1) or salt-stress (4) conditions and sprayed with 0 μM (2, 5) or 50 μM (3, 6) abamine SG (2, 5).

responsible for the early proline accumulation seen in response to the topical ABA treatment prior to salt stress (Fig. 3).

3.6. Exogenous ABA up-regulated OsP5CR gene expression in both the LPT123 and LPT123-TC171 rice lines

In order to investigate if any of the enzymes in the proline synthesis pathway was up-regulated after topical ABA application, and so could have led to the higher accumulation of proline, the level of *OsP5CR* transcripts was investigated by RT-PCR. Salt stress was observed to induce *OsP5CR* transcript expression and, moreover, exogenous ABA application additionally further up-regulated the *OsP5CR* transcript levels in both the LPT123 and LPT123-TC171 rice lines after three and 6 days of treatment (Fig. 9). However, after 9 days, the levels of the *OsP5CR* transcripts in both rice lines were comparable to those of the controls.

3.7. OsCam1-1 gene expression of LPT123 and LPT123TC171 rice responded differently to salt stress and exogenous ABA treatment

Since the calmodulin gene, *OsCam1-1*, has previously been reported to be induced within 4 h of salt-stress treatment (Pheano-pas et al., 2005), we investigated *OsCam1-1* transcript levels in both the salt-susceptible and salt-resistant rice lines. Salt stress up-regulated the *OsCam1-1* transcript levels in the salt-resistant LPT123-TC171 line, but not in the salt-susceptible LPT123 cultivar

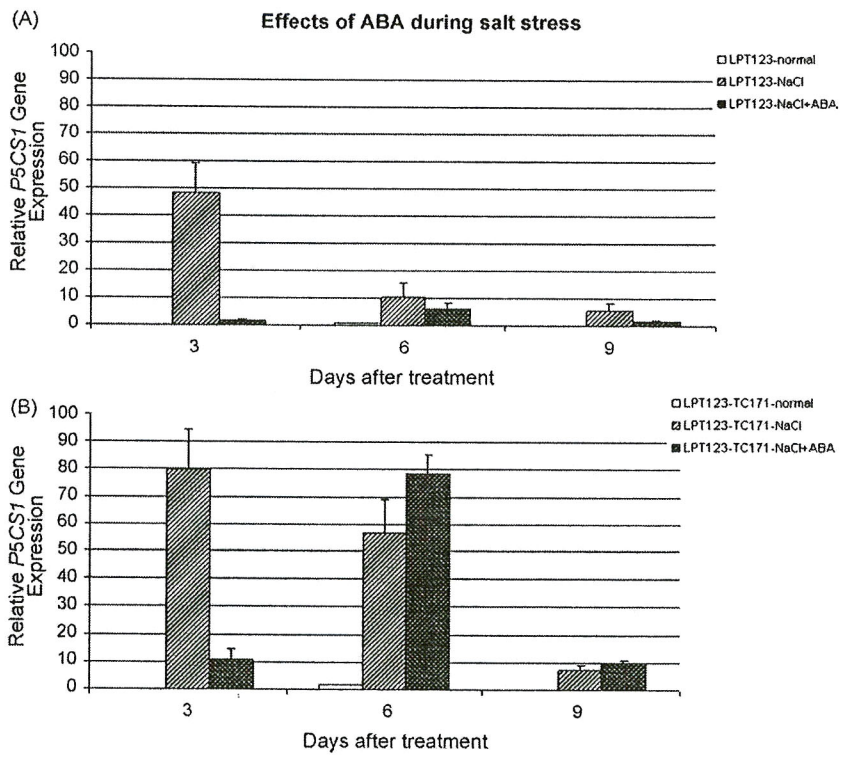


Fig. 8. The effects of salt stress and topical ABA application during salt stress on *OsP5CS1* transcript expression levels in the salt-sensitive LPT123 and salt-resistant LPT123-TC171 indica rice cultivars. The data are shown as the mean ± 1 SD and are derived from 3 repeats.

