รายงานการวิจัย

เรื่อง

ความหลากหลายทางชนิด การแพร่กระจาย ตัวอาศัย และสารซึ่งมีคุณสมบัติทางยาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล Cordyceps (Clavicipitaceae) ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ระยะที่ 3

Species Diversity, Distribution, Hosts, and Medicinal Substances of Entomopathogenic Fungi, Genus Cordyceps (Clavicipitaceae) in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province (Phase III)

รุ่งเกียรติ แก้วเพชร

ศมาพร แสงยศ

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ความหลากหลายทางชนิด การแพร่กระจาย ตัวอาศัย และสารซึ่งมีคุณสมบัติทางยาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล Cordyceps (Clavicipitaceae) ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ระยะที่ 3

Species Diversity, Distribution, Hosts, and Medicinal Substances of Entomopathogenic Fungi, Genus Cordyceps (Clavicipitaceae) in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province (Phase III)

รุ่งเกียรติ แก้วเพชร

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

ศมาพร แสงยศ

คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2560)

หัวข้อวิจัย	ความหลากหลายทางชนิด การแพร่กระจาย ตัวอาศัย และสารซึ่งมีคุณสมบัติทางยาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล *Cordyceps* (Clavicipitaceae) ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ระยะที่ 3
ผู้ดำเนินการวิจัย	รุ่งเกียรติ แก้วเพชร และศมาพร แสงยศ
ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนะศึก นิชานนท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชชา ฉิมพลี
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปี พ.ศ.	2561

วัตถุประสงค์ของโครงการนี้ คือ การศึกษาความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ในจังหวัด เชียงใหม่ โดยการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างและศึกษาการแพร่กระจายและตัวอาศัย เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ด้านข้อมูลเชิงความหลากหลายทางชีวภาพ และการระบุแหล่งที่อยู่สำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาต่อยอดอื่นๆ ในช่วงระหว่างเดือนกันยายน 2558-กันยายน 2559 สามารถรวบรวมตัวอย่างได้ 71 ตัวอย่าง มีการแพร่กระจายในทุกพื้นที่สำรวจในพิกัดระหว่างเส้นรุ้งที่ 18 องศา 58 ลิปดา 91 พิลิปดาเหนือ ถึง 18 องศา 54 ลิปดา 13 พิลิปดาเหนือ (พิกัด UTM; 2063808 N) และเส้นแวงที่ 98 องศา 48 ลิปดา 70 พิลิปดาตะวันออก (พิกัด UTM; 436635 E) ถึง 98 องศา 59ลิปดา 93 พิลิปดาตะวันออก ที่ระดับความสูง 756 – 2,560 เมตร จากระดับน้ำทะเลโดยเฉลี่ย ได้พบและรวบรวมเชื้อราสองชนิด คือ*Ophiocordyceps irangiensis* ซึ่งลงทำลายมด และ*Ophiocordyceps myrmecophilaa* ซึ่งลงทำลายตัวอ่อนจักจั่น ทั้งนี้เชื้อราทั้งสองชนิดดังกล่าว มีค่าดัชนีความหลากหลายทางชีวภาพ Shannon-Weiner Index = 0.52 โดยได้มีการจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเพื่อใช้ประโยชน์ ในระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic information system - GIS)

Research Title	Species Diversity, Distribution, Hosts, and Medicinal Substances of Entomopathogenic Fungi, Genus *Cordyceps* (Clavicipitaceae) in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province (Phase III)
Researchers	Rungkiat Kawpet and Samaporn Saengyot
Research Consultant	Asst. Prof. Dr. Chanasuek Nichanong, Asst. Prof. Witcha Chimphlee,
Organizations	Faculty of Science and Technology Suan Dusit University Plant Protection Program Faculty of Agricultural Production Mae Jo University
Year	2018

The objectives of this project are to investigate the species diversity, distribution and hosts of the entomopathogenic fungi in the genus Ophiocordyceps (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province. The investigation was carried out by surveying and field collecting of the specimens for their distribution and hosts to obtain biodiversity data and for further utilization and top-up study. During September 2014 to September 2015 a total of 71 samples were found and collected at all the sampling sites ranging from latitude 18°58'91" N to 18°54'13"N (UTM; 2063808 N) and longitude 98°48'70" (UTM; 436635 E) to 98°59' 93" E and at 756 – 2,560 m above the mean sea level (MSL). Two species found and collected were Ophiocordyceps irangiensis infecting ants and Ophiocordyceps myrmecophilaa infecting cicada nymphs. Both Ophiocordyceps spp. showed the Shannon-Weiner Index of 0.52. The distribution map was constructed for use in the Geographic information system (GIS).

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องความหลากหลายทางชนิด การแพร่กระจาย ตัวอาศัย และสารซึ่งมีคุณสมบัติทางยาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล Cordyceps (Clavicipitaceae) ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ระยะที่ 3 ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ประเมินผลสนับสนุนโครงการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนะศึก นิชานนท์ รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและพัฒนาการศึกษา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชชา ฉิมพลี คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ปรึกษางานวิจัย

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการแนะนำและอำนวยความสะดวก และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์เวลาและสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ สถานที่ รวมทั้งการประสานงาน

ขอขอบพระคุณ ผู้ประสานงานห้องปฏิบัติการการควบคุมโดยชีววิธี (MJU Biological Control Laboratory – MJU-BCL) หลักสูตรอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ที่สนับสนุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ประสานงานในพื้นที่ศึกษาอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ กับ ขอขอบพระคุณ หน่วยงาน เจ้าของสถานที่ และ บุคคลากร ที่ให้ความสะดวกในการดำเนินการวิจัย แต่มิได้เอ่ยนามมา ณ โอกาสนี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

2561

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัย	3
สมมติฐานการวิจัย	3
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
เชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps*	6
ลักษณะพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ.เชียงใหม่	12
การแยกและการทำโพลีแซคคาไรด์ในถั่งเช่า (Cordyceps) ให้บริสุทธิ์ (Purification)	14
กรอบแนวคิดในการวิจัย	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	22
สำรวจและรวบรวมตัวอย่างแมลงและแมงมุมที่ติดเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps*	22
จำแนกชนิด ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ของเชื้อราโรคแมลงในในสกุล *Ophiocordyceps*	24
การวิเคราะห์ข้อมูลด้านนิเวศวิทยาประชากรและจัดทำแผนที่การแพร่กระจายของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps*	24
ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล Ophiocordyceps ที่พบจากแมลงตามพิกัดต่างๆ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยคัดเลือกอาหารเทียมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิด	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การสกัดแยกและศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่มี β-Glucan ที่พบจากแมลงตามพิกัดต่างๆ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	28
บทที่ 4 ผลการวิจัย	32
การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างแมลงและแมงมุมที่ติดเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps*	32
จำแนกชนิด ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ของเชื้อราโรคแมลงในในสกุล *Ophiocordyceps*	32
การวิเคราะห์ข้อมูลด้านนิเวศวิทยาประชากรและจัดทำแผนที่การแพร่กระจายของเชื้อราโรคแมลงในในสกุล *Ophiocordyceps*	33
ผลการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล Ophiocordyceps ที่พบโดยคัดเลือกอาหารเทียมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิด	47
การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อรา *Ophiocordyceps* ที่มี β-Glucan	50
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวภาพของเชื้อรา *Ophiocordyceps*	55
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	57
สรุปผลการวิจัย	57
อภิปรายผล	58
ข้อเสนอแนะในการนำผลงานวิจัยไปใช้และการทำวิจัยครั้งต่อไป	61
บรรณานุกรม	62
บรรณานุกรมภาษาไทย	62
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	63
ภาคผนวก	70
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม	71
ภาคผนวก ข การคำนวณค่า cordycepin และ adenosine content	74
ภาคผนวก ค การคำนวณค่ากรอะมิโน	77
ประวัติผู้วิจัย	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ผลการรวบรวมตัวอย่างแมลงและแมงมุมที่ติดเชื้อราโรคแมลงในสกุล Ophiocordyceps ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่	34
4.2	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ Ophiocordyceps ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ บ่มที่ อุณหภูมิ ห้อง (27 ± 2° C) เป็นเวลา 15-60 วัน	48
4.3	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ Ophiocordyceps ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 15-60 วัน	49
4.4	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ Ophiocordyceps ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ pH ต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25° C เป็นเวลา 15-60 วัน	50
4.5	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อรา Ophiocordyceps (% นน.แห้ง)	51
4.6	สารต้านอนุมูลอิสระและ antioxidant activity ของเชื้อรา *Ophiocordyceps* ชนิดต่างๆ	53
4.7	ปริมาณ Beta-glucan ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Ophiocordyceps*	54
4.8	ปริมาณ beta glucan ที่ละลายน้ำได้ ในเชื้อรา *O. myrmecophila*	55
4.9	ปริมาณ Cordycepin และ Adenosine จากเชื้อรา *Ophiocordyceps*	55
4.10	ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ จากเชื้อรา *Ophiocordyceps*	56

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของหนอนผีเสื้อที่ถูกทำลายจากเชื้อรา *Ophiocordyceps sinensis* หรือที่เรียกว่า ถั่งเช่า (Dōng-chóng-xià-cǎo)	9
2.2	แผนที่การแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps sinensis* ในเขตปกครองตนเองธิเบต ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน	10
2.3	เชื้อรา *Ophiocordyceps* ชนิดต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างได้จากประเทศเนปาล ได้แก่ *O. gracilis* (a); *O. ishikariensis* (b); *O. liangshanensis* (c); *O. martialis* (d); *O. militaris* (e); *O. nutans* (f); *O. pruinosa* (g); *O. sinensis* (h); *O. sphecocephala* (i) และ *O. tricentri* (j) ตามลำดับ	10
2.4	ลักษณะส่วน stroma (A) สปอร์ (B) และ ascus (C) ของเชื้อรา *Ophiocordyceps* ที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา)	11
2.5	การเจริญและการเก็บเกี่ยว *Cordyceps sinensis* ในฤดูหนาวลักษณะคล้ายหนอนไหมแก่ในดิน (A), ฤดูร้อน เจริญพ้นดินกลายเป็นหญ้า (B), ลักษณะพร้อมเก็บเกี่ยวในฤดูร้อน (C, D) และ เก็บรักษาและขายเป็นวัตถุดิบแห้ง (E)	11
2.6	ลักษณะพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่	14
2.7	การสกัดแยกและทำโพลีแซคคาไรด์ให้บริสุทธิ์จาก *Cordyceps*	21
3.1	ภาพถ่ายลักษณะพื้นที่จุดที่เก็บตัวอย่างเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ได้แก่ ได้แก่ บริเวณยอดดอยอินทนนท์ (ก.) กิ่วแม่ปาน (ข.) น้ำตกสิริภูมิ (ค.) น้ำตกวชิรธาร (ง.) และ น้ำตกแม่กลาง (จ.)	23
3.2	แผนที่จุดสำรวจเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์	25
4.1	การแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ที่ทำลายแมลง ซึ่งพบในพื้นที่ศึกษา อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 - กันยายน 2559	39
4.2	จุดที่พบการแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. เข้าทำลายตัวอ่อนจั๊กจั่น ซึ่งพบในพื้นที่ศึกษา อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 - กันยายน 2559	40
4.3	จุดที่พบการแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. เข้าทำลายมด ซึ่งพบในพื้นที่ศึกษา อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 - กันยายน 2559	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.4	จุดที่พบการแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. เข้าทำลายหนอนของแมลงที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ ซึ่งพบในพื้นที่ศึกษา อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 - กันยายน 2559	42
4.5	เชื้อรา *Ophiocordyceps irangiensis* ที่ทำลายมดซึ่งพบในเขตอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558- กันยายน 2559	43
4.6	ลักษณะอาการและสปอร์ของเชื้อรา *Ophiocordyceps irangiensis* ซึ่งพบบริเวณวนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558- กันยายน 2559	43
4.7	ลักษณะอาการและสปอร์ของเชื้อรา *Ophiocordyceps myrmecophilaa* ที่ทำลายจักจั่น ซึ่งพบ บริเวณวนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558- กันยายน 2559	44
4.8	ลักษณะอาการและสปอร์ของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ซึ่งทำลายแมลงชนิดต่างๆ ได้แก่หนอนผีเสื้อ (ก.) ด้วง (ข.) และ ผึ้ง (ค.) ซึ่งพบบริเวณวนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558- กันยายน 2559	45
4.9	ปริมาณตัวอย่างของเชื้อราชนิดต่างๆที่พบทำลายแมลงในพื้นที่สำรวจ ในเขตวน อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558- กันยายน 2559	46
4.10	การขึ้นลงของประชากรของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ชนิดต่างๆที่พบทำลายแมลงในพื้นที่สำรวจ ในเขตวนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558- กันยายน 2559	46
4.11	แผนที่การแพร่กระจายของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบทำลายแมลงในพื้นที่สำรวจ ในเขตวนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558- กันยายน 2559	47

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

วินันท์ดา หิมะมาน และคณะ (2554, น.13) รายงานว่ามีเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง หรือเชื้อราโรคแมลง (Entomopathogenic fungi) มากกว่า 400 ชนิดในประเทศไทย ซึ่งรวมถึงเชื้อราในสกุล *Cordyceps* และ *Ophiocordyceps* ด้วย และ Sung *et al*. (2007, pp. 5-59) ได้ทำการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล ทำการแยกวงศ์ Clavicipitaceae เสนอวงศ์ใหม่คือวงศ์ Ophiocordycipitaceae ทำการปรับชื่อวิทยาศาสตร์บางสกุล เช่น *Cordyceps* ให้เป็น*Ophiocordyceps* และ เสนอสกุลใหม่ของเชื้อราในสกุล Cordyceps จากกลุ่มต่างๆ และรายงานว่า ตั้งแต่ดั้งเดิมเชื้อราในสกุล *Cordyceps* ทั้งหมด ถูกจัดไว้ในวงศ์ Clavicipitaceae แต่จากการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลและความสัมพันธ์ทางการวิวัฒนาการชาติพันธ์ (phylogenetic relationships) ของกลุ่มอนุกรมวิธาน 162 กลุ่ม Sung *et al*. (2007, pp. 5-59) พบว่าวงศ์ Clavicipitaceae ประกอบด้วย 3 แขนงย่อยทางอนุกรมวิธาน (clades) จึงแก้ไขและแยกออกเป็น 3 วงศ์ คือ Clavicipitaceae, Cordycipitaceae พร้อมกับเสนอตั้งวงศ์ใหม่ขึ้นมาคือวงศ์ Ophiocordycipitaceae ซึ่งใช้เชื้อราโรคแมลงสาบ *Ophiocordyceps blattae* (Petch) Petch (1931) เป็นรูปแบบชนิด (type species) พร้อมปรับเชื้อราในสกุล *Cordyceps* หลายชนิด ให้ยังคงอยู่ในสกุล *Cordyceps* ในวงศ์ Cordycipitaceae แต่อีกหลายชนิดย้ายไปอยู่ในสกุล *Ophiocordyceps* กับสกุลที่เสนอขึ้นมาใหม่ คือ *Elaphocordyceps* และให้อยู่ในวงศ์ Ophiocordycipitaceae กับเสนอ *Metacordyceps* ให้เป็นสกุลใหม่อีกสกุลหนึ่งอยู่ในวงศ์ Clavicipitaceae โดยทำให้ชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อรา “ถั่งเช่า” ที่เคยมีการใช้คือ *Cordyceps sinensis* เปลี่ยนไปเป็น *Ophiocordyceps sinensis* กับทั้งได้จัดทำบัญชีรายชื่อที่เป็นที่ยอมรับ (accepted names) ของเชื้อราชนิดต่างๆ ในสกุล *Cordyceps, Elaphocordyceps, Metacordyceps* และ *Ophiocordyceps* พร้อมกันไปไว้ด้วยในรายงานดังกล่าว

ประเทศไทยเป็นแหล่งซึ่งมีความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราโรคแมลงสูงแหล่งหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราโรคแมลงในวงศ์ Cordycipitaceae, Clavicipitaceae และ Ophiocordycipidae ใน Division (Phylum) Ascomycota และ อันดับ Hypocreales โดยในประเทศไทยมีรายงานว่าเชื้อราโรคแมลงสกุล *Cordyceps* ในวงศ์ Cordycipitaceae และ สกุล *Ophiocordyceps* ในวงศ์ Ophiocordycipidae เป็นสกุลที่พบมากที่สุด (สุชาดา มงคลสัมฤทธิ์ และคณะ, 2553, pp.163) กับมีรายงานการพบเชื้อรา *Cordyceps* spp. สามชนิด ลงทำลายหนอนจักจั่น (cicada larvae) [ซึ่งที่ถูกต้องควรเป็นตัวอ่อนจักจั่น (cicada nymphs)] เป็นครั้งแรกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยพบที่ อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ หนึ่งชนิด และอำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคามสองชนิด แต่มิได้ตั้งชื่อใหม่หรือแยกชนิดออกมา (Srivilai *et al*., 2013, pp. 587-595) ซึ่งอาจจะเป็น *Cordyceps cicadae* ที่พบในประเทศไทย (Hsu *et al*. 2015, p.432) หรือเป็นเชื้อราที่เรียกว่า cicada flower (*Cordyceps myrmecophilaa*) ในอดีต หรือ *Ophiocordyceps myrmecophilaa* (Zhu *et al*., 2016, pp.619-627) ในปัจจุบันก็ได้