Please cite this article in press as: Sripinyowanich, S., et al., Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environ. Exp. Bot. (2010), doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

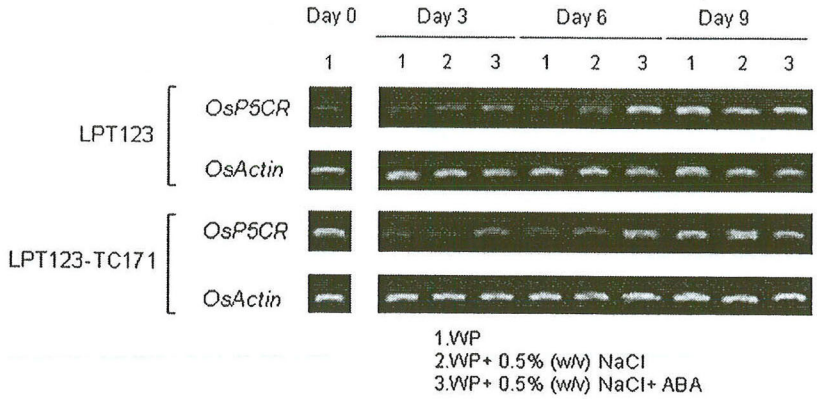


Fig. 9. The effects of topical ABA treatment prior to salt-stress condition (3) on the *OsP5CR* gene expression levels, in comparison of the expression of the gene during normal (1) and salt-stress (2) conditions. The *OsActin* gene was used as the internal control of equal loading of the mRNA.

(Fig. 10A and B). When the seedlings grown under normal conditions were treated with exogenous ABA, a similar response between the two rice lines were found with a low induction of *OsCam1-1* transcript levels being detected only in the salt-resistant LPT123-TC171 line. However, when grown under the salt-stress condition, ABA application caused a significant induction of *OsCam1-1* transcript levels in both rice lines, but with an earlier and a stronger response in the LPT123 rice seedlings (Fig. 10C and D).

3.8. Calmodulin plays a role in proline accumulation during salt stress

In order to investigate if calmodulin plays a role in the proline accumulation during salt stress in rice, the calmodulin antagonist, W-7, was applied to the salt-susceptible and the salt-resistant rice lines and the proline accumulation level was determined. It was clearly shown that a 3- and 8.6-fold reduction in the proline content was found in the LPT123 and LPT123-TC171 rice lines, respectively, when W-7 was applied to the rice seedlings during salt stress (Fig. 11).

4. Discussion

Topical exogenous ABA application has been shown to improve the salt tolerance in Sorghum (Amzallag et al., 1990), citrus plants (Gómez-Cardenas et al., 2003) and common beans (Khadri et al., 2007). However, the ABA concentration required for the induction of salt tolerance differed markedly from species to species (1 μM–10 mM). Whether this reflects different adsorption efficiencies between plants or differences in the EC_{50} for the induction of the required genes or changes in physiology is unclear. In our study, the two different but genetically closely related rice lines with different salt tolerance levels responded differently to various concentrations of topically applied ABA. In the salt-sensitive LPT123 cultivar, exogenous ABA application increased the survival rate after growing in salt stress from 10% to 30%, whilst in the related salt-tolerant LPT123-TC171 line, up to 55% survival could be obtained after ABA treatment. Overall, an approximate 20% increase in the survival rate from salt stress was attained when the appropriate concentration of ABA was applied.

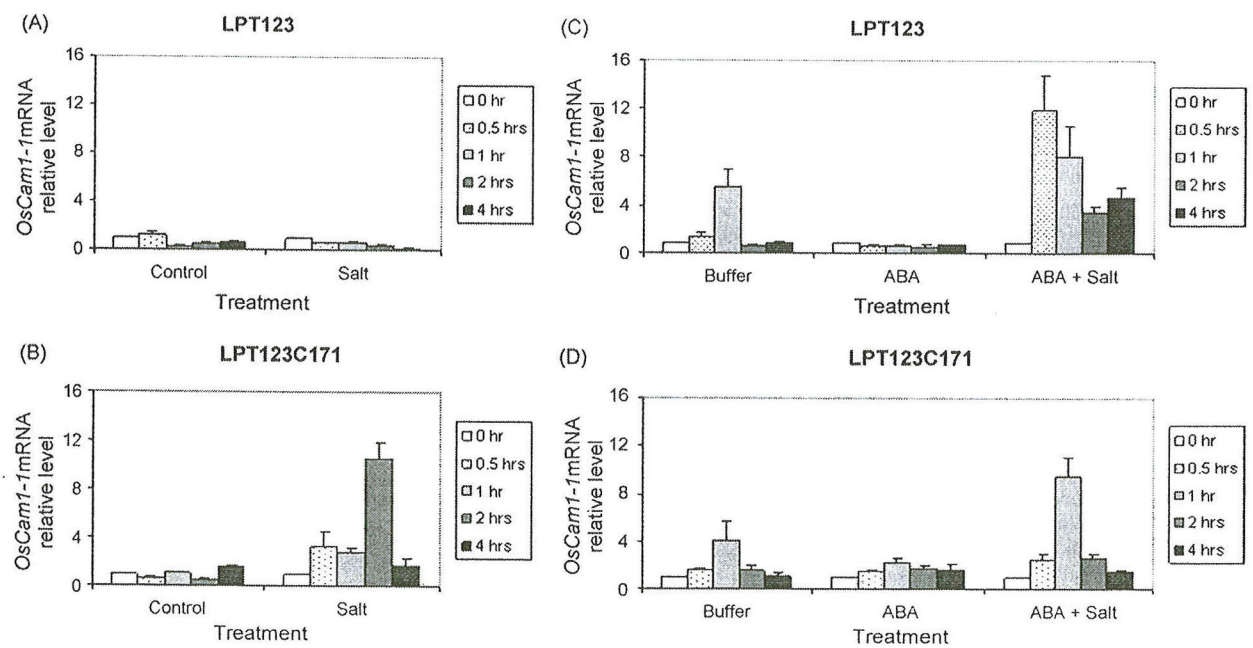


Fig. 10. *OsCam1-1* gene expression in LPT123 (A) and LPT123-TC171 (B) rice cultivars under normal (control) and salt-stress conditions. The effects of topical ABA application during normal (ABA) and salt-stress (ABA + salt) on *OsCam1-1* gene expression are also shown for both rice cultivars (C and D).

Please cite this article in press as: Sripinyowanich, S., et al., Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5Cs1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environ. Exp. Bot. (2010), doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

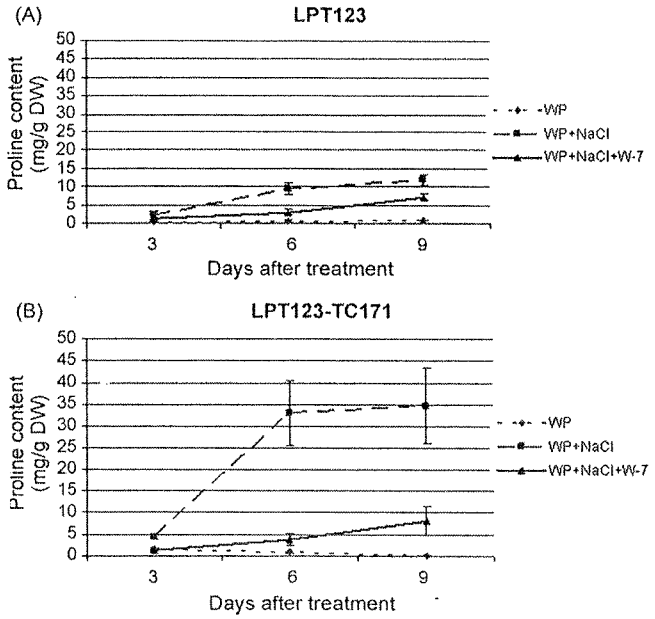


Fig. 11. The effects of the calmodulin inhibitor, W-7, on proline accumulation in LPT123 (A) and LPT123-TC171 (B) rice cultivars. The data are shown as the mean ± 1 SD and are derived from 4 repeats.

Bohra et al. (1995) reported an increase in the K^+/Na^+ ratio in rice following exogenous ABA application and concluded that the hormone might be a means to alleviate the natural reduction in the K^+/Na^+ ratio following NaCl-mediated salt stress, and thus facilitates salinity tolerance.