อนึ่งเชื้อราโรคแมลง *Ophiocordyceps* spp. หลายชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการเกษตร ทางการแพทย์และเภสัชกรรม เช่นการใช้เป็นยาเชื้อ (microbial insecticides) ทั้งในรูปสูตรสำเร็จ (formulations) และโดยการผลิตด้วยเทคโนโลยีพื้นบ้านอย่างง่าย สำหรับการควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่นเดียวกับเชื้อราขาว *Beauveria bassiana* เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* และ *Paecilomyces* spp. เป็นต้น (Copping, 2001, p.702) ส่วนด้านการแพทย์และเภสัชกรรม มีรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางยาของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Ophiocordyceps sinensis* (*Cordyceps sinensis*) หรือ เชื้อราที่รู้จักกันดีในชื่อ "ถั่งเช่า" (DŌng-chóng-xià-căo หรือสั้นๆ คือ Chóng căo) บนตัวหนอนผีเสื้อกลางคืนในสกุล *Thitarodes* (Lepidoptera: Hepialidae) ที่เรียกว่า "ghost moth" ซึ่งมีรายงานว่ามีการนำเชื้อรานี้ได้มาใช้เป็นสมุนไพรจีนมาตั้งแต่ยุคจีนโบราณ (Jone, 1993) ในด้านข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ มีรายงานพบว่าเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* บางชนิด สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีฤทธิ์ทางยาและเภสัชกรรม ได้แก่ สาร cordycepin, ophicordin, galactomannan และ polysaccharide ซึ่งเป็นสารชีวภาพที่สามารถตรวจพบได้จากส่วนก้านชูสปอร์ (fruiting body) ของเชื้อรา โดยหลังจากการทดสอบพบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อการก่อเซลล์เนื้อร้าย (antitumor) ต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial) และ ต่อต้านเชื้อรา (antifungal) เป็นต้น (Jin *et al*., 1999, pp. 891-898) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *O. sinensis* ซึ่งเป็นชนิดที่พบทำลายหนอนผีเสื้อในสกุล *Thitarodes* ในพื้นที่สูงในแถบเขตปกครองตนเองธิเบต ประเทศจีน ที่มีรายงานอ้างถึงมูลค่าทางการตลาดซึ่งสูงมาก (Evans and Samson, 1982, pp. 431-453) นอกจากนี้ยังมีรายงานอ้างว่ามีการตรวจพบกรดอมิโนที่จำเป็น (Essential amino acids) ไวตามิน K ไวตามิน B1 ไวตามิน B2 และ ไวตามิน B12 ในเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ด้วย (Holliday and Cleaver, 2008, pp. 219-234) ดังนั้นเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* จึงนับว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ให้ประโยชน์แก่มนุษย์โดยเฉพาะด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

มีรายงานกล่าวอ้างเกี่ยวกับจำนวนชนิดและความหลากหลายของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* บางส่วนแล้วทั้งในและต่างประเทศ (สุชาดา มงคลสัมฤทธิ์ และคณะ, 2553, pp 163; Evans and Samson, 1982, pp.431-453; Hywel-Jones, 1994, pp.939-942) แต่แม้กระนั้นก็ตามจากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งซึ่งมีความหลากหลายทางชนิดของจุลินทรีย์สูง อีกทั้งการมีแหล่งข้อมูลเกี่ยวกับการจำแนกชนิดเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. อย่างเป็นระบบซึ่งเพียงพอ สำหรับการศึกษาต่อยอดเพื่อให้เกิดองค์ความรู้เพื่อการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติทีมีอยู่ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ที่พบทำลายแมลงชนิดต่างๆ ทำการจำแนกชนิดจากการศึกษาระดับสัณฐานวิทยา การจำแนกชนิดของตัวอาศัย และการศึกษานิเวศวิทยาประชากร รวมทั้งวัดการแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. และจัดทำแผนที่การแพร่กระจายในพื้นที่ศึกษา เพื่อเป็นองค์ความรู้ และข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาต่อยอดในด้านชีวโมเลกุล และด้านชีวเคมีของสารเคมีที่ที่เกี่ยวข้องกับด้านสรรพคุณทางยาและเภสัชกรรมต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สำรวจรวบรวม จำแนกชนิด และศึกษาความหลากหลายทางชนิด ชนิดของตัวอาศัยของเชื้อราโรคแมลงสกุล *Ophiocordyceps* spp. ที่พบและรวบรวมได้ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

2. ศึกษานิเวศวิทยาประชากรและการแพร่กระจายของเชื้อราโรคแมลงสกุล *Ophiocordyceps* spp. ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

3. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบและรวบรวมได้ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ด้วยวิธีการที่เหมาะสม

4. ตรวจสอบ วิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณสารชีวภาพสำคัญบางชนิดของเชื้อราโรคแมลงสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์

ขอบเขตการวิจัย

ในปีที่สามนี้ (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560) จะทำการตรวจหาพร้อมทั้งวิเคราะห์และเปรียบเทียบระดับของสารชีวภาพสำคัญบางชนิดของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบและรวบรวมได้ในพื้นที่ อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ รวมจำนวน 5 จุด ได้แก่ 1) ยอดดอยอินทนนท์ 2) กิ่วแม่ปาน 3) น้ำตกสิริภูมิ 4) น้ำตกวชิรธาร และ 5) น้ำตกแม่กลาง จังหวัดเชียงใหม่

สมมติฐานการวิจัย

เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุลหนึ่งซึ่งมีความหลากหลายทางชนิดสูง อีกทั้งสามารถพบได้ในพื้นที่ประเทศไทยเป็นจำนวนกว่า 400 ชนิด ทั้งนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อรา *Ophiocordyceps* หลายชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ โดยมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีฤทธิ์ทางยาและเภสัชกรรมบางชนิด ที่มีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ต่อต้านเชื้อรา และแบคทีเรีย ซึ่งก่อโรคกับมนุษย์ รวมทั้งการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์ เช่นสาร cordycepin สาร ophicordin สาร galactomannan และสาร polysaccharide รวมทั้งอาจผลิตสารซึ่งอาจมีสรรพคุณทางยาอีกหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราที่ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ คือ “caterpillar fungus” หรือ *Ophiocordyceps sinensis* หรือ “ถั่งเช่า” ซึ่งพบในพื้นที่ซึ่งมีอากาศเย็นในพื้นที่สูงในแถบเทือกเขาหิมาลัย

แต่ทั้งนี้ยังมีเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ชนิดอื่นๆ ที่สามารถตรวจพบว่าสามารถผลิตสารชีวภาพดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นได้เช่นกันในประเทศไทย เช่น พื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่หนึ่งที่มีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพ รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อีกทั้งยังเป็นพื้นที่ซึ่งมีสภาพอากาศเย็น จึงน่าที่

จะมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ซึ่งบางชนิดอาจมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีฤทธิ์ทางยาและเภสัชกรรม

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

การแพร่กระจายเชิงพื้นที่ (Spatial distribution) หมายถึง รูปแบบการกระจายตัวหรือกระจุกตัว (การจัดเรียง) ของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งในพื้นผิวโลกและลักษณะภูมิศาสตร์ โดยเป็นไปตามปรากฏการธรรมชาติ (Wikipedia, 2014)

ถั่งเช่า (Chóng cǎo) หรือ ตังถั่งเช่า (Dōng chóng cǎo) หรือ ตังถั่งแห่เช่า (Dōng chóng xià cǎo) หมายถึง สมุนไพรจีน มีความหมายว่า "หญ้าหนอน" หรือ "ฤดูหนาวเป็นหนอน ฤดูร้อนเป็นหญ้า" เกิดจากหนอนผีเสื้อแถบที่ราบสูงธิเบต ที่จำศีลอยู่ใต้ดินในฤดูหนาว ถูกสปอร์ของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* อาศัยเป็นปรสิตและเติบโตสร้างเส้นใยออกมาทางส่วนหัวของตัวหนอนในฤดูร้อน เชื้อราชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ophiocordyceps sinensis* (สารานุกรมเสรี, มปป.)

เชื้อราโรคแมลง (Entomopathogenic fungi) หมายถึงเชื้อราที่เข้าทำลายแมลง สามารถเจริญเติบโต ขยายพันธุ์ และเพิ่มปริมาณได้ในตัวของแมลง ซึ่งทำให้เกิดโรคกับแมลงโดยขบวนการต่างๆ เช่นการใช้อาหารจากตัวแมลง และ/หรือ การสร้างสารพิษกับแมลง (Steinhaus, 1967, p.756)

แผนที่การแพร่กระจาย หรือ แผนที่แสดงลักษณะเฉพาะเรื่อง (Distribution Map) หรือ แผนที่การแพร่กระจายแบบจุด (Dot distribution map หรือ Dot density map) หมายถึง แผนที่ประเภทหนึ่งซึ่งแสดงลักษณะตามธรรมชาติของสิ่งที่เราสนใจ เช่น จุดที่พบสิ่งมีชีวิตที่เป็นเป้าหมายในการศึกษา ซึ่งจะเชื่อมโยงและบ่งบอกการแพร่กระจายเชิงพื้นที่ได้

เทเลโอมอร์ฟ (Teleomorph) หมายถึง ระยะการเจริญซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่ง

เพอริเธเซีย (Perithecia) หมายถึง ส่วนผลิตสปอร์ของเชื้อรากลุ่ม Ascomycota ซึ่งห่อหุ้ม asci โดยอาจมีรูปร่างคล้ายขวดรูปชมพู่ (flask-shaped) หรือรูปทรงกลม (globose) (Dictionary, 2014)

นิเวศวิทยาประชากร (Population ecology) หมายถึงการศึกษานิเวศวิทยาในระดับประชากรของสิ่งมีชีวิตในด้านจำนวน การแพร่กระจาย ความสัมพันธ์ภายในชนิดเดียวกันและระหว่างชนิด และความสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่อยู่อาศัย (กนก เลิศพานิช, 2557)

ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic Information System – GIS) หมายถึง กระบวนการทำงานเกี่ยวกับข้อมูลในเชิงพื้นที่ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ ที่ใช้กำหนดข้อมูลและสารสนเทศ ที่มีความสัมพันธ์กับตำแหน่งในเชิงพื้นที่ เช่น ที่อยู่ บ้านเลขที่ สัมพันธ์กับตำแหน่งในแผนที่ ตำแหน่ง เส้นรุ้ง เส้นแวง (คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย, 2557)

สโตรมา (Stroma) หมายถึง กลุ่มเส้นใยซึ่งมีการรวมตัวกันอย่างแน่นหนา ซึ่งผลิตโดยเชื้อราโดยมีหน้าที่สำหรับเป็นก้านชูอวัยวะสำหรับสร้างสปอร์ของเชื้อรานั้น (Thefreedictionary, 2014)

สารคอร์ดิเซพิน (Cordycepin) หมายถึงสารเคมี 3'-deoxyadenosine ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ nucleoside adenosine มีมีความแตกต่างจาก nucleoside adenosine ตรงการที่ไม่พบออกซิเจนในตำแหน่ง 3' ในส่วน ribose โดยสารนี้สกัดได้ครั้งแรกจากเชื้อราในสกุล *Cordyceps millitaris* แต่ปัจจุบันสามารถผลิตได้ในรูปแบบสารสังเคาะห์เลียนแบบแล้ว (Wikipedia, 2018)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย เป็นต้น (วรรณฤดี หิรัญรัตน์, 2557)

แอสคัส (Ascus) หมายถึง โครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายถุง ซึ่งผลิตสปอร์ที่เรียกว่าแอสโคสปอร์ (Ascospores) ที่โดยมากมี 8 สปอร์ต่อแอสคัส (ascus) ระหว่างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราในคลาส

อะนามอร์ฟ (Anamorph) หมายถึง ระยะการเจริญซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสำรวจ รวบรวม จำแนกชนิด และศึกษาความหลากหลายทางชนิด ของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่
2. เกิดองค์ความรู้เพิ่มเติมเรื่องความหลากหลายทางชนิด และตัวอาศัยของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่
3. เกิดองค์ความรู้ด้านนิเวศวิทยาประชากร (population ecology) ของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่
4. มีแผนที่การแพร่กระจาย (distribution map) และเกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับการแพร่กระจายเชิงพื้นที่ (spatial distribution) ของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่
5. ทราบและสามารถตรวจสอบ วิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณสารชีวภาพบางชนิดของเชื้อราโรคแมลงสกุล Cordyceps ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์
6. ได้องค์ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อราโรคแมลงสกุล Cordyceps ที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ตัวอาศัย และการผลิตสารชีวภาพบางชนิด

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps*

การจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน (classification) ของเชื้อราในสกุล *Cordyceps* มีวิวัฒนาการพอสมควร จากการจัดดั้งเดิมใน Steinhaus (1967, p.756) มีการเปลี่ยนแปลงไปบ้างใน Tanada and Kaya (1993, p.666) ต่อมามีการปรับเปลี่ยนอีกโดยเชื้อราในสกุล *Cordyceps* ถูกจัดให้อยู่ใน Kingdom Fungi หรือMycota ในDivision หรือ Phylum Ascomycota (sac fungi), Class Sordariomycetes อันดับ Hypocreales และ วงศ์ Clavicipitaceae เมื่อ Sung *et al*. (2007, pp. 5-59) แยกวงศ์ Clavicipitaceae ออกเป็น Clavicipitaceae และ Cordycipitaceae พร้อมกับเสนอตั้งวงศ์ใหม่ขึ้นมาอีกวงศ์หนึ่งคือ Ophiocordycipitaceae และจากการทบทวนชื่อสกุล *Cordyceps* หลายชนิดออกเป็นสกุลใหม่ คือ *Ophiocordyceps* ส่วนสกุล *Cordyceps* เดิมหลายชนิดยังคงจัดไว้ในวงศ์ Cordycipitaceae

เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* จัดเป็นเชื้อราที่ก่อกับโรคแมลง หรือ เชื้อราสาเหตุโรคแมลง หรือ เชื้อราโรคแมลง (Entomopathogenic fungi หรือ Entomopathogens) เชื้อรา *Ophiocordyceps* เป็นเชื้อราที่มีการบันทึกถึงครั้งแรกในประเทศจีน ในสมัยราชวงศ์ถัง และมีการบันทึกเกี่ยวกับสรรพคุณทางยาในเขตปกครองตนเองธิเบตในช่วงตั้งแต่ศตวรรษที่ 15 ถึง 18 จากนั้นจึงมีรายงานการศึกษาในเชิงวิทยาศาสตร์มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2300 (Holliday and Cleaver, 2008, pp. 219-234) โดยคำว่า “Cordyceps” มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกคำว่า “kordyle” หรือภาษาละติน คำว่า “cord”ซึ่งแปลว่า “ไม้กระบอง (club)” และภาษาละติน คำว่า “ ceps” ซึ่งแปลว่า “หัว (head)” โดยเป็นความหมายซึ่งอธิบายลักษณะของสโตรมา (stroma) ก้านชูสปอร์ (fruiting body) รูปไม้กระบอง ซึ่งงอกออกจากตัวของแมลงที่ติดเชื้อดังกล่าว ซึ่งมักพบเจริญออกจากหนอนผีเสื้อหิมาลัย (Himalayan ghost moth, *Thitarodes armoricanus* = *Hepialis armoricanus*) โดยเฉพาะอย่างยิ่งgเชื้อรา *O. sinensis* ซึ่งรู้จักกันในชื่อ ถั่งเช่า (ภาพที่ 2.1) ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรจีนโดยเข้าใจว่าเป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่ใช้เพื่อรักษาโรค และบำรุงสมรรถนะทางเพศ และบำรุงกำลังมาเป็นเวลานานมาแล้ว (Jone, 1993)

ในธรรมชาติแมลงที่ติดเชื้อรา *Ophiocordyceps* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *O. sinensis* สามารถพบได้ในบริเวณพื้นที่สูง ในแถบเทือกเขาหิมาลัย เขตปกครองตนเองธิเบต ประเทศจีน (ภาพที่ 2.2) ซึ่งมีความยากลำบากในการเก็บรวบรวม จึงทำให้ *O. sinensis* กลายเป็นยาสมุนไพรที่มีราคาสูงโดยในปี พ.ศ. 2547 มีรายงานอ้างว่าการขายหนอนที่ติดเชื้อรานี้ในปริมาณ 5,000 กิโลกรัม รวมเป็นมูลค่าถึง 225 ล้านเหรียญสหรัฐ (Winkler, 2008, pp. 291–305) ในปัจจุบัน มีข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ชี้ว่าเชื้อราดังกล่าวเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง โดยมีรายงานว่าเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* และสกุลใกล้เคียงทั่วโลกซึ่งมีจำนวนชนิดมากกว่า 680 ชนิดนั้น มีชนิดที่มีการศึกษาเกี่ยวกับสรรพคุณทางยาได้แก่ *Cordyceps militaris, Ophiocordycepsmyrmecophilaa, Tolypocladium inflatum*. (*Cordyceps subssesilus*) และ *Tolypocladium ophioglossoides* (*Cordyceps ophioglossoides*) เป็นต้น (Blackwell,

1984, pp. 763-765; Hobbs, 1995; Mizuno, 1998) ส่วนในประเทศไทยมีรายงานพบเชื้อราแมลงเหล่านี้กว่า 400 ชนิด (สุชาดา มงคลสัมฤทธิ์ และคณะ, 2553, น.163) และยังมีการพบเชื้อราที่สกุลเดิมคือ *Cordyceps* และที่เปลี่ยนไปเป็น *Ophiocordyceps* ชนิดต่างที่มีรายงานในประเทศไทยอีกหลายชนิด ซึ่งมีการรายงานเป็นครั้งแรกในประเทศไทย เช่น *Cordyceps khaoyaiensis, C. pseudomilitaris, O. sphecocephala, O. nutans, O. myrmecophila* และ *C. cylindrica* (Hywel-Jones, 1994, pp. 939-942; Hywel-Jones, 1995a, pp. 154-158; Hywel-Jones, 1995b, pp. 724-726; Hywel-Jones, 1996, pp. 613-619; Hywel-Jones, 2002, pp. 2-3; Hywel-Jones and Sivichai 1995, pp. 809-812; Srivilai *et al*., 2013, pp. 587-595)