In this study, the topical application of ABA resulted in a significant increase in the shoot and root fresh weights in both the salt-susceptible and salt-resistant indica rice lines, but these were not in stoichometric accord with the changes in shoot and root dry weights, but rather were more marked, at least initially. This suggests that exogenous ABA plays an important role in water balance during salt stress. In this light, it is of note that ABA can induce stomatal closure (Taiz and Zeiger, 2004). Thus, in this scenario, the pretreatment of rice with topical ABA application may trigger the stomatal closure response, and thus reduce the water loss associated with salt stress, but at the cost of reduced photosynthetic anabolism.

Salt-stress-induced proline accumulation has been reported in many plant species, such as rice (Chou et al., 1991; Igarashi et al., 1997; Hien et al., 2003; Lutts et al., 1996), *Arabidopsis* (Finkelstein and Somerville, 1990) and cactus pears (Silva-Ortega et al., 2008), supporting the proposition that proline may act as an osmoprotectant (Christian, 1955). Proline also seems to be able to stabilize subcellular structures, to scavenge-free radicals (Smirnoff and Cumbes, 1989) and serve as a source of carbon and nitrogen (Kavi Kishor et al., 2005). The topical application of ABA to non-stressed plants is reported to trigger proline accumulation in several cultured plant species, including rice, barley, maize and peas (Stewart, 1980; Aspinall and Paleg, 1981; Hasson and Poljakoff-Mayber, 1983; Pesci, 1987; Chou et al., 1991; Dallmier and Stewart, 1992; Ober and Sharp, 1994; Fedina et al., 1994), which is in agreement with this study where the salt-resistant and salt-susceptible rice lines were both shown to accumulate proline during salt stress at levels which correlated with the degree of enhanced salt tolerance. However, the role of proline accumulation in rice remains equivocal with the suggestion that proline accumulation may only be an indirect symptom (consequence) of salt-stress injury (Lutts et al., 1996, 1999) instead of being directly related to salt tolerance (Igarashi et al., 1997; Hien et al., 2003).

In this report, the level of proline accumulation observed in leaves in response to ABA or salt stress is consistent with a direct role of proline in salt tolerance. The salt-tolerant LPT123-TC171 line accumulated proline faster than the salt-sensitive LPT123 cultivar and to a higher level after 6 days of salt stress. However, the salt-sensitive rice cultivar reached a maximal observed proline level on Day 9 after treatment, whilst the salt-tolerant line did not appear to reach its maximum level within the 12-day period assayed (Fig. 4). Interestingly, this is somewhat inconsistent with a previous study of proline accumulation in rice plant tissues (Hien et al., 2003), which reported that, following salt stress, proline accumulation in the root of salt-tolerant cultivars started earlier than that of the susceptible plants. It is not clear then if this reflects tissue tropism (roots versus leaves), different plants (genetics) or experimental approaches.

The two rice *P5CS* gene homologues, *OsP5CS1* and *OsP5CS2*, have been linked to both proline accumulation and to salt-stress tolerance in rice. The *OsP5CS1* and *OsP5CS2* transcript levels were shown to correlate strongly with proline accumulation during salt stress in three rice cultivars that differed in their salt and drought tolerance levels (Hien et al., 2003), whilst drought, cold and saline stress, in addition to exogenous ABA application, induced *OsP5CS1* gene expression in rice (Hur et al., 2004; Igarashi et al., 1997). The two homologues, however, show different tissue and kinetic responses. Rice treated with NaCl or ABA showed a higher level of *OsP5CS1* transcript expression than that of *OsP5CS2* (Hur et al., 2004). In *Arabidopsis*, which also has two *P5CS* gene homologues, a similar differential expression pattern between the two homologs has been reported (Strizhov et al., 1997; Yoshiba et al., 1999; Abraham et al., 2003) and ABA-independent and ABA-dependent regulations of proline biosynthesis following cold and osmotic stress have been characterized (Savouré et al., 1997).

Given the widely prevalent and conserved nature of *P5CS* homologous genes across phylogenetically diverse higher plants, it seems probable that this proline synthesis pathway should exist in all plant species. Here, we provide data consistent with the notion that ABA is involved in *OsP5CS1* transcript induction, as topical ABA application-induced *OsP5CS1* transcript expression under normal growth conditions, whilst application of the ABA biosynthetic inhibitor, abamine SG, inhibited the salt-stress induction of *OsP5CS1* transcript levels. Furthermore, the notion of *OsP5CS1* induction by ABA was additionally supported when we analyzed the putative promoter region of the *OsP5CS1* gene in indica rice. The six-nucleotide sequence of the ABA-responsive element (ABRE) (Marcotte et al., 1989) was found upstream and so likely binds transcription factors involved in the ABA-regulated gene activation during salt stress. Therefore, taken all together, we suggest that the salt-stress-induced *OsP5CS1* transcript expression in rice is controlled, at least in part, by an ABA-dependent pathway (Bray et al., 2000; Zhu, 2002).

Topical ABA application to leaves increased *OsP5CS1* transcript levels in both the salt-tolerant and the salt-susceptible rice lines at 3 days (or earlier since this was the first assayed time point) after commencement of the stress treatment, which is consistent with the suggested potential role of ABA in salt adaptation. However, we have neither earlier time points, to ascertain if this is an early or a late response, nor data on (post) translational protein and enzyme activity levels, to confirm actual enzyme activity levels and thus be independent of any post-translational control. Nevertheless, assuming transcript levels to reflect enzyme activity levels, in this scenario the prior application of ABA would be envisaged to induce ABA-responsive genes (Huang and Wu, 2006), some of which may play a role in salt tolerance.

Please cite this article in press as: Sripinyowanich, S., et al., Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environ. Exp. Bot. (2010), doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

In this study, we found that *OsP5CS1* transcript expression was more sensitive to ABA in the salt-tolerant rice line than the related salt-sensitive cultivar. Thus higher *OsP5CS1* transcript levels were detected in the salt-tolerant line during salt stress, and the observed proline accumulation levels in leaves broadly followed this pattern showing a good correlation with the *OsP5CS1* transcript levels. This is consistent with that reported by Hien et al. (2003), who showed that a salt-tolerant rice cultivar also accumulated a higher level of proline, but it differs in that, in contrast, they reported that comparable levels of *OsP5CS1* and *OsP5CS2* transcripts were found in their salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars. The different genetic backgrounds of the rice plants under investigation between, as well as within the Hien et al. study, are likely to affect the pattern of salt-stress responses. The two indica rice cultivars used in this study, LPT123 and LPT123-TC171, have a much greater similarity in their genetic background since the LPT123-TC171 is a salt-tolerant mutated line isolated from the LPT123 cultivar (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991; Thikart et al., 2005), whereas the rice cultivars used by Hien et al. (2003) likely had different genetic backgrounds between the salt-resistant and salt-tolerant lines used. If we accept this hypothesis for now, then the level of acquired proline may result from the overall outcome of different pathways in plants. The different sensitivity of the *OsP5CS1* transcript expression in response to salt stress, and the different sensitivity to ABA induction of *OsP5CS1* during salt stress, in the two rice lines used in this study (LPT123-TC171 and LPT123), together suggest that the salt tolerance of the LPT123-TC171 rice line may be caused by a mutation in the ABA signaling pathway, which includes the receptors and the signal transduction pathways that function to perceive ABA (Hirayama and Shinozaki, 2007). If that is so, then these rice lines may be useful for analysis of such receptors and pathways in the future.

As exogenous ABA did not clearly up-regulate *OsP5CS1* transcript levels in both rice lines examined, in contrast to the proline accumulation pattern found (Fig. 4), we further investigated if any other genes in the proline synthesis pathway were up-regulated by topical ABA application. Here, *OsP5CR* transcript levels were up-regulated after 3 and 6 days of the treatment, suggesting that this gene may be responsible for the higher level of proline accumulation when the exogenous ABA was applied, although this awaits confirmation.