วินันท์ดา หิมะมาน และ คณะ (2554, น.13) ในรายงานผลงานวิจัยเรื่อง “ราทำลายแมลงและแมงมุมในกลุ่มป่าแก่งกระจาน” รายงานว่าในพื้นที่ศึกษาต่างๆ สามารถพบเชื้อราทำลายมด เพลี้ยหอย มวน แมลงสาบ แมลงวัน เพลี้ยกระโดด ต่อ แตน จักจั่น จิ้งหรีด ผีเสื้อ แมงเม่า และ แมงมุม รวม 2,433 ตัวอย่าง ที่สามารถจำแนกได้รวม 44 ชนิด ซึ่งนอกจากเชื้อราชนิดต่างๆ แล้ว ได้พบเชื้อราในสกุล *Cordyceps* รวม 4 ชนิดคือ *Cordyceps buaoides* บนแมงมุม *C. martialis* บนแมลงในอันดับ Coleoptera, *C. tuberculata* บนแมลงในอันดับ Lepidoptera และ *Cordyceps* sp. บนแมลงในอันดับ Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera และ Lepidoptera รวมทั้งเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* รวม 11 ชนิดคือ *Ophiocordyceps communis* บนปลวก; *O. dipertigena* บนแมลงในอันดับ Diptera; *O. humbertii* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. irangiensis* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. irangiensis myrmecophila* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. myrmecophila* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. nutans* บนแมลงในอันดับ Hemiptera; *O. pseudolloydii* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. myrmecophilaa* บนแมลงในอันดับ Hemiptera; *O. sphaecocephala* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera และ *O. irangiensis* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera

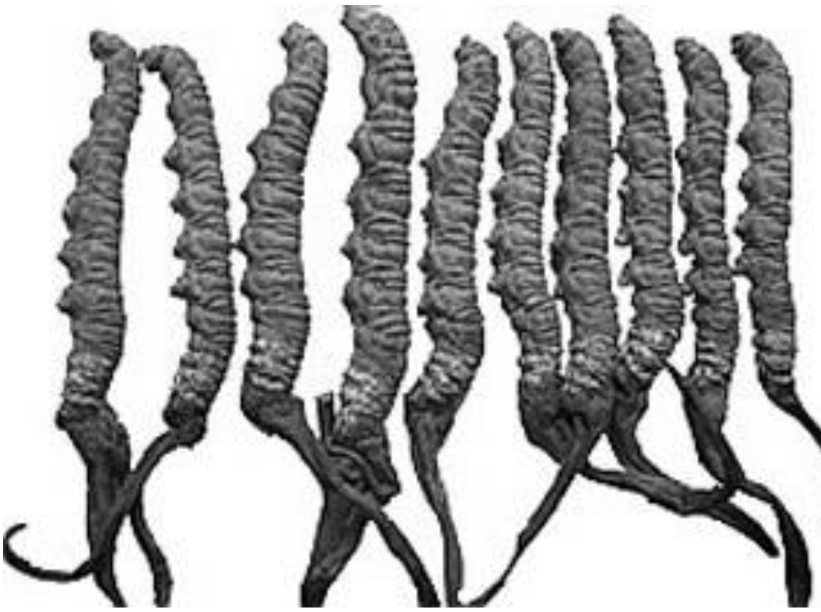
ส่วนวิธีการจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุลเหล่านี้ สามารถดำเนินการได้ตั้งแต่การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological study) เช่น Evan and Samson (1982, pp. 431-453) ได้อธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Cordyceps* spp. ที่พบทำลายมดในระบบนิเวศในป่าเขตกึ่งร้อน นอกจากนี้ได้อธิบายลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา *O. gracilis, C. ishikariensis, C. liangshanensis, C. martialis, C. militaris, O. nutans, O. pruinosa, O. sinensis, O. sphecocephala* และ *O. tricentri* ที่พบทำลายแมลงชนิดต่างๆ เช่น หนอนผีเสื้อ *Hepialus* sp. ตัวอ่อนจักจั่น หนอนผีเสื้อ หนอนด้วง ตัวอ่อนมวน ดักแด้ผีเสื้อในวงศ์ Limacodidae ผึ้ง และต่อ รวมทั้งตัวเต็มวัยของต่อ ในประเทศเนปาล โดยใช้ความแตกต่างของสี จำนวน และลักษณะรูปร่างของสโตรมา (stroma) ร่วมกับขนาดและรูปร่างของ perithecia ในการจำแนกชนิด (Shrestha and Sung, 2005, pp.235-239) (ภาพที่ 2.3) นอกจากนั้น Baral and Maharjan (2012, pp.38-42) รายงานว่าสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุล *Cardyceps* ออกจากเชื้อราสกุลอื่นๆ เช่น *Aspergillus flavus, Colletotrichum gloeosporiodes, Verticillium* sp., *Alternaria solani, Acremonium strictum, Trichoderma virens, Curvularia lanata* และ *Thielaviopsis* sp. ได้ จากรูปร่างลักษณะของ stroma ขนาดและรูปร่างของสปอร์ และลักษณะการเรียงตัวของสปอร์ใน ascus (ภาพ

ที่ 2.4) รวมทั้งสามารถนำไปใช้สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุล *Cordyceps* ได้อีกด้วย ซึ่งเหล่านี้นอกจากนี้การศึกษาพันธุกรรมในระดับชีวโมเลกุล เช่น การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR และการหาลำดับเบสบริเวณ internal transcribe spacer (ITS) และการจัดกลุ่มสายพันธุกรรม (phylogenetic tree) เช่นในกรณีของเชื้อรา *O. cuboidea, C. sensu lato, C. alboperitheciata* และ *O. prolifica* (Ban *et al*., 2009, pp.261-272; Sung *et al*., 2007, pp. 5-59) เป็นต้น

เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* เข้าสู่ตัวแมลงอาศัย (host insects) โดยตรง ผ่านทางผิวหนังของแมลง (cuticle) โดยมีการปล่อยเอ็นไซม์หลายชนิดซึ่งถูกผลิตขึ้นในขณะที่สปอร์ของเชื้อรากำลังงอก ทั้งนี้สปอร์มักมีการปรับเปลี่ยนแปลงสภาพโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี เพื่อให้สามารถยึดติดแน่นอยู่กับผิวของแมลง และเมื่อเข้าไปในช่องว่างในตัวแมลงอาศัย (haemocoel) แล้วเชื้อราจะใช้สารอาหารในร่างกายแมลงเพื่อการดำรงชีวิต และขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นขบวนการที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นเชื้อจะแพร่กระจายจนเต็มช่องว่างลำตัวแมลงโดยการสร้างเส้นใยและหน่วยสืบพันธุ์ ทำให้แมลงขาดอากาศ หรือ อดตาย หรือ ตายเนื่องจากสารพิษที่เชื้อราผลิตขึ้น ในอีกทางหนึ่ง ในขณะที่เส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโต จะดูดน้ำและสารอาหารจากแมลงอาศัย ทำให้ซากแมลงแห้ง เชื้อราทำลายแมลงส่วนใหญ่ เส้นใยจะแทงออกมาจากตัวแมลงอาศัยหลังจากแมลงตายแล้ว ยึดซากแมลงให้ติดกับต้นพืชหรือถูกทำให้ยึดติดโดยขบวนการเกิดโรค จากนั้นไมซีเลียมที่อยู่ภายนอกจะสร้างสปอร์ และสปอร์จะค่อยๆ ถูกปล่อยฟุ้งกระจายเข้าสู่วงจรการเข้าทำลายต่อไป (ภาพที่ 2.5) ทั้งนี้เชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* สามารถก่อโรคกับแมลงหลากหลายชนิด เช่นหนอนของด้วงชนิดต่างๆ เช่น *O. prolifica, C. alboperitheciata* และ *O. cuboidea* (Ban *et al*., 2009, pp. 261-272) หนอนผีเสื้อได้แก่ หนอนผีเสื้อหิมาลัย (Himalayan ghost moth, *Thitarodes armoricanus* (= *Hepialis armoricanus*) และหนอนผีเสื้อชนิดต่างๆ (Holliday and Cleaver, 2008, pp.219-234; Hywel-Jones, 1994, pp.939-942) ในมด เช่น *O. kniphofioides* และ *O. cucumispora* (Evan and Samson, 1982, pp. 431-453) ในผึ้งและต่อ เช่น *O. sphecocephala* (Hywel-Jones, 1995a., pp. 154-158) และปลวก ได้แก่ *O. bispora* และ *O. octospora* (Blackwell, 1984, pp. 763-765) เป็นต้น โดยสามารถพบเชื้อราชนิดนี้บนซากแมลงที่อาศัยตามพื้นดิน เช่นหนอนของด้วงชนิดต่างๆ เศษซากใบไม้แห้ง เช่นผีเสื้อตัวเต็มวัยและหนอนผีเสื้อ ใต้ทรงพุ่มไม้ ตามยอดหญ้า เช่น *O. sinensis* หรือถั่งเช่า และตามส่วนต่างๆ ของต้นพืชซึ่งมักมีความสูงไม่เกิน 2 เมตร โดยสามารถพบได้ในตั้งแต่พื้นที่สูงในเทือกเขาหิมาลัย ในประเทศจีน เขตปกครองตนเองธิเบต ประเทศจีน และเนปาล ที่ราบเขตอบอุ่น เขตกึ่งร้อน และเขตร้อนชื้น (Evan and Samson, 1982, pp. 431-453: Holliday and Cleaver, 2008, pp. 219-234; Steinhaus, 1967, p.756) อีกทั้งมีรายงานการพบเชื้อราชนิดนี้แพร่กระจายในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย เช่น อุทยานแห่งชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก รวม 22 แห่งรวมทั้งอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

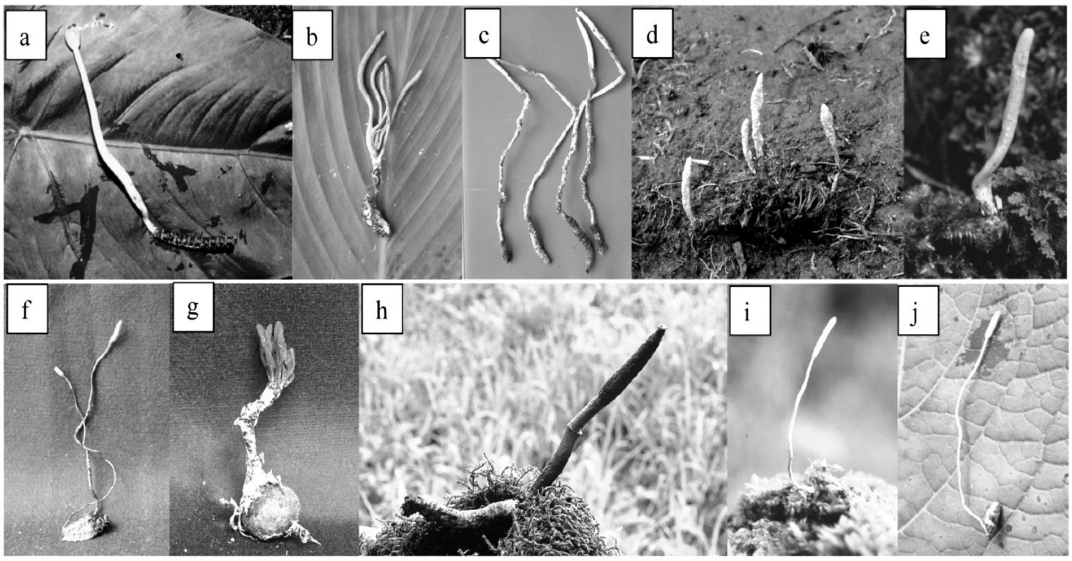
เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* หลายชนิดสามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเทียมเช่น Potato dextrose agar (PDA), Corn meal agar (CMA), Malt extract agar (MEA), Protease peptone agar (PPA) และ Brain heart infusion agar (BIFA) เป็นต้น (Ban *et al*., 2009, pp.

261-272; Blackwell, 1984, pp. 763-765; Evan and Samson, 1982, pp. 431-453) ทั้งนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive substances) ที่ตรวจพบโดยวิธี HPLC ในเชื้อราเช่นเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. มีหลากหลายชนิด เช่น สาร cordycepin, ophicordin, galactomannan และ polysaccharide ที่สามารถตรวจพบได้จากส่วนก้านชูสปอร์ (fruiting body) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อการก่อเซลล์มะเร็ง (antitumor) ต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial) และ ต่อต้านเชื้อรา (antifungal) (Bok *et al*., 1999, pp.891-898) อีกทั้งมีรายงานยืนยันว่าสารสกัดบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ซึ่งควบคุมเซลล์ที่เจริญมากผิดปรกติ (Chen *et al*., 1997, pp. 2349–2359) ที่พบในเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบกรดอมิโนและไวตามินหลายชนิดในเชื้อรานี้ เช่น กรดอมิโนที่จำเป็น (essential amino acids) ไวตามินK ไวตามินB ไวตามินB1 ไวตามินB2 และ ไวตามินB12 อีกด้วย (Holliday and Cleaver, 2008, pp.219-234) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ ชี้ให้เห็นว่าเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ให้ประโยชน์แก่มนุษย์โดยเฉพาะด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

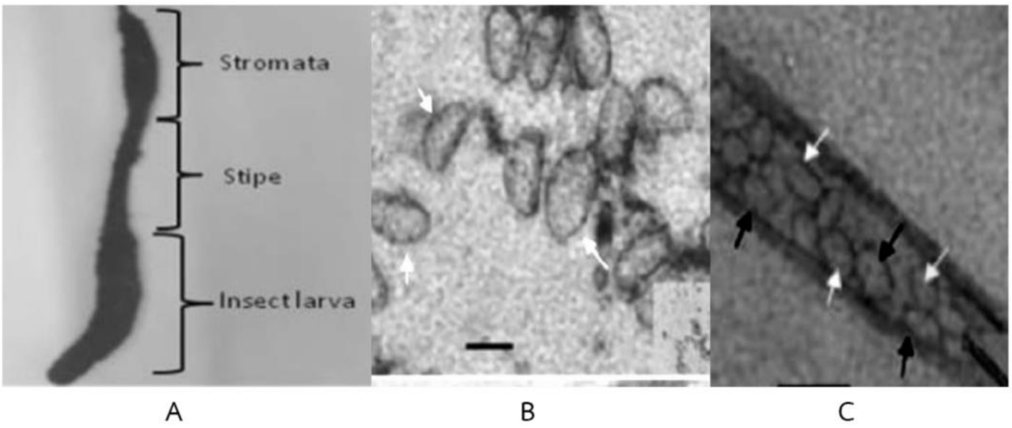


ภาพที่ 2.1 ลักษณะของหนอนผีเสื้อที่ถูกทำลายจากเชื้อรา *Ophiocordyceps sinensis*
หรือที่เรียกว่า ถั่งเช่า (DŌng-chóng-xià-cǎo)
ที่มา: TCM Wiki (2014)

ภาพที่ 2.2 แผนที่การแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps sinensis*
ในเขตปกครองตนเองธิเบต ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน
ที่มา: Boesi and Cardi (2009, pp.52-61)

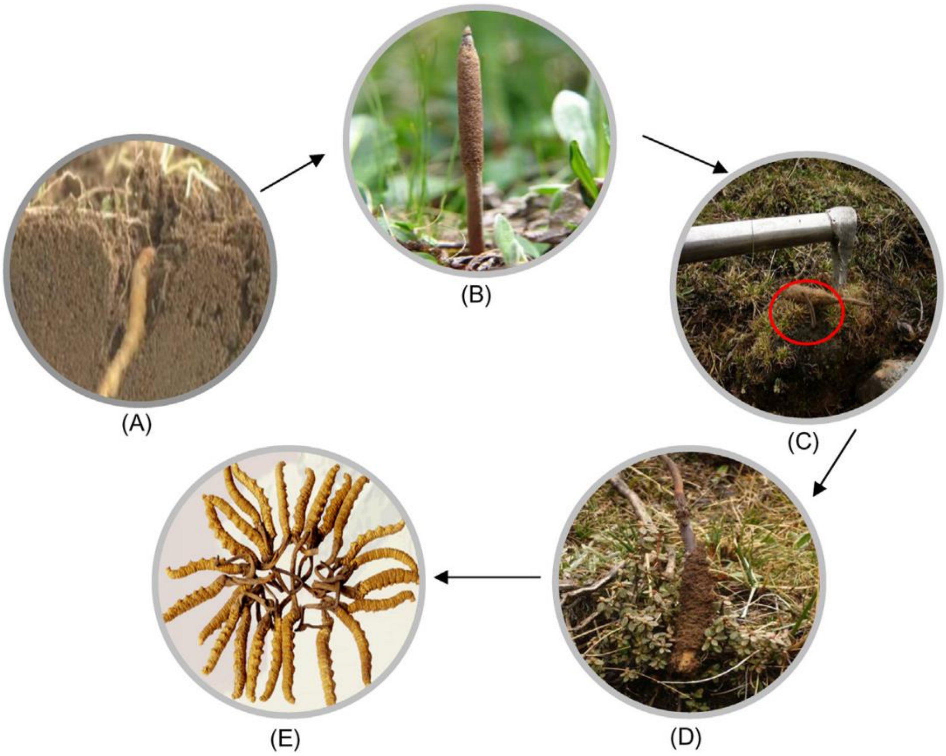


ภาพที่ 2.3 เชื้อราสกุล *Cordyceps* และ *Ophiocordyceps* ชนิดต่างๆ ที่มีการเก็บตัวอย่างได้จากประเทศเนปาล ได้แก่ *O. gracilis* (a); *C. ishikariensis* (b); *C. liangshanensis* (c); *O. martialis* (d); *C. militaris* (e); *O. nutans* (f); *O. pruinosa* (g); *O. sinensis* (h); *O. sphecocephala* (i) และ *O. tricentri (j)* ตามลำดับ
ที่มา: Boesi and Cardi (2009, pp.52-61)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะส่วน stroma (A), สปอร์ (B) และ ascus (C) ของเชื้อรา *Ophiocordyceps* ที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา

ที่มา: ดัดแปลงจาก Baral and Maharjan (2012, pp.38-42)



ภาพที่ 2.5 การเจริญและการเก็บเกี่ยว *Cordyceps sinensis* ในฤดูหนาวลักษณะคล้ายหนอนไหมแก่ในดิน (A), ฤดูร้อน เจริญพ้นดินกลายเป็นหญ้า (B), ลักษณะพร้อมเก็บเกี่ยวในฤดูร้อน (C, D) และ เก็บรักษาและขายเป็นวัตถุดิบแห้ง (E)

ที่มา: Nie et. al. (2018)