To search for a possible perception or signal transduction pathway that is involved in this salt-stress response, the ABA content and expression level of *OsCam1-1* transcripts, the gene product of which is the salt responsive calmodulin in rice, were investigated. The ABA content in leaf tissues of both rice lines were found to be similar when grown under normal or salt-stress conditions, suggesting that the prior observed difference in proline accumulation is not due to the lack of accumulation of endogenous ABA levels in the salt-susceptible LPT123 cultivar.

With regard to the *OsCam1-1* gene expression, the salt-susceptible LPT123 cultivar failed to induce *OsCam1-1* gene expression after salt stress, whilst in the resistant LPT123-TC171 line it was significantly induced after 0.5 h of the treatment. However, the *OsCam1-1* transcript levels reported here in the LPT123 cultivar were different from those found in the Khoa Dawk Mali105 (KDML105) rice cultivar, where *OsCam1-1* was the major calmodulin transcript that was induced by salt stress (Phean-o-pas et al., 2005). Perhaps then the salt susceptibility of the LPT123 rice strain is due to the deficiency in salt-stress perception via the Ca^{2+} signal transduction cascade, as it had a lower level of *OsCam1-1* gene expression than the salt-resistant one. However, topical ABA application-induced *OsCam1-1* gene expression in both rice lines during salt stress, and so ABA can modify the perception and/or signal transduction involving *OsCam1-1* that may trigger salt-stress response in rice.

Topical ABA application alone did not up-regulate *OsP5CS1* transcript levels in the salt-susceptible LPT123 rice cultivar, even though exogenous ABA application lead to a higher proline accumulation level in both rice lines. This suggests that proline accumulation in the LPT123 rice cultivar does not directly result from the up-regulation of *OsP5CS1* expression, but rather is due to the induction of *OsP5CR* gene expression. In maize and wheat, the calmodulin inhibitor, TFP, was shown to decrease both the P5CR activity and the proline content during water stress (Nayyar, 2003), which is consistent with our result that the calmodulin inhibitor, W-7, could inhibit proline accumulation in response to salt stress in both rice lines.

5. Conclusion

We conclude that during salt stress, proline accumulation occurs via enhanced *OsP5CS1* gene expression, and that this involves both the calmodulin and ABA signaling cascades. However, proline accumulation due to exogenous ABA application is possibly enhanced via the induction of *OsP5CR* gene expression, which may have resulted from the up-regulation of *OsCam1-1* in rice.

Acknowledgements

This research was supported by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, Grant No. BT-01-RG-09-4711, the Thai government budget 2009, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity, the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University (CEB_D_16_2009), the support from Research Funds from the Faculty of Science, Chulalongkorn University, and the Commission on Higher Education. SS was supported by a Chulalongkorn University Graduate Scholarship to Commemorate the 72nd Anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej, and PK was supported by Development and Promotion of Science and Technology Talents project, Thailand. Authors would like to thank Prof. Dr. Anchalee Tassanakajon and Assist. Prof. Dr. Ausanee Pichkam for providing the facilities for this research. We thank Dr. Robert Bucher, PCU, Faculty of Science,Chulalongkorn University, for useful comments and English language proof reading.

References

Abraham, E., Rigo, G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C., Szabados, L., 2003. Light-dependent induction of proline biosynthesis by absiscic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. Plant Mol. Biol. 51, 363–372.

Amzallag, G.N., Lerner, H.R., Poljakoff-Mayber, A., 1990. Exogenous ABA as a modulator of the response of *Sorghum* to high salinity. J. Exp. Bot. 41, 1529–1534.

Aspinall, D., Paleg, L.G., 1981. Proline accumulation: physiological aspects. In: Paleg, L.G., Aspinall, D. (Eds.), Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants. Academic Press, Sydney, Australia, pp. 205–224.

Bangyeekhun, T., Chadchawan, S., Boon-Long, P., 2004. Salt tolerance induction in Thai soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) by NaCl pretreatment. Thai J. Agric. Sci. 37, 25–32.

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39, 205–207.

Bohra, J.S., Dorffling, H., Dorffling, K., 1995. Salinity tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) with reference to endogenous and exogenous abscisic acid. J. Agron. Crop Sci. 174, 79–86.

Boyer, J.S., 1982. Plant productivity and environment. Science 218, 443–448.

Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 1158–1203.

Boonburapong, B., Buaboocha, T., 2007. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. BMC Plant Biol. 7, 4.

Chandler, P.M., Robertson, M., 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 113–141.

Chou, I.T., Chen, C.T., Kao, C.H., 1991. Characteristics of the induction of the accumulation of proline by abscisic acid and isobutyric acid in detached rice leaves. Plant Cell Physiol. 32, 269–272.

Please cite this article in press as: Sripinyowanich, S., et al., Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. Environ. Exp. Bot. (2010), doi:10.1016/j.envexpbot.2010.01.009

Christian, J.H., 1955. The influence of nutrition on the water relation of *Salmonella oranienburg*. Aust. J. Biol. Sci. 8, 75–82.
Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J. 4, 215–223.
Dallmier, K.A., Stewart, C.R., 1992. Effect of exogenous abscisic acid on proline dehydrogenase activity in maize (*Zea mays* L.). Plant Physiol. 99, 762–764.
Demiral, T., Türkan, I., 2006. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. Environ. Exp. Bot. 56, 72–79.
Fedina, I.S., Tsonev, T.D., Guleva, E.I., 1994. ABA as a modulator of the response of *Pisum sativum* to salt stress. J. Plant Physiol. 143, 245–249.
Finkelstein, R.R., Somerville, C.R., 1990. Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of Arabidopsis define genes that control overlapping subsets of ABA responses. Plant Physiol. 94, 1172–1179.
Gómez-Cardenas, A., Arbona, V., Jacas, J., Primo-Millo, E., Talon, M., 2003. Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. J. Plant Growth Regul. 21, 234–240.
Hasson, E., Poljakoff-Mayber, A., 1983. Changes in osmolarity and solute content of pea plants exposed to salinity and abscisic acid. Aust. J. Plant Physiol. 10, 573–583.
Hien, D.T., Jacobs, M., Angenon, G., Hermans, C., Thu, T.T., Son, L.V., Roosens, N.H., 2003. Proline accumulation and Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. Plant Sci. 165, 1059–1068.
Hirayama, T., Shinozaki, K., 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. Trends Plant Sci. 12, 343–351.
Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P., 2000. Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol. 122, 1129–1136.
Hu, C.A., Delauney, A.J., Verma, D.P., 1992. A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 9354–9358.
Huang, M.-D., Wu, W.-L., 2006. Genome-wide in silico identification and experimental confirmation of abscisic acid-regulated genes in *Arabidopsis*. Plant Sci. 170, 986–993.
Hur, J., Jung, K.H., Lee, C.-H., An, G., 2004. Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. Plant Sci. 167, 417–426.
Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Shinozaki, K., 1997. Characterization of the gene for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. Plant Mol. Biol. 33, 857–865.
Jiménez-Bremont, J.F., Becerra-Flora, A., Hernández-Lucero, E., Rodríguez-Kessler, M., Acosta Gallegos, J.A., Ramírez-Pimentel, J.G., 2006. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. Biol. Plant. 50, 763–766.
Karmoker, J.L., Van Steveninck, R.F.M., 1979. The effect of abscisic acid on the uptake and distribution of ions in intact seedlings of *Phaseolus vulgaris* cv. Redland Pioneer. Physiol. Plant. 45, 453–459.
Khadri, M., Tejera, N.A., Lluch, C., 2007. Sodium chloride–ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. Environ. Exp. Bot. 60, 211–218.
Kavi Kishor, P.B., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C., Verma, D.P.S., 1995. Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol. 108, 1387–1394.
Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Curr. Sci. 88, 424–438.
Kitahata, N., Han, S.Y., Noji, N., Saito, T., Kobayashi, M., Nakano, T., Kuchitsu, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Matsumoto, S., Tsujimoto, M., Asamia, T., 2006. A 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase inhibitor for use in the elucidation of abscisic acid action mechanisms. Biol. Med. Chem. 14, 5555–5561.
Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F., 2002. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. Plant Physiol. 130, 2129–2141.
Leung, J., Giraudat, J., 1998. Abscisic acid signal transduction. Annu. Rev. Plant Physiol. 49, 199–222.