2.2 ลักษณะพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จ.เชียงใหม่

อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ตั้งอยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 18 องศา 24 ลิปดา 00 พิลิปดาเหนือ (พิกัด UTM; 2034381 °N) ถึง 18 องศา 40 ลิปดา 00 พิลิปดาเหนือ (พิกัด UTM; 2063808 N) และเส้นแวงที่ 98 องศา 24 ลิปดา 00 พิลิปดาตะวันออก (พิกัด UTM; 436635 E) ถึง 98 องศา 41 ลิปดา 00 พิลิปดาตะวันออก (พิกัด UTM; 466609 °E) อยู่ในเขตท้องที่อำเภอจอมทอง อำเภอแม่แจ่ม และกิ่งอำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ รวมเนื้อที่ประมาณ 301,500 ไร่ หรือ 482.4 ตารางกิโลเมตร (ภาพที่ 2.6) สูงจากระดับทะเลปานกลาง 2,565 เมตร

สภาพภูมิอากาศ จัดอยู่ในภูมิอากาศแบบมรสุมเขตร้อน (tropical monsoon) ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยในเดือนที่หนาวที่สุดสูงกว่า 18 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดปีสูงกว่า 1,270 มิลลิเมตร เดือนที่แล้งที่สุดมีปริมาณน้ำฝน ต่ำกว่า 50 มิลลิเมตร จนถึงสภาพภูมิอากาศแบบอบอุ่น (temperate rainy climate) ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยในเดือนที่หนาวที่สุดอยู่ระหว่าง –3 ถึง 18 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเฉลี่ยเดือนที่ร้อนที่สุด ต่ำกว่า 22 องศาเซลเซียส แต่อย่างน้อย 1-4 เดือนมีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงกว่า 10 องศาเซลเซียส (Pooma and Barfod, 2001, pp. 11-15)

ปริมาณน้ำฝน จากข้อมูลภูมิอากาศ บริเวณดอยอินทนนท์มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยประมาณ 1,344.1 ถึง 2,193.7 มิลลิเมตรต่อปี ปริมาณน้ำฝนสูงที่สุด คือ 2,193.7 มิลลิเมตรต่อปี เดือนที่มีปริมาณน้ำฝนมากที่สุด คือ เดือนสิงหาคม มีปริมาณน้ำฝน 426.1 มิลลิเมตร เดือนที่ฝนตกน้อยที่สุด คือ เดือนมกราคม มีปริมาณน้ำฝน 0.5 มิลลิเมตร

อุณหภูมิจากข้อมูลภูมิอากาศ บริเวณดอยอินทนนท์มีอุณหภูมิเฉลี่ย 12.1 ถึง 23.9 องศาเซลเซียส พืชพรรณธรรมชาติ บริเวณดอยอินทนนท์แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ (นิวัติ อนงค์รักษ์, 2545; Hendricks, 1981, pp.1-112) ดังนี้

ป่าประเภทไม่ผลัดใบ (Evergreen forest) เป็นป่าที่ประกอบด้วยหมู่ไม้ที่มีการทิ้งใบแบบค่อยเป็นค่อยไปไม่พร้อมกันทั้งต้นหรือทั้งป่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูแล้ง จึงทำให้ป่าประเภทนี้เขียวชอุ่มอยู่ตลอดปี

ป่าไม่ผลัดใบที่พบในบริเวณดอยอินทนนท์ แบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

1. ป่าดิบเขตร้อน (Tropical evergreen forest) ป่าชนิดนี้เกิดขึ้นตามภูมิประเทศที่มีความชุ่มชื้นมาก พบอยู่ทั่วไปตามที่ราบ หุบเขา หรือภูเขา มีความสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 500 เมตรขึ้นไป ปริมาณฝนเฉลี่ยต่อปี 1,000 มิลลิเมตร แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ

1) ป่าดิบชื้น (Moist evergreen forest) ความสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 1,000 เมตรขึ้นไป ปริมาณฝนเฉลี่ยต่อปีมากกว่า 1,500 มิลลิเมตร ประกอบด้วยพันธุ์ไม้หลายชนิด ไม้ชั้นบนส่วนใหญ่เป็นไม้ในวงศ์ยาง มีความสูงตั้งแต่ 30-50 เมตร ไม้ชั้นรองถัดลงมาเป็นไม้ขนาดกลางถึงขนาดเล็กซึ่งรวมถึงไม้ในวงศ์ปาล์มต่างๆ

2) ป่าดิบแล้ง (Dry evergreen forest) ความสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 500 เมตรขึ้นไป ปริมาณฝนเฉลี่ยต่อปีระหว่าง 1,000-1,500 มิลลิเมตร ป่าดิบแล้งในที่สูงจะมีความชุ่มชื้นมากกว่าป่าดิบแล้งในที่ต่ำ ต้นไม้ในป่าชนิดนี้จะขึ้นอยู่กันอย่างหนาแน่น มีพันธุ์ไม้เถาจำนวนมาก

พันธุ์ไม้เด่นเป็นไม้ในวงศ์ยาง เช่น ยางขาว ยางปาย ยางแดง ไม้ตะเคียนทอง และตะเคียนหินเป็นต้น ชนิดของพันธุ์ไม้ที่พบมีทั้งชนิดผลัดใบและไม่ผลัดใบผสมกันอยู่

3) ป่าดิบเขา (Hill evergreen forest) ความสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 1,000 เมตร ขึ้นไป ที่ระดับความสูงดังกล่าวภูมิอากาศจะหนาวเย็นและมีความชื้นสูงตอลดทั้งปี ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยต่อปีระหว่าง 1,500 - 2,000 มิลลิเมตร พันธุ์ไม้ที่สำคัญเป็นไม้ในวงศ์ก่อ บางครั้งมีไม้ในวงศ์สนขึ้นปะปนด้วย นอกจากนั้นยังมีพืชในกลุ่ม Gymnosperm ขึ้นปนอยู่ เช่น มะขามป้อมดง เป็นต้น ส่วนไม้พื้นล่างมักเป็นพวกกล้วยไม้ดินและมอสต่างๆ

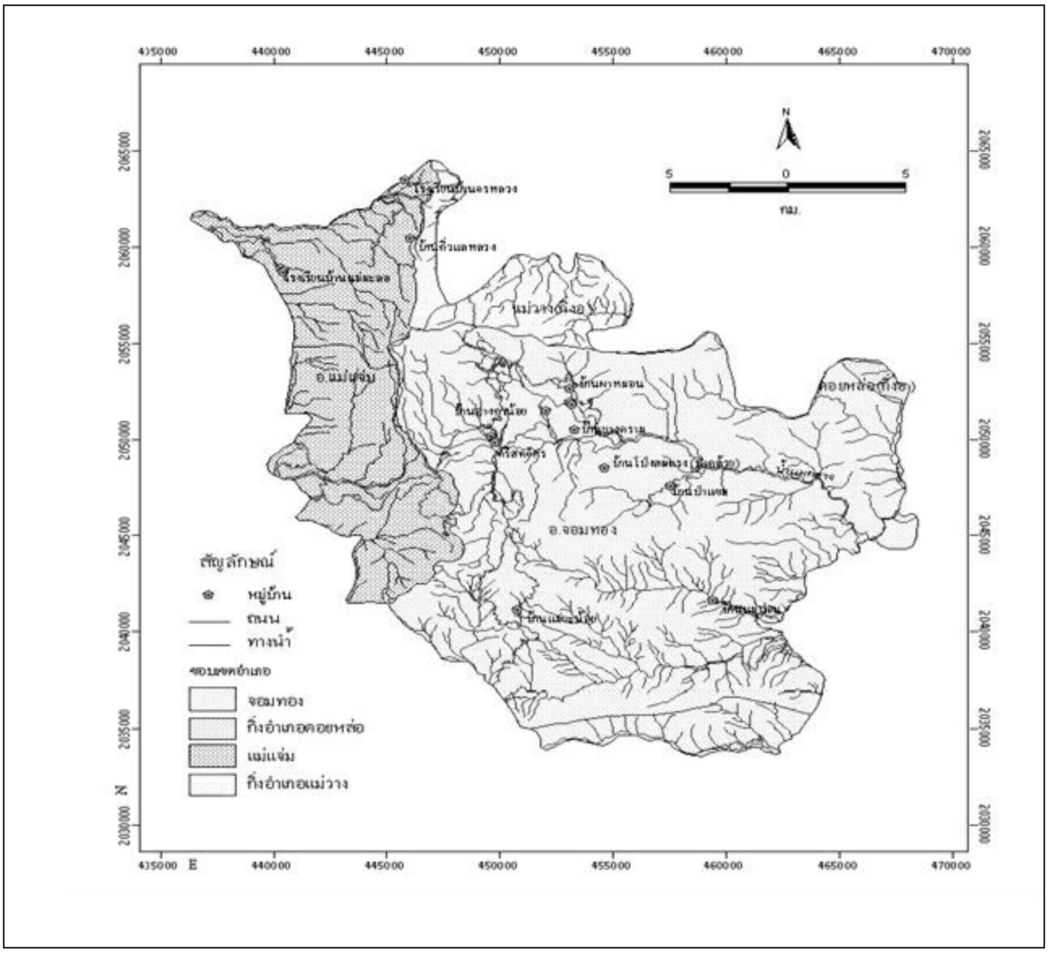
2. ป่าสน (Coniferous forest) ป่าชนิดนี้มักกระจายอยู่เป็นหย่อมๆ พบอยู่ทั่วไปตามเนินเขา ไหล่เขา และสันเขา มีความสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 200 เมตร ขึ้นไป ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยต่อปีระหว่าง 1,000-1,500 มิลลิเมตร เป็นพันธุ์ไม้ในวงศ์ไม้สน (Pinaceae)

3. ป่าประเภทผลัดใบ (Deciduous forest) เป็นป่าที่ประกอบด้วยหมู่ไม้ที่มีใบร่วงหล่นพร้อมกันทั้งต้นหรือทั้งป่าในช่วงเวลาอันสั้นในฤดูแล้ง จนทำ ให้ดูเหมือนว่าป่าไม้ดังกล่าวประกอบไปด้วยต้นไม้ใหญ่น้อยที่ยืนต้นตาย การทิ้งใบของต้นไม้ทั้งป่าก็เพื่อเป็นการลดการสูญเสียน้ำ เป็นการปรับตัวตามธรรมชาติของพันธุ์ไม้เหล่านั้น แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

1) ป่าเบญจพรรณ (Mixed deciduous forest) ป่าชนิดนี้มีลักษณะเป็นป่าโปร่ง ประกอบด้วยไม้ยืนต้นขนาดกลาง พื้นที่ป่าไม่รกทึบ มีไม้ไผ่ชนิดต่างๆซึ่งเป็นไม้พื้นล่างขึ้นอยู่มากพบในบริเวณที่ราบและเชิงเขา มีความสูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 1,000 เมตร ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยต่อปีน้อยกว่า 1,000 มิลลิเมตร พันธุ์ไม้ที่สำคัญ เช่น ไม้สัก พันธุ์ไม้อื่นที่พบคือ มะค่าโมง กะโดน กะพี้ควาย เป็นต้น

2) ป่าแพะ ป่าแดง ป่าโคก หรือป่าเต็งรัง (Dry dipterocarp forest) ป่าชนิดนี้มีลักษณะเป็นป่าโปร่ง ประกอบด้วยไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดเล็ก พื้นที่ป่าไม่รกทึบ พบในบริเวณที่ราบและบนภูเขา มีความสูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 1,000 เมตร ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยต่อปีน้อยกว่า 1,000 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่ประกอบด้วยพันธุ์ไม้ในวงศ์ยาง

3) ป่าหญ้า (Savanah forest) ป่าชนิดนี้เกิดจากการทำลายป่าดั้งเดิมในทุกระดับความสูง โดยการเผาแล้วทำไร่เลื่อนลอยติดต่อกันมาเป็นเวลานาน เมื่อดินมีสภาพเสื่อมโทรมก็จะย้ายไปที่ใหม่ ทำให้บริเวณนี้มีหญ้าเกิดขึ้นซึ่งส่วนใหญ่ เช่น หญ้าคา (*Imperata cylindrica*) หญ้าพง (Miscanthus fuscus) และ สาบเสือ (*Chromolaena odorata*) เป็นต้น



ภาพที่ 2.6 ลักษณะพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่
ที่มา: กรมแผนที่ทหาร (2535)

2.3 การแยกและการทำโพลีแซคคาไรด์ในถั่งเช่า (Cordyceps) ให้บริสุทธิ์ (Purification)

สารโพลีแซคคาไรด์ ส่วนใหญ่จะอยู่ในผนังเซลล์ของถั่งเช่า (Cordyceps) และเกิดขึ้นภายในไซโตพลาสซึม ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างเซลล์ โพลีแซคคาไรด์ในถั่งเช่า ส่วนใหญ่จะมีอยู่สองประเภท โดยขึ้นอยู่กับตำแหน่งในเซลล์ของเชื้อรา ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ภายในเซลล์ (intracellular polysaccharides; IPSs) และโพลีแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharides; EPSs) โพลีแซคคาไรด์ภายในเซลล์ (IPSs) ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากส่วนสร้างสปอร์ (fruiting bodies) ของเชื้อรา (หรือหนอนหนอนถั่งเช่า) และเส้นใย (mycelium) ของถั่งเช่า ในขณะที่โพลีแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ (EPS)ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (culture broth)ในน้ำหมักเหลว โดยทั่วไปโพลีแซคคาไรด์ภายในเซลล์ ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันเช่น น้ำร้อน, สารละลายกรด/อัลคาไลน์, สารละลายน้ำบัฟเฟอร์ ฯลฯ ทำให้โพลีแซคคาไรด์เกิดการแยกและถูกทำให้บริสุทธิ์ ตามความสามารถในการละลายน้ำที่แตกต่างกันและตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) หรือขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของไอออนที่แตกต่างกันและการกระจายตามน้ำหนักโมเลกุล

(molecular weight distributions) จากการศึกษาที่ผ่านมา การสกัดด้วยน้ำร้อนหรือน้ำเดือดเป็นวิธีที่พบมากที่สุดและมีความสะดวกในการแยกโพลีแซคคาไรด์ ที่ละลายในน้ำออกจากถั่งเช่า อย่างไรก็ตามข้อด้อยหลักของวิธีการสกัดด้วยน้ำจะมีประสิทธิภาพการสกัดต่ำและใช้พลังงานสูง ด้วยเหตุนี้เทคโนโลยีอื่นๆ เช่น คลื่นไมโครเวฟ, คลื่นอัลตราโซนิคหรือเอนไซม์ช่วยในการสกัดจึงถูกนำมาปรับปรุงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดและเพิ่มผลผลิตโพลีแซคคาไรด์ ในทางตรงกันข้ามสำหรับการสกัดโพลีแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ น้ำหมักอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของถั่งเช่า จะถูกแยกส่วนและแยกความเข้มข้น (Huang et al., 2013) โพลีแซคคาไรด์ในการเก็บรวบรวมได้จากการสกัดน้ำ (water-extract) ของส่วนสร้างสปอร์และและเส้นใย หรือน้ำหมักอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (fermentation broth) ทำให้ตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมักใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกันและจากนั้นนำไปปั่นแยกออกเพื่อทำเป็นโพลีแซคคาไรด์แบบหยาบ (crude polysaccharides)

2.3.1 การสกัดด้วยน้ำร้อน (Hot-Water Extraction)

Dong et al. (2009) ใช้การออกแบบ Box-Behnken แบบสามระดับพร้อมด้วยการวิเคราะห์ตามรูปแบบมาตรฐานและการวิเคราะห์แบบริดจ์ (ridge analysis) เพื่อพารามิเตอร์ที่เหมาะสมของการสกัดด้วยไอน้ำร้อน (hot-water extraction) สำหรับโพลีแซคคาไรด์จากการเพาะเลี้ยงไมซีเลียมของเชื้อราที่ได้รับการเพาะเลี้ยงจากถั่งเช่า ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ การสกัดที่อุณหภูมิ 88.9°C จำนวน 3 ครั้งแต่ละครั้งใช้เวลา 110 นาที ให้โพลีแซคคาไรด์ที่เหมาะสมมีค่าสูงสุดถึง 16.10% การศึกษาการสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) โดยใช้ไอน้ำร้อนและศึกษาผลของเวลาในการสกัด, อัตราส่วนการสกัดของแข็งต่อของเหลว (solid-liquid ratio) และอุณหภูมิที่มีผลต่อผลผลิตโพลีแซคคาไรด์ สภาวะที่ดีที่สุดได้ผ่านการทดสอบ orthogonal test: อุณหภูมิ 55 °C ในการสกัดเวลา 4 ชั่วโมง, อัตราส่วนการสกัดของแข็งต่อของเหลว (solid-liquid ratio) 1:40 (g/ml) และผลผลิตที่ได้จากการทดลองที่ผ่านการตรวจสอบแล้วคือ 34.14% (Gao et al., 2010) วิธีการสกัดแบบ Soxhelt ได้รับการปรับปรุงโดย Gao และคณะ และหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมงและการตกตะกอนด้วยเอทานอล 50% ภายใต้สภาพนี้ ผลผลิตที่สอดคล้องกันของโพลีแซคคาไรด์จากถั่งเช่าสีทอง เท่ากับ 31.95% นอกจากนี้ ยังได้ตรวจสอบการสกัดแบบรีฟลักซ์ (reflux extraction) ของโพลีแซคคาไรด์ จากการหมักแบบแข็ง (Solid State Fermentation) ของถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ผลการทดลอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการสกัดที่อุณหภูมิ 80 °C ระยะเวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อน้ำ 1:20, ทำการทดลองซ้ำสองครั้ง อัตราผลตอบแทนสูงสุดเท่ากับ 6.93% Chen และคณะได้เพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการสกัดทั้งสามขั้นตอน (decocting extract, hydrothermal refluxing และ alkali extraction) ของโพลีแซคคาไรด์จากผลการเพาะเลี้ยงเชื้อถั่งเช่าสีทอง ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดแบบการต้ม (decocting) คืออัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว(solid-liquid ratio) 1:40 ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมงและทำการสกัด 3 ครั้ง และลำดับผลกระทบของปัจจัยทั้งสามต่อผลผลิตคืออัตราส่วนระหว่างของแข็งกับ ของเหลว > เวลาต้ม (decocting) > จำนวนครั้งการต้ม (decocting)

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธีการสกัดแบบไฮโดรเทอมอลแบบย้อนกลับ (hydrothermal refluxing) คืออัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อน้ำ เท่ากับ 1:20 และสกัดย้อนกลับสองครั้งที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลาครั้งละ 1 ชั่วโมง, และลำดับเรียงลำดับอิทธิพลของผลกระทบคือจำนวนครั้งการสกัด> ระยะเวลาการสกัด > อุณหภูมิการสกัด > อัตราส่วนระหว่างของแข็งกับของเหลว

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแบบ alkali extraction คือ อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวเป็น 1: 8 ความเข้มข้น NaOH 0.7 mol/L, ทำการสกัด 3 ครั้งและใช้เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมงและลำดับผลกระทบอิทธิพลคือ จำนวนครั้งการสกัด > ความเข้มข้น NaOH > อัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว > เวลาการสกัด (Chen et al., 2010)

Yu และคณะ ได้ทำการกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวเคมีจากน้ำหมักเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide) จากถั่งช่า (เชื้อรา CS2) : เวลาการตกตะกอน 12 ชั่วโมง, อัตราส่วนเอทานอล : น้ำหมักบรอท 3.8 : 1 และ pH 7.65 ภายใต้เงื่อนไขเหล่านี้จึงทำให้ได้โพลีแซคคาไรด์ เท่ากับ 11.35 กรัม/ลิตร ซึ่งมาได้จากน้ำหมัก (Yu et al., 2002) Yang et al. (2007) ทำการศึกษาจนได้ผลผลิตของโพลีแซคคาไรด์ 2.7734 กรัม/ลิตร จากน้ำหมักของ *C. brasiliensis* ภายใต้สภาวะการสกัดที่เหมาะสมในการตกตะกอนด้วยปริมาตร 5 ลิตร ของเอทานอล 95% เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ที่ pH 7.0

2.3.2 การสกัดด้วยอัลตราโซนิค (Ultrasonic-Assisted Extraction; UAE) Central Composite Design; CCD) ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบตัวแปรการสกัดที่สำคัญสามตัว ได้แก่อุณหภูมิ, ระยะเวลาและค่า pH ในการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าอัตราการสกัดสูงสุดอยู่ที่ 11.52% ภายใต้เงื่อนไขดังต่อไปนี้ คือ ทำการทรีทเม้นด้วยคลื่นอัลตราโซนิคเป็นเวลา 15.11 นาที อุณหภูมิการสกัดที่ 59.26 °C และ pH 7.17 (Wang et al., 2011)

Gao et al. (2010) ใช้การทดสอบ orthogonal test เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิคกำลัง 250 W อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:35 (กรัม/มล.) ระยะเวลาในการสกัด 13 นาทีและทำให้เกิดการตกตะกอนด้วยเอธานอล 60% ซึ่งได้ผลผลิตเท่ากับ 25.89%

การศึกษาทดลองของ Zhang and Sun (2013) ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยอัลตราโซนิค (ultrasonic extraction) โดยใช้การทดลองแบบปัจจัยเดี่ยว (single factor experiment) และการทดสอบ orthogonal test บนพื้นฐานของผลผลิตโพลีแซคคาไรด์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมคือกำลังคลื่นอัลตราโซนิก 93% โดยใช้ระยะเวลาในการสกัดด้วยอัลตร้าโซนิค 40 นาที ที่อุณหภูมิ 50°C และอัตราส่วนระหว่างของแข็งต่อของเหลว 1:40 และอัตราผลตอบแทนผลิตภัณฑ์เท่ากับ 15.48% สภาวะการสกัดด้วยอัลตราโซนิกที่ดีที่สุดสำหรับ *C. gunii* คือ การใช้การใช้คลื่นอัลตราโซนิคเป็นเวลา 214.4 วินาที ที่อัตราส่วนวัสดุต่อน้ำ (material-water ratio) เท่ากับ 46.9 โดยใช้กำลังคลื่น 413.7 W และผลผลิตที่ได้จากการคาดการณ์สูงสุด (predicted highest extraction yield) คือ 2.2263% (Li, 2011)

Liang and Shang (2010) ได้ทดลองจนได้ผลผลิตสูงสุดของโพลีแซคคาไรด์หยาบ (crude polysaccharide) เท่ากับ 3.30% ภายใต้สภาวะของอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:30

(m/m), เอทานอล 15 มล. กำลังคลื่นอัลตราโซนิก (ultrasonic power) 70 W และระยะเวลาการใช้คลื่นอัลตราโซนิก 90 นาที

Fan และคณะ (2011) ได้ทำการตรวจสอบพารามิเตอร์ในกระบวนการสกัด เช่น ปริมาณการทรีทเม้นด้วยอัลตราโซนิค, กำลังคลื่นอัลตราโซนิค (ultrasonic power), เอทานอลที่มีความเข้มข้นต่างกันและอุณหภูมิการสกัดสำหรับโพลีแซคคาไรด์ภายในเซลล์จากการสกัด *C. militaris* SU-08 จากการทดสอบด้วยเทคนิค Plackett-Burman (PB) และวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) ซึ่งได้กำหนดพารามิเตอร์ 4 ตัวที่มีผลต่ออัตราการสกัด ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมจากการทำนายประกอบไปด้วย ultrasonic treat 61.45, กำลังคลื่นอัลตราโซนิค 543.64 W, อุณหภูมิการสกัด 82.61°C และ ethanol multiple 3.28 และอัตราการสกัดประมาณ 9.11% โดยมีค่าผลลัพธ์เท่ากับ 9.19

Qin และ Li (2011) ระบุว่าอัตราการเกิดโพลีแซคคาไรด์ พบได้ถึง 5.57% ภายใต้สภาพการสกัดของกำลังคลื่นอัลตราโซนิค 300 W, อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว (solid-liquid ratio) 1:55 และใช้เวลาสกัด 30 นาที ที่อุณหภูมิ 35°C

2.3.3 การสกัดด้วยไมโครเวฟ (Microwave-Assisted Extraction; MAE)

เทคนิคสกัดด้วย ไมโครเวฟ (MAE) ถูกใช้เพื่อสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) จากเห็ดถังเช่าสีทอง ใช้การทดสอบแบบ BoxBehnken design และ quadratic polynomial model เพื่อหาผลของพารามิเตอร์อิสระทั้งสามตัว(กำลังไมโครเวฟ เวลาที่ใช้ในการสกัด และอัตราส่วนระหว่างสารละลายต่อของแข็ง) ต่อผลพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเห็ดถังเช่าสีทอง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ กำลังไมโครเวฟที่ 744.8 W เวลาในการสกัดคือ 4.2 นาที และอัตราส่วนระหว่างสารละลายต่อของแข็ง 31.1 มล./ก. (Song et al., 2009) Zhiwei et al. (2010) พบว่า อัตราการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์คือ 3.78% ภายใต้สภาวะของกำลังไมโครเวฟ 700 วัตต์ ระยะเวลาที่ใช้สกัด 2.0 นาที อัตราส่วนระหว่างของแข็งต่อของเลว 1:6 ซึ่งสูงกว่ากระบวนการสกัดด้วยน้ำเล็กน้อย Shi et al. (2006) ศึกษาและพบสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดด้วยไมโครเวฟ คือ กำลังไมโครเวฟ 80% อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวคือ 1:20 และระยะเวลาในการสกัดคือ 20 นาที ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 10.97%

2.3.4 เทคโนโลยีการสกัดแบบอื่นๆ

การใช้คลื่นอัลตราโซนิค หรือคลื่นไมโครเวฟที่มีกำลังคลื่นสูงหรือมีความเข้มสูงเป็นสิ่งที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในการสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากถั่งเช่า (Cordyceps) นอกจากนี้ยังใช้การไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ (Enzyme hydrolysis) และความดันสูง เพื่อให้ได้โพลีแซคคาไรด์ในปริมาณที่สูงขึ้น

An and Zhu (2012) ได้ศึกษากระบวนการสกัดด้วยเอนไซม์ (enzyme extraction) ของโพลีแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อถั่งเช่าสีทอง โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) ได้สภาวะการสกัดที่เหมาะสม ดังนี้ อุณหภูมิการสกัดที่ 39.89 °C, อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว (solid-liquid ratio) เท่ากับ 1 : 75.78, ปริมาณเอนไซม์ (enzyme content) 2.39% ระยะเวลาการไฮโดรไลส์ 4 ชั่วโมง และ pH 3.12 ภายใต้สภาพดังกล่าวนี้จะได้อัตราการสกัดของโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 9.96%

Chen et al. (2014) ได้ทำการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับการไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ (Enzyme hydrolysis) เพื่อแยกโพลีแซคคาไรด์จากถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) และได้สภาวะที่เหมาะสมซึ่ง ดังนี้ ปริมาณเซลลูโลส 1.9%, ระยะเวลาในไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ 1.1 ชั่วโมง, อุณหภูมิคลื่นอัลตราโซนิค 50°C และระยะเวลาการใช้คลื่นอัลตราโซนิค 41 นาที ภายใต้สภาวะดังกล่าวผลผลิตของโพลีแซคคาไรด์จากถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) เพิ่มสูงขึ้นถึง 25.45%

Gao et al. (2009) ใช้เทคนิคแรงดันสูงพิเศษ (ultra-high pressure; UHP) เพื่อแยกสารโพลีแซคคาไรด์จากถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) สภาวะการสกัดด้วยแรงดันสูงพิเศษ (UHP) ที่ดีที่สุดคือ การสกัดเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ตัวทำละลายการสกัด 45% ที่ 400 MPa โดยอัตราส่วนของวัสดุต่อของเหลว (material-liquid ratio) เท่ากับ 1:35 และได้ผลผลิตเท่ากับ 10.13% การศึกษาของ Sun และคณะ (2012) ได้ใช้ระบบของเหลวสองเฟสอัลตร้าโซนิคช่วยสกัด (ultrasonic-assisted aqueous two phase system) เพื่อสกัดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ทำให้ได้อัตราการสกัดสูงสุด 30.1%

Zhao ได้เปรียบเทียบสามวิธีการสกัด (การสกัดด้วยน้ำ, อัลตราโซนิก และไมโครเวฟ) กับผลผลิตโพลีแซคคาไรด์จากถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) พบว่าวิธีการสกัดแบบอัลตราโซนิก ให้ปริมาณโพลีแซคคาไรด์สูงสุด และอัตราการสกัดโพลีแซคคาไรด์ เท่ากับ 7.965 มก./มล. ภายใต้สภาวะคลื่นอัลตราโซนิก 40 kHz และการสกัดครั้งที่สองเมื่อใช้เวลาอัลตราโซนิก (ultrasonic time) เท่ากับ 30 นาที ที่ 80°C โดยใช้กำลังอัลตราโซนิค (ultrasonic power) ที่ 500 วัตต์ (Zhao, 2008)

Yi-Hong (2009) เปรียบเทียบขั้นตอนการสกัดด้วยไมโครเวฟและน้ำร้อนที่มีต่อผลผลิต โพลีแซคคาไรด์ พบว่าขั้นตอนการสกัดด้วยไมโครเวฟที่เหมาะสมคือความเข้มของการแผ่รังสีไมโครเวฟที่ 550 W อัตราส่วนของแข็งต่อสารละลาย (solid-to-solution ratio) เท่ากับ 1:30 และเวลาในการสกัด 30 วินาทีต่อครั้ง, ขณะที่สภาวะการสกัดด้วยน้ำที่เหมาะสมคือ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อัตราส่วนของแข็งต่อสารละลาย (solid-to-solution ratio) เท่ากับ 1:30 สองครั้ง ให้อัตราผลผลิต 3.67% และ 3.35% ตามลำดับ Weng et al. (2008) ยังเปรียบเทียบการสกัดด้วยน้ำเดือด, ไมโครเวฟ และอัลตราโซนิค) พบว่าได้ผลผลิตที่ 3.50%, 2.23% และ 2.03% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Yin et al. (2014) พบว่าวิธีการที่ใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัดได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน, อัลตราโซนิก และ Soxhelt วิธีการเตรียมการก่อนทดสอบ (pretreatment) ทั้งสามวิธี สามารถเพิ่มอัตราการสกัดได้ ตามลำดับดังนี้ คลื่นอัลตราโซนิค > ไมโครเวฟ > การสกัดด้วยน้ำ อัตราการสกัดของโพลีแซคคาไรด์ เท่ากับ 7.965 มก/มล. ภายใต้สภาวะคลื่นอัลตราโซนิคความถี่ 40 kHz และสกัดซ้ำสองครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลา 30 นาทีโดยใช้กำลังอัลตราโซนิค 500 W ที่ 80°C (Zhao, 2008)

2.3.5 วิธีการทำให้บริสุทธิ์ (Purification Methods)

หลังจากแยกสารโพลีแซคคาไรด์ จาก Cordyceps แล้วจะทำการทำให้บริสุทธิ์โดยการการกำจัดโปรตีน (Deproteinization), การกำจัดสี (decoloration) หรือ ไดอะไลซิส (Dialysis) กับเยื่อเลือก (membrane) ผ่านที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉพาะ เพื่อขจัดโปรตีน เม็ดสีและสารโมเลกุลเล็กๆ จากนั้นนำโพลีแซคคาไรดีที่ได้จาก Cordyceps มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอน (fractional precipitation) ด้วยเอธานอล การตกตะกอนด้วยกรด (acidic precipitation) โดยใช้กรดอะซิติก

(acetic acid) การดูดซับด้วยเรซิ่น (absorption resin) การกรองแบบ ultra-filtration ไดอะไลซิส (Dialysis) การใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) การกรองด้วยเจล (gel filtration) และวิธีการใช้โครมาโตกราฟีแบบ affinity เป็นต้น วิธีการดังที่กล่าวมานี้ การตกตะกอนไล่ระดับด้วยเอทานอล (gradient ethanol precipitation) การใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) และโครมาโตกราฟีแบบแยกตามขนาด (size exclusion chromatography) ถูกนำมาใช้มาก เพื่อให้ได้ polysaccharide ที่เป็นเนื้อเดียวกัน เริ่มต้นด้วยการแยก polysaccharide ที่ละลายน้ำได้ และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล และการใช้โครมาโตกราฟีแบบกรองด้วยเจล (gel filtration chromatography) (1.5390 ซม.) โดยใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ที่อัตราการไหล 6 มล./ชั่วโมง (Miyazaki et al., 1977)

ในการแยกสารโพลีแซคคาไรด์ ที่มีโปรตีน (CT-4N) ให้นำยาหยาบมาบดให้เป็นผง และสกัดด้วย acetone, methanol ร้อน และเอทานอลร้อนเหลว (aqueous ethanol) 70% อย่างต่อเนื่อง ตามด้วยการสกัดด้วยน้ำร้อนให้หมด จากนั้นนำที่เหลือไปแช่ใน NaHCO3 5% เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่ สารแขวนลอย alkaline จากนั้นการกรอง และทำให้เป็นกลางด้วย acetic acid ผ่านการไดอะไลซิส (Dialysis) กับน้ำกลั่น และทำให้ตกตะกอนด้วย ethanol 3 ปริมาตร จากนั้นนำไปกำจัดโปรตีนโดยใช้วิธี Sevag (Sevag procedure) และทำให้บริสุทธิ์โดย DEAE Sephadex A-25 column chromatography ส่วนที่เป็นกลางถูกทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilized) เพื่อให้ได้ polysaccharides หยาบที่ผลผลิต 0.1% ซึ่งถูกแยก CT-4N โดยใช้คอลัมน์ Sephacryl S-300 เพื่อให้ได้สารที่ไม่มีสีในอัตรา 0.08% น้ำหนักโมเลกุลของมันจะถูกประมาณโดยการกรองด้วยเจล (gel filtration) ได้เท่ากับ B23,000 Da (Kiho et al., 1986)

Yu et al. (2004) ใช้วิธีการสองวิธีในการแยก โพลีแซคคาไรด์ ที่เป็นเนื้อเดียวกัน จาก *C. militaris* สายพันธุ์ CSP50 และ CSP70 ด้วยการตกตะกอนอย่างต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นของ ethanol ขั้นสุดท้าย 50% และ 70% ตามลำดับ สายพันธุ์ CSP70 ถูกแยกด้วย gel filtration, Sephadex G-100 (1.53100 ซม.) เพื่อให้ได้ส่วนเข้มข้น CSP70-1 และถูกแยกอีกครั้งในคอลัมน์ Sephadex G-200 (1.1360 ซม.) เพื่อให้ได้เป็น 2 ส่วน จากส่วนแรกที่เรียกว่า CSP-1, CSP50 ถูกแยกในคอลัมน์ Sephadex G-100 (1.53100 ซม.) เช่นกัน โดยให้ชื่อหลัก 4 ส่วน คือ CSP-2, CSP-3, CSP-4 และ CSP-5 (Yu et al., 2004) ในทางกลับกัน CSP50 และ CSP70 ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์เซลลูโลส DEAE-52 ก่อนให้ได้โพลีแซคคาไรด์ที่เกี่ยวข้อง จากนั้นจึงแยกด้วยคอลัมน์กรองเจล (gel filtration column) Sephacryl S-100 HR เพื่อแยกโพลีแซคคาไรด์ ชนิด P70-1, P70-2 และP50-1

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา โพลีแซคคาไรด์ ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินดูดซับ macroporous XAD-7 (2.6395 ซม.) กับน้ำกลั่นเป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่ 2 มล./นาที ส่วนที่มี major peak ที่ตรวจพบด้วยวิธี phenol-sulfuric acid ถูกเก็บรวบรวม, ทำให้เข้มข้น และตั้งชื่อว่า CM-1 และถูกแยกเป็นส่วนๆ ลงบนคอลัมน์เซลลูโลส DEAE-52 (2.6x40 ซม.) และSephadex G-25 (1.6x70 ซม.) ในภายหลัง กระบวนการจะสิ้นสุดที่ polysaccharide CMP-1 (Jing et al., 2014)