Lutts, S., Majerus, V., Kinet, J.M., 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. Physiol. Plant. 105, 450–458.
Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmont, J., 1996. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Plant Growth Regul. 19, 207–218.
Marcotte Jr., W.R., Russell, S.H., Quatrano, R.S., 1989. Abscisic acid-responsive sequences from the *em* gene of wheat. Plant Cell 1, 969–976.
McCue, K.F., Hanson, A.D., 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Trends Biotechnol. 8, 358–362.
Mills, D., Zhang, G., Benzioni, A., 2001. Effect of different salt and of ABA on growth and mineral uptake in jojoba shoots grown in *vitro*. J. Plant. Physiol. 158, 1031–1039.
Nambara, E., Marion-Poll, A., 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 165–185.
Nayyar, H., 2003. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stress wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. Environ. Exp. Bot. 50, 253–264.
Ober, E.S., Sharp, R.E., 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. Plant Physiol. 105, 981–987.
Phean-o-pas, S., Limpaseni, T., Buaboocha, T., 2008. Structure and expression analysis of the *OsCam1-1* calmodulin gene from *Oryza sativa* L. BMB Rep. 41, 771–777.
Phean-o-pas, S., Punteeranurak, P., Buaboocha, T., 2005. Calcium signaling-mediated and differential induction of calmodulin gene expression by stress in *Oryza sativa* L. J. Biochem. Mol. Biol. 38, 432–439.
Pesci, P., 1987. ABA-induced proline accumulation in barley leaf segments: dependence on protein synthesis. Physiol. Plant. 71, 287–291.
Savouré, A., Hua, X.J., Bertauche, N., van Montagu, M., Verbruggen, N., 1997. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 254, 104–109.
Sawahel, W.A., Hassan, A.H., 2002. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant praline. Biotechnol. Lett. 24, 721–725.
Silva-Ortega, C.O., Ochoa-Alfaro, A.E., Reyes-Aguero, J.A., Aguado-Santacruz, G.A., Jimenez-Bremont, J.F., 2008. Salt stress increases the expression of *P5CS* gene and induces proline accumulation in cactus pear. Plant Physiol. Biochem. 46, 82–92.
Smirnoff, N., Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochemistry 28, 1057–1060.
Stewart, C.R., 1980. The mechanism of abscisic acid-induced proline accumulation in barley leaves. Plant Physiol. 66, 230–233.
Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., Szabados, L., 1997. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in Arabidopsis. Plant J. 12, 557–569.
Taiz, L., Zeiger, E., 2004. Plant Physiology, 4th ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Massachusetts.
Thikart, P., Kowanij, D., Selanan, T., Vajrabhaya, M., Bangyeekhun, T., Chadchawan, S., 2005. Genetic variation and stress tolerance of somaclonal variated rice and its original cultivar. J. Sci. Res. Chula. Univ. 30, 63–75.
Tripathi, S.B., Gurumurthi, K., Panigrahi, A.K., Shaw, B.P., 2007. Salinity induced changes in proline and betaine contents and synthesis in two aquatic macrophytes differing in salt tolerance. Biol. Plant. 51, 110–115.
Türkan, I., Demiral, T., 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. Environ. Exp. Bot. 67, 2–9.
Vajrabhaya, M., Vajrabhaya, T., 1991. Somaclonal variation of salt tolerance in rice. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, 14. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 368–382.
Xiang, Y., Huang, Y., Xiong, L., 2007. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. Plant Physiol. 144, 1416–1428.
Xue, X., Liu, A., Hua, X., 2009. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biothesynthesis and degradation in *Brassica napus*. BMB Rep. 42, 28–34.
Yang, S.-H., Choi, D., 2006. Characterization of genes encoding ABA 80-hydroxylase in ethylene-induced stem growth of deepwater rice (*Oryza sativa* L.). Biochem. Biophys. Res. Commun. 350, 685–690.
Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y., Shinozaki, K., 1995. Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. Plant J. 7, 751–760.
Yoshiba, Y., Nanjo, T., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1999 Stress-responsive and developmental regulation of Δ^1-*pyrroline-5-carboxylate synthetase 1* (*P2CS1*) gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 261, 766–772.
Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 53, 247–273.