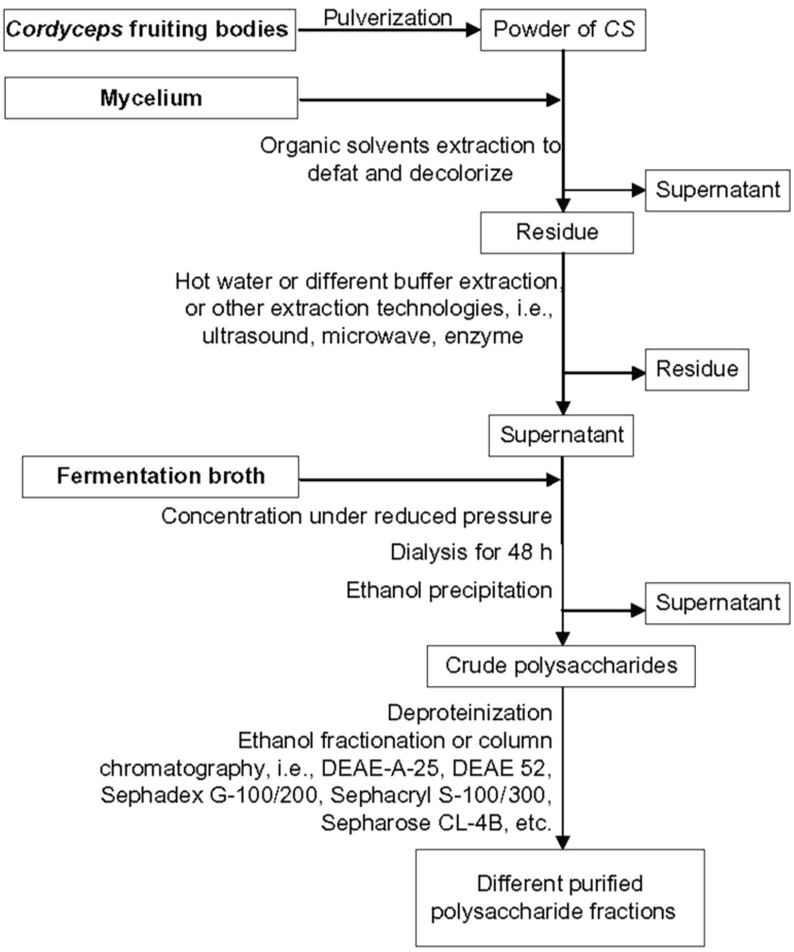
Wu et al. รวมการใช้บัฟเฟอร์และคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีเข้าด้วยกัน ทำให้ได้ ซีรีย์ของโพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์ จากเส้นใยของ *C. Sinensis* ถูกบดและทำให้แห้งซึ่งจะถูกสกัดด้วยเอทานอล95% และ 85% อย่างต่อเนื่อง เพื่อกำจัดไขมัน (defat) กำจัดสี (decolorize) แล้วนำมาสกัด

ด้วยเอทานอล 75% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยง (6700 รอบต่อนาที, 30 นาที) สารตกค้างถูกทำให้แห้งในอากาศและผ่านการบำบัดหลายครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M (pH 7.0) เป็นเวลา 10 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 80°C สารสกัดส่วนที่เป็นน้ำถูกกำจัดตัวทำละลายออกภายใต้ความดันที่ลดลง และสารตกค้างถูกไดอะไลซ์ (dialyzed) ส่วนที่เหลือถูกนำมาเจือจางด้วยเอทานอล 95% และเก็บรวบรวมตัวอย่างตะกอนที่ได้ ล้างด้วยอะซิโตน 3 ครั้งและนำไปอบแห้ง ผลผลิตโพลีแซคคาไรด์หยาบที่ได้นี้อยู่ที่ 2.6% ของน้ำหนักเริ่มต้น และถูกชะ (eluted) จากคอลัมน์ DEAE-cellulose 52 (2.6360 ซม.) ที่มีโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (potassium phosphate buffer) 0.02 M (400 มล., pH 7.0) ตามด้วย NaOH 0.10 M (400 มล.) น้ำหนักโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์ถูกวัดโดยคอลัมน์กรองเจล (gel filtration) Sepharose CL-4B ได้เท่ากับ 1.843105 Da (Wu และคณะ, 2006) สารตกค้างจากเส้นใย ถูกสกัดออกด้วย acetate buffer 0.05 M (pH~6.0) เวลา 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 85°C ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำไปกำจัดโปรตีนออก (deproteinated) 5 ครั้ง ด้วยวิธี neutroenzyme-Sevag เพื่อให้ได้โพลีแซคคาไรด์หยาบ ซึ่งผ่านการชะ (eluted) ออกจากคอลัมน์ DEAE Sepharose Fast Flow ที่มี sodium acetate-acetic acid buffer 0.02 M (pH 4.8, 400 มล.) ตามด้วยน้ำกลั่น (300 มล.) เพื่อให้ได้ 2 ส่วน (I และ II) สารประกอบ I ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 (1.6x60 ซม.) eluted (ถูกชะ) ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.1-1 M น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7.7x103 Da โดยใช้เทคนิคการซึมผ่านของเจลที่มีประสิทธิภาพสูง (high-performance gel permeation chromatography; HPGPC) กับคอลัมน์สองคอลัมน์ในชุด (Ultrahydrogel 250 และ Ultrahydrogel 2000, Waters) (Wu et al., 2007)

ส่วน CSP1-2 ของ *C. sinensis*, polysaccharide (CSP) ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE-cellulose 52 และ Sepharose CL-6B chromatography โพลีแซคคาไรด์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน (CSP1-2) ประกอบด้วยกลูโคส (glucose), และกาแลคโตส (galactose) ในอัตราส่วนโมล (molar ratio) ประมาณ 2: 2: 1 โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 2.70x104 Da (Xiang et al., 2016)

Wu et al. (2007) แยกโพลีแซคคาไรด์ ที่เป็นกรดออกเป็นสองส่วน (CM-jd-CPS2 และ CM-jd (Y)-CPS2) จากส่วนสร้างสปอร์ (fruiting bodies) ของถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารข้าวเปลือกแข็ง (solid rice medium) และดักแด้ไหม (silkworm pupa) ตามลำดับ ทำการสกัดด้วยน้ำ, ตกตะกอนด้วย ethanol และ DEAE-cellulose-52 column ตามด้วย Sephadex G-100 column chromatography

นักวิจัยคนอื่นๆ ได้ใช้วิธีการเดียวกันนี้ เพื่อแยกให้ได้โพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์จากส่วนสร้างสปอร์ (fruiting bodies) หรือจากเส้นใยของสายพันธุ์ Cordyceps หรือน้ำหมัก (fermentation broth) ของถั่งเช่า ดังสรุปวิธีการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ ได้ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.7 การสกัดแยกและทำโพลีแซคคาไรด์ให้บริสุทธิ์จาก *Cordyceps*
ที่มา: Nie et al. (2018)

กรอบแนวคิดในการวิจัย

เชื้อราในสกุล Cordyceps นอกจากเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ซึ่งส่วนใหญ่มีประโยชน์ในการช่วยลดประชากรของแมลงหลายชนิด แต่แมลงในธรรมชาติหลายชนิดที่มิได้เป็นแมลงศัตรู พืช หากแต่อาศัยและเป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ในระบบนิเวศ และการที่แมลงเหล่านี้ตายจากการก่อโรคโดยเชื้อราสกุล Cordyceps ซึ่งมีความหลากหลายทางชนิด และมีรายรายอ้างอิงถึงคุณประโยชน์ด้านสาธารณสุข โดยบางชนิดอาจมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีฤทธิ์ทางยา ซึ่งการวิจัยนี้ได้มีกรอบแนวคิดในการใช้ประโยชน์ของความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต อีกทั้งเป็นการระบุถึงแหล่งที่อยู่ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่จำเป็นในการเข้าถึงซึ่งแหล่งทรัพยากรชีวภาพ ที่มีประโยชน์ สำหรับการศึกษาต่อยอด

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สำรวจและรวบรวมตัวอย่างแมลงและแมงมุมที่ติดเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps*

ประชากรและการสุ่มตัวอย่าง

ประชากร และ/หรือ กลุ่มตัวอย่างของการศึกษาในครั้งนี้คือแมลงชนิดต่างๆ ทั้งระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย ในอันดับผีเสื้อ (Lepidoptera) อันดับผึ้ง มด ต่อ และแตน (Hymenoptera) อันดับแมลงวัน (Diptera) อันดับด้วง (Coleoptera) โดยสามารถพบแมลงที่ติดเชื้อได้ตามใบพืช (ความสูงจากพื้นดินไม่เกิน 1.5 เมตร) เศษซากพืช และผิวดิน ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะของแมลงที่ถูกทำลายโดยเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. กล่าวคือแมลงจะตายและเกาะนิ่งอยู่บนวัสดุต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งในภาคสนามจะสังเกตเบื้องต้นได้ จากการที่มีส่วนที่เรียกว่า clavaria-like stroma เจริญออกมาจากลำตัวของซากแมลงซึ่งแห้งและแข็ง ประกอบกับข้อสังเกตที่อธิบายไว้ใน Evan and Samson (1982, pp. 431-453); Shrestha and Sung (2005, pp. 235-239); Steinhaus (1967, p. 756) และ Tanada and Kaya (1993, p.666)

การสุ่มตัวอย่าง สำรวจ รวบรวม จำแนกชนิด และระบุจุดพิกัด ของแมลงที่ถูกเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ลงทำลาย ตั้งแต่เดือนกันยายน 2558 ถึง เดือนกันยายน 2559 ดำเนินการแบบสุ่มกระจาย (random sampling) ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ โดยแบ่งเป็นจุดย่อยจำนวน 5 จุดย่อย ได้แก่ 1) บริเวณยอดดอยอินทนนท์ 2) กิ่วแม่ปาน 3) น้ำตกสิริภูมิ 4) น้ำตกวชิรธาร และ 5) น้ำตกแม่กลาง (ภาพที่ 3.1) ในพื้นที่ที่กำหนดไว้ประมาณ 1,600 ตารางเมตร โดย ณ แต่ละจุดกำหนดเวลาในการเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ที่พบบนต้นพืชในระดับความสูงไม่เกิน 1.5 เมตร รวมทั้ง พื้นดิน ตามวิธีของ Poinar and Thomas (1984) จุดย่อยละ 1 ชั่วโมง และทำการสำรวจทุก 30 วัน รวมเป็นจำนวน 12 ครั้ง ทำการบันทึกชนิดพืชอาศัยของแมลงอาศัย ถ่ายภาพ เก็บตัวอย่างในกล่องพลาสติก และเก็บใส่กล่องรักษาความเย็นระหว่างการเดินทาง เพื่อนำไปจำแนกประเภทในห้องปฏิบัติการต่อไป นอกจากนั้นระหว่างการเก็บตัวอย่างจะมีการบันทึกข้อมูลสถานที่เก็บพืชอาศัยภาพถ่ายพื้นที่ และจุดพิกัดของแหล่งที่พบแมลง และ/หรือ แมงมุมที่ถูกเชื้อราลงทำลาย โดยใช้เครื่องวัดจุดพิกัดแบบเฉพาะ GPS (Garmin-Oregon-450) (Olathe, Kansas City, KS, USA) เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการทำแผนที่การแพร่กระจายของเชื้อราเหล่านั้น

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ในการรวบรวมตัวอย่างของแมลงที่ถูกทำลายโดยเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. เก็บตัวอย่างแมลง และแมงมุมที่พบว่าถูกทำลายบนต้นพืชในระดับความสูงไม่เกิน 1.5 เมตร รวมทั้งพื้นดินตามวิธีของ Poinar and Thomas (1984) กล่าวคือเก็บตัวอย่างเชื้อราโรคแมลงโดยพิจารณาลักษณะของแหล่งอาศัย (habitat) ที่พบ เช่น เมื่อพบว่าแมลงที่ติดเชื้อเกาะติดอยู่บนใบพืช ทำการตัดใบพืชที่มีแมลงติดอยู่ไว้เป็นตัวอย่าง หากพบ stroma ของเชื้อติดอยู่ตามท่อนไม้ ใช้มีดซึ่งมีขนาดตามความเหมาะสมแยกส่วนท่อนไม้เพื่อให้ได้ตัวอย่างแมลงติดเชื้อติดอยู่ด้วยออกมา และหากพบ stroma ของเชื้อราโผล่พ้นผิวดินออกมา ใช้กระบวยขดดินตักออกมา โดยเมื่อพบตัวอย่างแมลงที่เป็นโรคแล้ว

บันทึกภาพดิจิตอล และใช้คีมคีบแมลงใส่กล่องพลาสติกซึ่งมีขนาดตามขนาด และรูปร่างของตัวอย่างแมลงที่พบ และบันทึกชนิดของพืชอาศัย เก็บตัวอย่างไว้ในกล่องพลาสติก ที่รองพื้นด้วยกระดาษทิชชูและเก็บใส่กล่องรักษาความเย็นระหว่างการเดินทาง

บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บ พืชอาศัย ภาพถ่ายพื้นที่ (ภาพที่ 3.1) รวมทั้งตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของตัวอย่างที่เก็บ ณ จุดที่พบตัวอย่าง โดยใช้เครื่องวัดจุดพิกัดแบบเฉพาะ GPS (Garmin-Oregon-450) (Olathe, Kansas City, KS, USA) นอกจากนั้น ในระหว่างการการเก็บตัวอย่าง จะมีการบันทึกข้อมูลสถานที่เก็บ พืชอาศัย ภาพถ่ายพื้นที่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการทำแผนที่การแพร่กระจายของเชื้อราดังกล่าวต่อไป

สำหรับตัวอย่างที่เก็บจากภาคสนามจะเก็บไว้ในตู้ให้ความเย็น (Mirage รุ่น F2-269 ซันโยยูนิเวอร์แซลอิเล็กทริค ประเทศไทย) ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาและทดสอบเพาะเลี้ยงในการศึกษาของโครงการต่อไป

ภาพที่ 3.1 ภาพถ่ายลักษณะพื้นที่จุดที่เก็บตัวอย่างเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ได้แก่ ได้แก่ บริเวณยอดดอยอินทนนท์ (ก.) กิ่วแม่ปาน (ข.) น้ำตกสิริภูมิ (ค.) น้ำตกวชิรธาร (ง.) และน้ำตกแม่กลาง (จ.)

3.2 การจำแนกชนิด ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ของเชื้อราโรคแมลงในในสกุล *Ophiocordyceps*

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะของแมลงที่พบว่าถูกเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ลงทำลาย โดยในเบื้องต้นจากภาพถ่ายดิจิตอลที่บันทึกในภาคสนาม จากนั้นจำแนกชนิดเบื้องต้น โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของ stroma ได้แก่ สี ขนาด รูปร่าง และจำนวน ลักษณะสัณฐานวิทยา ของ สปอร์ และ ascus โดยพิจารณาจาก ขนาด จำนวน และรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ สเตอร์ริโอ แล ะแบบคอมพาวด์ โดยอาศัยข้อมูลอ้างอิงของ Hywel-Jones (1994, 1995b, 1995c, 1996, 2002), Hywel-Jones and Sivichai (1995) Samson *et al*. (1988) Sung *et al.* (2007) Steinhaus (1967) Tanada and Kaya (1993) และ Lacey (1997) รวมทั้งการนำตัวอย่างที่ยังไม่มีความชัดเจนในการจำแนกชนิดไปปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ ตลอดจนการใช้บริการจำแนกชนิดจากหน่วยงานที่มีความรู้ความชำนาญในด้านการจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุล *Cordyceps และ Ophiocordyceps* เช่น ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เป็นต้น นอกจากนั้นจัดทำตัวอย่างแมลงที่ถูกเชื้อราสกุลนี้ทำลายแต่ละชนิด ในรูปแบบตัวอย่างแห้งเพื่อเป็นตัวอย่างอ้างอิง (voucher specimens) ในพิพิธภัณฑ์แมลง (Insect Museum) ซึ่งบริหารจัดการโดย สาขาวิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับให้บริการการจำแนกชนิดและการศึกษาด้านการใช้ประโยชน์จากเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงในด้านการเกษตรให้แก่เกษตรกร นักวิจัย นักวิชาการ นิสิต และ นักศึกษาต่อไป

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลด้านนิเวศวิทยาประชากรและการจัดทำแผนที่การแพร่กระจายของเชื้อราโรคแมลงในในสกุล *Ophiocordyceps*

วิเคราะห์ข้อมูลทางนิเวศวิทยาประชากรของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ซึ่งเก็บตัวอย่างได้จากอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ โดยนำข้อมูล จำนวนและชนิดของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. มาคำนวณค่าเฉลี่ยประชากรและนำข้อมูลมาพลอตเป็นกราฟ ตามวิธีของ LeClerg *et al*. (1966, p.373) โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนประชากรเป็นแกนตั้ง (y) และระยะเวลาเป็นแกนนอน (x)

ศึกษาดัชนีความหลากหลายทางชนิดโดยการคำนวณหาค่าดัชนีความหลากหลาย (Diversity index) ทางชนิด เช่น Shannon-Wiener Index (Shannon, 1948, pp. 623-656) ตามสูตรและรายละเอียด ดังนี้

$$H' = -\sum_{i=1}^{S}(p_i \ln p_i)$$

หรือ

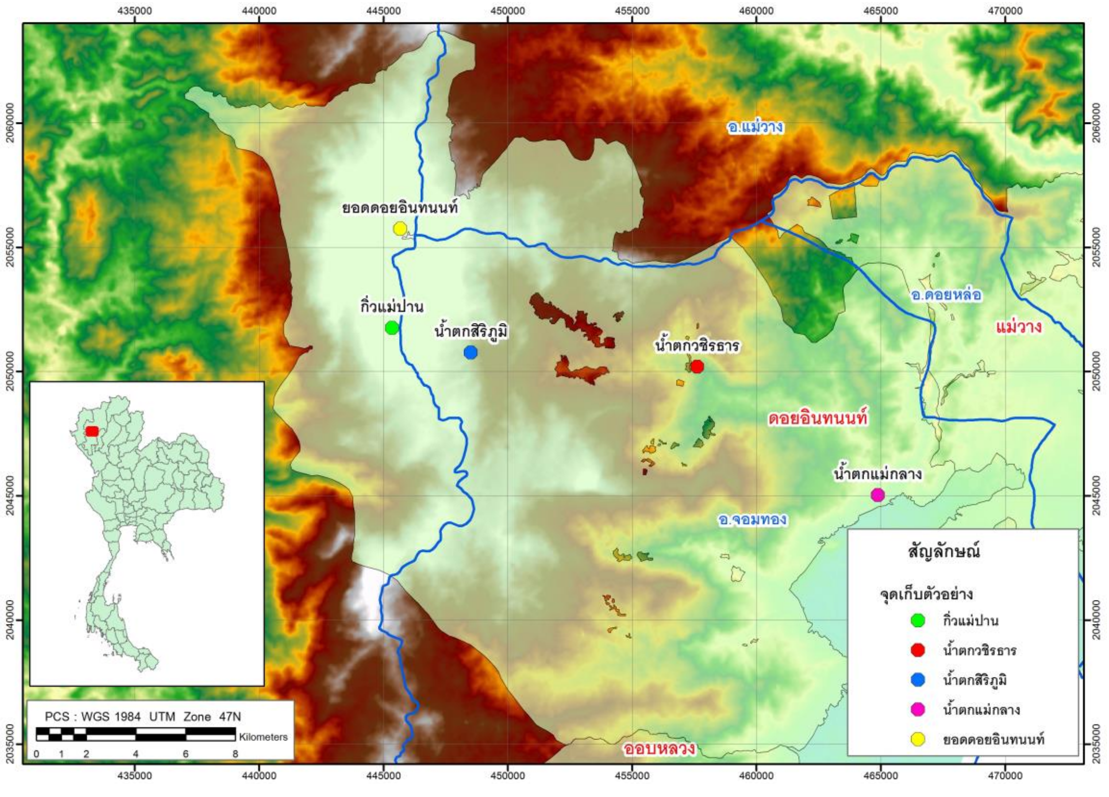
$$H' = -\sum_{i=1}^{S}(p_i \ln p_i) - [(S-1)/2N]$$

เมื่อ

H	=	ดัชนีความหลากชนิด (Richness index)
J	=	ดัชนีความสม่ำเสมอ (Evenness index)
Pi	=	สัดส่วนของจำนวนสิ่งมีชีวิตชนิดที่ *i* ต่อจำนวนสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในประชากร
n	=	จำนวนชนิดของสิ่งมีชีวิตที่พบทั้งหมดในประชากร
n_i	=	จำนวนชนิดของแมลง

S = จำนวนชนิด (species richness)
N = จำนวนแมลงที่พบทั้งหมดในแต่ละจุดสำรวจ

จัดทำจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงพื้นที่ (spatial distribution) ในรูปแผนที่การแพร่กระจายแบบจุด (dot distribution map) ของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* จากข้อมูลจุดพิกัดซึ่งถูกบันทึกระหว่างการสำรวจ นอกจากนี้ ยังได้มีการนำข้อมูลเกี่ยวกับภาพถ่ายดิจิตอล จุดพิกัดทางภูมิศาสตร์ และข้อมูลทางชีววิทยาและนิเวศวิทยา ที่ได้จากการศึกษามาบูรณาการกับระบบภูมิสารสนเทศ (Geographic information systems - GIS) อ้างอิงถึงตำแหน่งที่มีอยู่จริงบนพื้นโลก เพื่อนำเสนอข้อมูลความหลากหลายทางชนิดควบคู่ไปกับข้อมูลการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ (Geographical distribution) ตามวิธีการของ Burrough and McDonnel (1998, p.327) โดยเริ่มจากการนำเข้าข้อมูล (input) การปรับแต่งข้อมูล (manipulation) การบริหารจัดการข้อมูล (data management) ด้วยระบบจัดการฐานข้อมูล หรือ DBMS แบบ Relational การเรียกค้นและวิเคราะห์ข้อมูล (query and analysis) เมื่อระบบ GIS มีความพร้อมในเรื่องของข้อมูลแล้ว และ การนำเสนอข้อมูล (visualization) จากการดำเนินการเรียกค้นและวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้โปรแกรม ArcView GIS เพื่อการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อราโรคแมลง *Ophiocordyceps* spp. และ ความหลากหลายทางชนิดที่พบผ่านระบบออนไลน์ ณ ปัจจุบัน



ภาพที่ 3.2 แผนที่จุดสำรวจเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์
ที่มา: รุ่งเกียรติ แก้วเพชร และศมาพร แสงยศ (2559)

3.4 ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบจากแมลงตามพิกัดต่างๆ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยคัดเลือกอาหารเทียมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิด

3.4.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์มาแยกให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation และ tissue culture

1) single sprore isolation มีวิธีการดังต่อไปนี้

ล้างเศษดิน หรือสิ่งสกปรกต่างๆ ออกจากตัวอย่างด้วยน้ำสะอาด ฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอกของตัวอย่างโดยใช้วิธี triple surface sterilization ดังนี้ แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ใน sodium hypochlorite 5.25% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที ล้างสารละลายส่วนเกินออก โดยการแช่น้ำในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 นาที แล้วนำตัวอย่างวางบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อเพื่อซับน้ำให้แห้ง ตัดตัวอย่างตรงส่วน fertile part ตามขวางด้วยใบมีดโกน หยดน้ำกลั่น ปราศจากเชื้อลงบนสไลด์ 1-2 หยด ใช้ปากคีบคีบตัวอย่างคว่ำด้านที่เป็นรอยตัดบนหยดน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จะมองเห็น asci ลักษณะขุ่นขาวแขวนลอยในน้ำกลั่น ใช้เข็มเขี่ยให้ asci แตกออก ใช้ Pasteur pipette ดูดสารแขวนลอยของสปอร์บนสไลด์ ใส่ลงในสารละลาย chloramphenicol 0.01% ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ติดมากับสปอร์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการงอกของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบใช้ micro pipette ดูดสปอร์หรือ part-spores ที่มีการงอกใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้น potato dextrose agar (PDA) 5 จุดๆ ละ 1 สปอร์ หรือ 1 part-spore บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน สังเกตการเจริญของเส้นใย ยืนยันผลการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยเส้นใยของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีลักษณะเหมือนกันทุกจุด และไม่พบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเอียง potato dextrose agar ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 10° C) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) มีวิธีการดังต่อไปนี้

ล้างเศษดิน หรือสิ่งสกปรกต่างๆ ออกจากตัวอย่างด้วยน้ำสะอาด ฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอกของตัวอย่าง โดยใช้วิธี triple surface sterilization ดังนี้ แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที แช่ใน sodium hypochlorite 5.25% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างสารละลายส่วนเกินออก โดยการแช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 นาที แล้วนำตัวอย่างวางบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อเพื่อซับน้ำให้แห้ง และผ่าตรงส่วน fertile part ด้วยใบมีดโกน ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเนื้อเยื่อที่อยู่ภายใน วางเป็น 5 จุดบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร potato dextrose agar และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วันจากนั้นสังเกตการเจริญของเส้นใยออกมาจากเนื้อเยื่อ ยืนยันผลการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยเส้นใยของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีลักษณะเหมือนกันทุกจุด และไม่พบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเอียง patato dextrose agar ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 10° C) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้น

เพื่อหาชนิดของอาหารวุ้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ Ophiocordyceps แต่ละสปีชีส์ สามารถเจริญได้ดีที่สุด มีวิธีการดังต่อไปนี้ นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ เพาะเลี้ยงในจานอาหารวุ้น potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนี นำมาวางบนอาหารวุ้นที่ใช้ศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ดังนี้ corn meal agar, Czapek’s agar, malt exract agar (MEA), oat meal agar (OA) และ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บางสปีชีส์ที่เจริญ ได้ช้าได้เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 30-60 วัน สังเกตและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีโดยใช้ไม้บรรทัดบันทึกผล

3.4.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่อุณหภูมิต่างๆ

เพื่อหาอุณหภูมิที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น มีวิธีการ ดังต่อไปนี้

นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ เพาะเลี้ยงในจานอาหารวุ้น potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีนำมาวางบนอาหารวุ้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* สปีชีส์นั้นๆ สามารถเจริญได้ดีที่สุด จำนวน 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และนำจานอาหารวุ้นแต่ละชุดการทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 37, 45° C และอุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) ตามลำดับ ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บางสปีชีส์ที่เจริญช้าได้เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 30-60 วัน จากนั้นสังเกตและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและบันทึกผล

3.4.4 การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่ pH ต่างๆ

เพื่อหา pH เริ่มต้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น มีวิธีการ ดังต่อไปนี้

นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ เพาะเลี้ยงในจานอาหารวุ้น potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีนำมาวางบนอาหารวุ้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* สปีชีส์นั้นๆ สามารถเจริญได้ดีที่สุด จำนวน 6 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองจะปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยใช้ lactic acid หรือ hydrogen peroxide และชุดการทดลองที่ไม่ได้ปรับ pH ตามลำดับ ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และนำจานอาหารวุ้นแต่ละชุดการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* สปีชีส์นั้นๆ สามารถเจริญได้ดีที่สุด ในที่มืดเป็นเวลา 15 วัน สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บาง สปีชีส์ที่เจริญช้าได้เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 30-60 วัน จากนั้นสังเกตและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีโดยใช้ไม้บรรทัดบันทึกผล

3.5 การสกัดแยกและศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่มี ß-Glucan ที่พบจากแมลงตามพิกัดต่างๆ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณ ß-Glucan ในสารสกัดตัวอย่างของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps*

โดยการนำตัวอย่างเชื้อราที่เก็บรวบรวมได้มาสกัดด้วยสารละลาย aqueous ethnol (50% v/v) โดยวิเคราะห์ปริมาณของ ß-Glucan ตามวิธีของ McCleary and Holmes (1985) โดยตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ lichenase ที่อุณหภูมิ 40°C ซึ่งเอนไซม์จะทำการย่อยพันธะของ ß-(1⟶3) และ ß-(1⟶4) ทำการแยกส่วนของแข็งที่เหลือจากการย่อยด้วยเอนไซม์ lichnase และผ่านการกรอง เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจาก beta-linked saccharides ตัวอื่น เช่น cellulose จากนั้นทำการย่อยต่อด้วนเอนไซม์ ß-glucosidase เพื่อตัดพันธะ ß-(1⟶3) ß-(1⟶4) และ ß-(1⟶6) ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากปฏิกิริยาวิเคราะห์ด้วย glucose oxidase kit (Sigma, USA).

3.5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่มี ß-Glucan

1) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อรา

ได้แก่ ปริมาณโปรตีน เถ้า ไขมัน เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต ด้วยวิธี AOAC (1990)

2) การวิเคราะห์ปริมาณ dietary fiber ทั้งหมด

ทั้งชนิดที่ละลายน้ำได้และละลายน้ำไม่ได้ของเชื้อรา ที่มีปริมาณ ß-Glucan สูง โดยวิธี Enzymatic gravimetric method (Prosky, et. al., 1988)

3) การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระของเชื้อราที่มี ß-Glucan โดยแสดงในรูปของ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และในรูปของ DPPH radical-scavenging activity (RSA) ตามวิธีของ Nakajima et al. (2007) ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH (1, 1-diphenyl-2-picryhydrazyl) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์ RSA ได้ตามสมการ ดังนี้

$$\%RSA = [(ADPPH - A_{sample})/ADPPH] \times 100$$

ADPPH = การดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A_{sample} = การดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH และตัวอย่างเชื้อราสกัด

4) การวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟินอลิคทั้งหมด

โดยวิธี Folin-Ciocalteu Assay ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณเบต้าแคโรทีนและไลโคปีน (Bao et al, 2005)

5) การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในเชื้อรา

โดยใช้ 2, 6-dichloroindophenol titrimetric method (AOAC, 1990)

6) วิเคราะห์การดูดกลืนคลื่นแสงของสารสกัด β-Glucan **จากเชื้อรา**

วัดการดูดกลืนคลื่นแสงตั้งแต่ความยาวคลื่น 300-700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer

7) การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันในเชื้อรา

ตามวิธีของ Heleno et al. (2009) โดยเชื้อราจะถูกสกัดและทำปฏิกิริยา trans-esterification กับสารละลายเมธานอลโทลูอิน และกรดซัลฟูริกในอัตราส่วน 2:1:1 โดยเขย่าที่อุณหภูมิ 50 ℃ นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกชั้นด้วยน้ำ และทำปฏิกิริยาต่อกับ diethl ether เพื่อแยกส่วน diethyl ether phase และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วย Gas Chromatograhy-Mass-Spectroscopy

3.5.3 การสกัดแยก β-Glucan จากตัวอย่างจากเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps*

ตัวอย่างเชื้อราที่มีปริมาณ β-Glucan สูงจะถูกนำมาสกัดbeta glucan ด้วยวิธี Alkaline extraction method (Rhee et al., 2008) โดยbeta glucan ชนิดที่ละลายน้ำได้ในตัวอย่างเชื้อราจะถูกสกัดด้วย sodium carbonate (Na_2CO_3, 20% w/v) ที่สภาพ pH เท่ากับ 10 และทำการตกตะกอนbeta glucan ด้วยเอธานอล จากนั้นทำแห้งโดยใช้ Freeze dryer และทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์ Yield ของเชื้อราแต่ละชนิดที่สกัดได้

3.5.4 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของ β-Glucan ที่สกัดได้จากเชื้อรา

1) การศึกษา β-Glucan ชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ

ทำการศึกษาชนิดของ beta glucans ทั้งที่ละลายน้ำได้ และไม่ละลายน้ำ โดยย่อยด้วย α-amylase protease และamyloglucosidase ตามวิธีของ McCleary and Holmes (1985)

3.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวภาพของเชื้อรา

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Ophiocordyceps* นำมาทำให้แห้ง โดยใช้เครื่องดูดแบบสุญญากาศเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60℃ เมื่อแห้งแล้วนำมาเก็บในกล่องพลาสติก เพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบทางชีวภาพ ได้แก่ cordycepin และ adenosine โดยใช้วิธี HPLC (Huang et al., 2009)

3.6.1 การตรวจหาและวิเคราะห์ Cordycepin และ Adenosine

การวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ดำเนินการโดยใช้เครื่อง Shimadzu SCL-10A VP (Shimadzu; Japan) ซึ่งประกอบด้วยเครื่องตรวจจับ Shimadzu SPD-M10A VP Photo-diode Array, เครื่องฉีดอัตโนมัติ และคอลัมน์แบบย้อนกลับ (reverse phase column) (Restek, Ultra IBD 5 µm 150 x 4.6 มม.) ตัวเปรียบเทียบ (standard) ของ cordycepin และ adenosine (Fluka Analytical Company) สารละลายตัวเปรียบเทียบ (standard) ของ cordycepin และ adenosine ถูกฉีดต่อเนื่องสองครั้ง เพื่อให้ได้เส้นกราฟมาตรฐาน (calibration curves) โดยปริมาณการฉีดตัวเปรียบเทียบ (standard) คือ 10 ไมโครลิตร, สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้ คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วยน้ำและเมทานอลอยู่ในอัตราส่วน 85:15 (V/V) การแยกได้ดำเนินการใน isocratic elution โดยมีอัตราการไหล 1.0 ml/min ความยาวคลื่นในการตรวจจับของ

photo-diode array ที่ 245 นาโนเมตร และอุณหภูมิของคอลัมน์ 30°C ปริมาณการฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร (Huang et al., 2009)

3.6.2 การวิเคราะห์กรดอะมิโน

การวิเคราะห์กรดอะมิโน ดำเนินการโดยใช้เครื่อง Shimadzu SCL-10A VP (Shimadzu; Japan) ซึ่งประกอบด้วยเครื่องตรวจ RF-10A XL Fluorescence, เครื่องฉีดอัตโนมัติ และคอลัมน์แบบย้อนกลับ (reverse phase column) (Ultra C18 5 µm 250 x 4.6 mm) ตัวเปรียบเทียบ (Standards) ของกรดอะมิโน (Fluka Analytical Company) ตัวเปรียบเทียบ (Standards) ของตัวทำละลายกรดอะมิโน ถูกฉีดต่อเนื่องสองครั้ง เพื่อให้ได้เส้นกราฟมาตรฐาน (calibration curves) ปริมาณการฉีด 10 และ 100 ไมโครลิตร เงื่อนไขในการกำหนดตัวอย่างดังนี้ คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วยน้ำและเมทานอลอยู่ในอัตราส่วน 90:15 (V/V) การแยกได้ดำเนินการใน isocratic elution อัตราการไหล 1.0 ml/min ความยาวคลื่นในการตรวจจับของ RF-10A XL Fluorescence ที่ EX 263 และ EM 313 นาโนเมตร และอุณหภูมิของคอลัมน์คือ 40 °C ปริมาณการฉีด 10 ไมโครลิตร (Huang et al., 2009)

3.7 เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound microscope และกล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo microscope ซึ่งติดตั้งเครื่องมือสำหรับบันทึกภาพถ่ายดิจิตอล ยี่ห้อ Olympus ที่มีการตรวจสอบคุณภาพโดยบริการหลังการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการจัดการด้านพื้นฐานการใช้และการดูแลเบื้องต้นโดยผู้ใช้และดูแลอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ เช่น การเก็บกล้องจุลทรรศน์ไว้ในที่ที่ปราศจากฝุ่นละออง ไม่มีความชื้นสูง ในห้องมีอากาศถ่ายเทได้สะดวก หลีกเลี่ยงจากสถานที่ที่มีเชื้อรา การเตรียมสไลด์ที่เหมาะสมกับการใช้กล้อง การเช็ดเลนส์ต้องใช้กระดาษเช็ดเลนส์ทุกครั้งโดยน้ำยาที่ใช้เช็ดเลนส์ ได้แก่ xylene 85% ผสม ether 15% หรือ alcohol 80% ผสม ether 20% ส่วนไมโครมิเตอร์ที่ใช้วัดขนาดของสิ่งที่ส่องใต้กล้อง ได้มีการเทียบค่าระยะห่างของแต่ละช่องกัน stage micrometer เมื่อต้องการวัดขนาดวัตถุ ให้ใส่แผ่นกระจกกลมในกระบอกเลนส์ใกล้ตา วางแผ่น stage micrometer บนแท่นวางสไลด์ หลังปรับกล้องให้เห็นภาพขีดแบ่งบนสไลด์ แล้วเทียบระยะห่างแต่ละช่องบนแผ่นกระจกกลมกับขีดแบ่งบนแผ่นสไลด์ และคำนวณค่าของระยะห่างของช่องบนแผ่นกระจกกลมตามสูตร ค่า 1 ช่องของ ocular micrometer = จำนวนช่องของ stage micrometer / จำนวนช่องของ ocular micrometer x ค่า 1 ช่องของ stage micrometer

อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาอื่นๆ เช่นเครื่องแก้วและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขนาดเล็ก มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขาย จากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

สารเคมีและและอุปกรณ์พื้นฐาน สำหรับเก็บตัวอย่างและเพาะเลี้ยงแมลง มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางผู้รับเหมาจัดทำ และผู้ตรวจรับ รวมทั้งมีการปฏิบัติงานตามความเหมาะสมในระดับที่ทดสอบ เช่นกล่องพลาสติกใสขนาดต่างๆ คีมคีบ (forceps) ขนาดต่างๆ เครื่องมือสำหรับขุดดินขนาดต่างๆ มีด กระดาษทิชชู และเอทธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จานแก้ว

สำหรับเพาะเชื้อ บีกเกอร์สำหรับดัดแปลงเป็นภาชนะสำหรับให้ความชื้น เพื่อชักนำการสร้างสปอร์ของเชื้อรา เป็นต้น

ตู้ให้ความเย็น (Mirage รุ่น F2-269 ซันโย (ยูนิเวอร์แซลอิเล็กทริค ประเทศไทย) อุปกรณ์สำหรับจัดทำสไลด์ตัวอย่างของสปอร์ รวมทั้งส่วนต่างๆ ของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. เช่น แผ่นสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) น้ำยาสำหรับจัดทำสไลด์ถาวร เช่น Hoyer’s solution และ Canada balsam เข็มเขี่ย ตะเกียงแอลกอฮอล์ และพู่กัน เป็นต้น อุปกรณ์สำหรับให้ความชื้น Devatec Stream Humidifier (Energy Solution & Technology บางขุนเทียน กรุงเทพฯ) ที่มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น (Temperature and Humidity Data Logger รุ่น SKL200THIIa, (SK Sato, Japan) ซึ่งมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขาย จากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

ภาชนะบรรจุที่ให้ความเย็น (cooler) และ สารเคมีให้ความเย็น ได้แก่ น้ำแข็งแห้ง (dry ice) แบบสำเร็จรูป

เครื่อง GPS (Garmin-Oregon-450) (Olathe, Kansas City, KS, USA) **ซึ่ง**มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขาย จากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

เครื่องมือสำหรับบันทึกภาพดิจิตอลของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ที่พบในภาคสนาม ได้แก่ กล้องถ่ายภาพ ยี่ห้อ Olympus รุ่น Pen E-PL1 (โอลิมปัส ประเทศไทย เขตวัฒนา กรุงเทพฯ) พร้อมทั้งอุปกรณ์บำรุงรักษาระหว่างการปฏิบัติงานภาคสนาม รวมทั้ง การ์ดบันทึกความจำ (SD card) ขนาด 16 GB และ 32 GB ซึ่งมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายรวมทั้งบริการการซ่อมบำรุงจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

วัสดุ และอุปกรณ์ คอมพิวเตอร์ สำหรับการจัดเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลดิจิตอล และการจัดทำข้อมูลสารสนเทศภูมิศาสตร์ ได้แก่คอมพิวเตอร์ตั้งโต๊ะ ยี่ห้อ Acer รุ่น Pavilion 20 สำหรับการบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ คอมพิวเตอร์แบบ laptop ยี่ห้อ Dell รุ่น Inspiron N4050 สำหรับบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลระหว่างการทำงานภาคสนามเมื่อมีความจำเป็นต้องพักค้างคืนระหว่างการเก็บตัวอย่าง เครื่องพิมพ์ยี่ห้อ Fuji Xerox รุ่น C Ducuprint CP 105b รวมทั้งอุปกรณ์สำหรับการเก็บรวบรวมข้อมูลดิจิตอล เช่น USB drive ซึ่งมีความจุตั้งแต่ 1 - 32 GB และแผ่น CD Rom เป็นต้น

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างแมลงและแมงมุมที่ติดเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps*

4.1.1 การรวบรวมตัวอย่างและการแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps* ในพื้นที่ศึกษา

จากการสำรวจรวม 25 ครั้ง สามารถรวบรวมตัวอย่างจากจุดสำรวจต่างๆ รวม 71 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างจากบริเวณ เส้นทางศึกษาธรรมชาติอ่างกา กิ่วแม่ปาน น้ำตกวชิรธาร น้ำตกแม่กลาง น้ำตกสิริภูมิ ในเขตตำบล บ้านหลวง เชียงใหม่ จำนวน 9, 7, 15, 9 และ 31 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยพบว่าแมลง (ภาพที่ 4.11) ที่ถูกเชื้อราชนิดนี้ลงทำลายโดยมากเป็นจักจั่น (ภาพที่ 4.12) และ มด (ภาพที่ 4.13) และหนอนของแมลงที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ (ภาพที่ 4.14) เนื่องจากมีเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรานี้ปกคลุมจนไม่สามารถจำแนกชนิดได้ บริเวณพื้นดิน และใบพืชชนิดต่างๆ ในพื้นที่สำรวจ โดยมีการแพร่กระจายอยู่ในพิกัดที่กำหนด (ตารางที่ 4.1)

4.2 จำแนกชนิด ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps*

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะของแมลงที่พบว่าถูกเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ลงทำลายในเบื้องต้น จากการถ่ายภาพดิจิตอลที่บันทึกในภาคสนาม จากนั้นจำแนกชนิดเบื้องต้นโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ stroma ได้แก่ สี ขนาด รูปร่าง และจำนวน ลักษณะสัณฐานวิทยาของ สปอร์ และ ascus โดยพิจารณาจาก ขนาด จำนวน และรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอร์ริโอ และแบบคอมพาวด์โดยอาศัยข้อมูลอ้างอิงของ Hywel-Jones (1994, 1995b, 1995c,1996, 2002); Hywel-Jones and Sivichai (1995); Samson *et al*. (1988); Sung *et al.* (2007); Steinhaus (1967); Tanada and Kaya (1993) และ Lacey (1997) (ภาพที่ 4.16) พบว่าเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* ที่ทำลายมดตัวอย่างที่รวบรวมได้ทั้งหมด 48 ตัวอย่าง คือ *Ophiocordyceps irangiensis* (ภาพที่ 4.15) และที่ทำลายจักจั่นคือ *Ophiocordyceps myrmecophila*a ซึ่งสามารถรวบรวมได้ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4.17)

นอกจากนั้น ยังได้พบว่าเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* ทำลายแมลงชนิดอื่นๆ ด้วย แต่ไม่สามารถจำแนกชนิดของแมลงตัวอาศัย รวมทั้งการระบุจำแนกชนิดของเชื้อราเหล่านั้นด้วยเช่นกัน รวม 6 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4.18) ทั้งนี้ตัวอย่างแมลงที่ถูกเชื้อราชนิดนี้ลงทำลายแต่ละชนิด ได้มีการเก็บในรูปแบบตัวอย่างแห้งเพื่อเป็นตัวอย่างอ้างอิง (voucher specimens) รักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง (Insect Museum) ซึ่งบริหารจัดการโดยสาขาวิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับให้บริการในการจำแนกชนิดและการศึกษาด้านที่การใช้ประโยชน์จากเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงทางด้านการเกษตรให้แก่เกษตรกร นักวิจัย นักวิชาการ นิสิต และนักศึกษาต่อไป

4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลด้านนิเวศวิทยาประชากรและจัดทำแผนที่การแพร่กระจายของเชื้อราโรคแมลงในในสกุล *Ophiocordyceps*

วิเคราะห์ข้อมูลทางนิเวศวิทยาประชากรของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ซึ่งเก็บตัวอย่างได้จากอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ โดยพิจารณาจากแต่ละเดือนในช่วงปี (ข้อมูลตั้งแต่ กันยายน 2558-สิงหาคม 2559) พบว่าประชากรของเชื้อรา ในสกุล *Ophiocordyceps* มีการแพร่กระจายสูงในช่วงตั้งแต่เดือนตุลาคม ถึงเดือนธันวาคม โดยมีการแพร่กระจายสูงสุดในเดือนธันวาคม และเริ่มมีการลดลงจากเดือนมกราคมจนถึงเดือนสิงหาคม (ภาพที่ 4.19) โดยมีพื้นที่การแพร่กระจายในทุกจุดสำรวจโดยมีการแพร่กระจายอยู่ในพิกัดที่กำหนดไว้ ครอบคลุมพื้นที่ตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ โดยสามารถพบได้ในทุกจุดสำรวจ ซึ่งได้แก่ บริเวณยอดดอยอินทนนท์ กิ่วแม่ปาน น้ำตกสิริภูมิ น้ำตกวชิรธาร และน้ำตกแม่กลาง และพบในบริเวณน้ำตกสิริภูมิในปริมาณสูงสุด ดังแสดงในแผนที่การแพร่กระจายในภาพที่ 4.20 และจากการศึกษาดัชนีความหลากหลายทางชนิด โดยการใช้การคำนวณค่าดัชนีความหลากหลาย (Diversity index) ทางชนิด Shannon-Wiener Index (Shannon, 1948, pp.623-656) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.52

ทั้งนี้ได้จัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงพื้นที่ (spatial distribution) ในรูปแผนที่การแพร่กระจายแบบจุด (dot distribution map) ของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* จากข้อมูลจุดพิกัดซึ่งได้บันทึกไว้ระหว่างการสำรวจ โดยการนำข้อมูลเกี่ยวกับภาพถ่ายดิจิตอล จุดพิกัดทางภูมิศาสตร์ และข้อมูลทางชีววิทยาและนิเวศวิทยา ที่ได้จากการศึกษานำมาบูรณาการกับระบบภูมิสารสนเทศ (Geographic information systems - GIS) อ้างอิงถึงตำแหน่งที่มีอยู่จริงบนพื้นโลก เพื่อนำเสนอข้อมูลความหลากหลายทางชนิดควบคู่ไปกับข้อมูล (Geographical distribution) โดยใช้โปรแกรม ArcView GIS เพื่อการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์โรคแมลงและความหลากหลายทางชนิดที่พบ ผ่านระบบออนไลน์ ณ ปัจจุบันจาก https://www.google.com/maps/d/viewer?mid=1cHhbEiVuYD6mLUNYqfz5JtUh-VM (Google Maps, 2014) ดังแสดงในภาพที่ 4.11

ตารางที่ 4.1 ผลการรวบรวมตัวอย่างแมลงและแมงมุมที่ติดเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

รหัสตัวอย่าง	ชนิดแมลงที่ติดเชื้อ	แหล่งที่พบ	พิกัด	
			เส้นรุ้ง (N)	เส้นแวง (E)
Cod-001	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	1829' 41.395" N	98° 40' 3.212" E
Cod-002	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 29' 41.248" N	98° 40' 3.194" E
Cod-003	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 30.372" N	98° 35' 57.304" E
Cod-004	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	เส้นทางศึกษาธรรมชาติอ่างกา /ผิวดิน	18° 35' 21.242" N	98° 29' 15.407" E
Cod-005	มด (Hymenoptera: Formicidae)	เส้นทางศึกษาธรรมชาติอ่างกา/ ใต้ใบพืช	18° 35' 20.990" N	98° 29' 15.796" E
Cod-006	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 31.585" N	98° 35' 54.859" E
Cod-007	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 49.038" N	98° 30' 43.337" E
Cod-008	หนอนของแมลงไม่ทราบชนิด	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 49.538" N	98° 30' 44.752" E
Cod-009	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 29' 43.462" N	98° 40' 2.924" E
Cod-010	หนอนของแมลงไม่ทราบชนิด	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง/ผิวดิน	18° 32' 48.923" N	98° 30' 44.165" E
Cod-011	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18° 32' 31.027" N	98° 35' 53.905" E
Cod-012	หนอนของแมลงไม่ทราบชนิด	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 48.512" N	98° 30' 43.384" E
Cod-013	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 48.098" N	98° 30' 43.592" E
Cod-014	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 31.027" N	98° 35' 53.920" E
Cod-0015	มด (Hymenoptera: Formicidae)	เส้นทางศึกษาธรรมชาติอ่างกา /ผิวดิน	18° 35' 21.026" N	98° 29' 14.557" E
Cod-016	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18°32' 31.358"	98°35' 50.438"

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ชนิดแมลงที่ติดเชื้อ	แหล่งที่พบ	พิกัด	
			เส้นรุ้ง (N)	เส้นแวง (E)
Cod-017	มด (Hymenoptera: Formicidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18°32' 38.116"	98° 28' 47.644"
Cod-018	มด (Hymenoptera: Formicidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 33' 21.679"	98° 28' 56.384"
Cod-019	มด (Hymenoptera: Formicidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 33' 21.679"	98° 28' 56.377"
Cod-020	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18°32' 31.585"	98° 35' 54.737"
Cod-021	หนอนของแมลงไม่ทราบชนิด	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18°29' 41.262"	98° 40' 3.238"
Cod-022	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 32.078"	98° 35' 55.676"
Cod-023	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18° 32' 24.140"	98° 36' 0.547"
Cod-024	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 25.984"	98° 35' 59.716"
Cod-025	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18° 32' 29.731"	98° 35' 56.238"
Cod-026	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18° 29' 41.402"	98° 40' 4.483"
Cod-027	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18°29' 41.258"	98° 40' 7.867"
Cod-028	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18°29' 40.967"	98° 40' 5.419"
Cod-029	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 29' 41.402"	98° 40' 3.241"
Cod-030	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18°32' 30.451"	98°35' 56.605"
Cod-031	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18°32' 30.120"	98° 35' 53.509"
Cod-032	มด (Hymenoptera: Formicidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18°33' 21.488"	98° 28' 55.319"
Cod-033	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 48.700"	98° 30' 45.000"

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

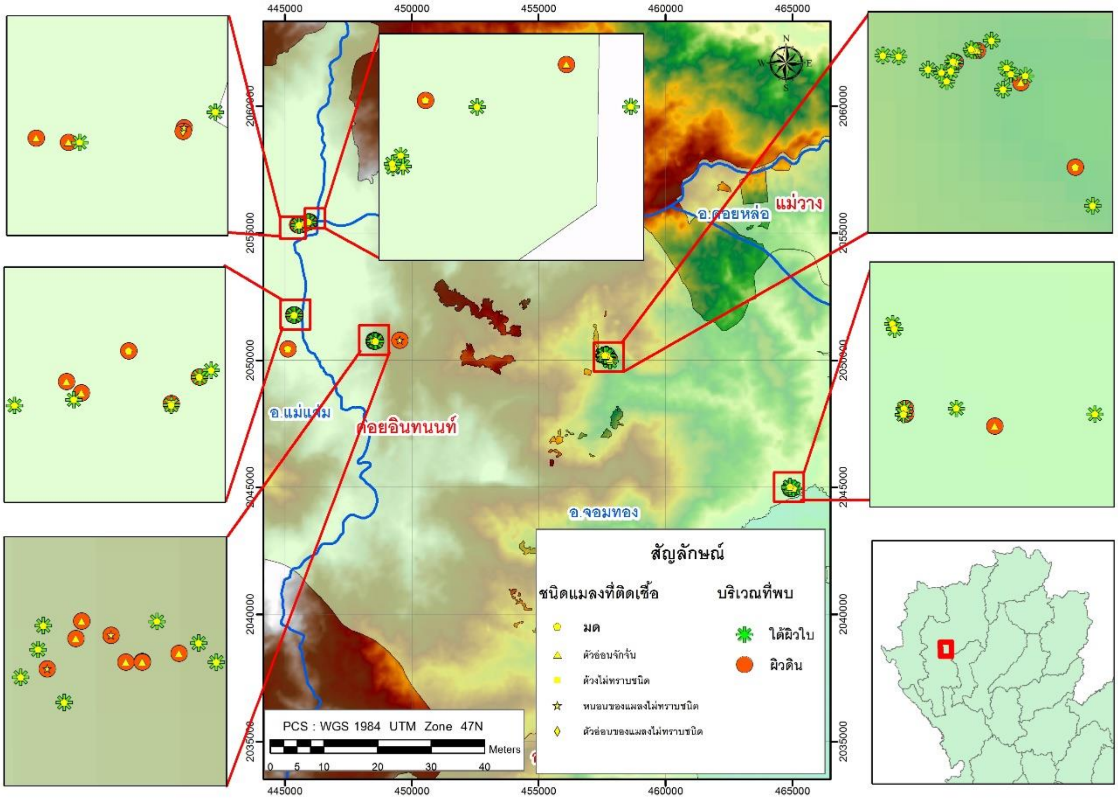
รหัสตัวอย่าง	ชนิดแมลงที่ติดเชื้อ	แหล่งที่พบ	พิกัด	
			เส้นรุ้ง (N)	เส้นแวง (E)
Cod-034	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 33' 21.546"	98° 28' 55.380"
Cod-035	มด (Hymenoptera: Formicidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 33' 21.899"	98° 28' 55.780"
Cod-036	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 31.661"	98° 35' 54.694"
Cod-037	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18° 32' 31.319"	98° 35' 51.194"
Cod-038	มด (Hymenoptera: Formicidae)	เส้นทางศึกษาธรรมชาติอ่างกา/ ใต้ใบพืช	18° 35' 20.987"	98° 29' 14.867"
Cod-039	มด (Hymenoptera: Formicidae)	เส้นทางศึกษาธรรมชาติอ่างกา/ ใต้ใบพืช	18° 35' 20.623"	98° 29' 14.359"
Cod-040	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 30.754"	98° 35' 56.396"
Cod-041	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 29' 43.339"	98° 40' 2.971"
Cod-042	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 48.602"	98° 30' 44.550"
Cod-043	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 48.883"	98° 30' 43.733"
Cod-044	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18°32' 48.408"	98°30' 43.060"
Cod-045	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 33' 21.640"	98 °28' 55.254"
Cod-046	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	อ่างกาหลวง ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 35' 17.290"	98°8' 59.891"
Cod-047	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 30.534"	98° 35' 53.261"
Cod-048	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 30.685"	98° 35' 52.609"
Cod-049	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 30.610"	98° 35' 53.711"
Cod-050	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกแม่กลาง ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 31.585"	98° 35' 54.985"

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

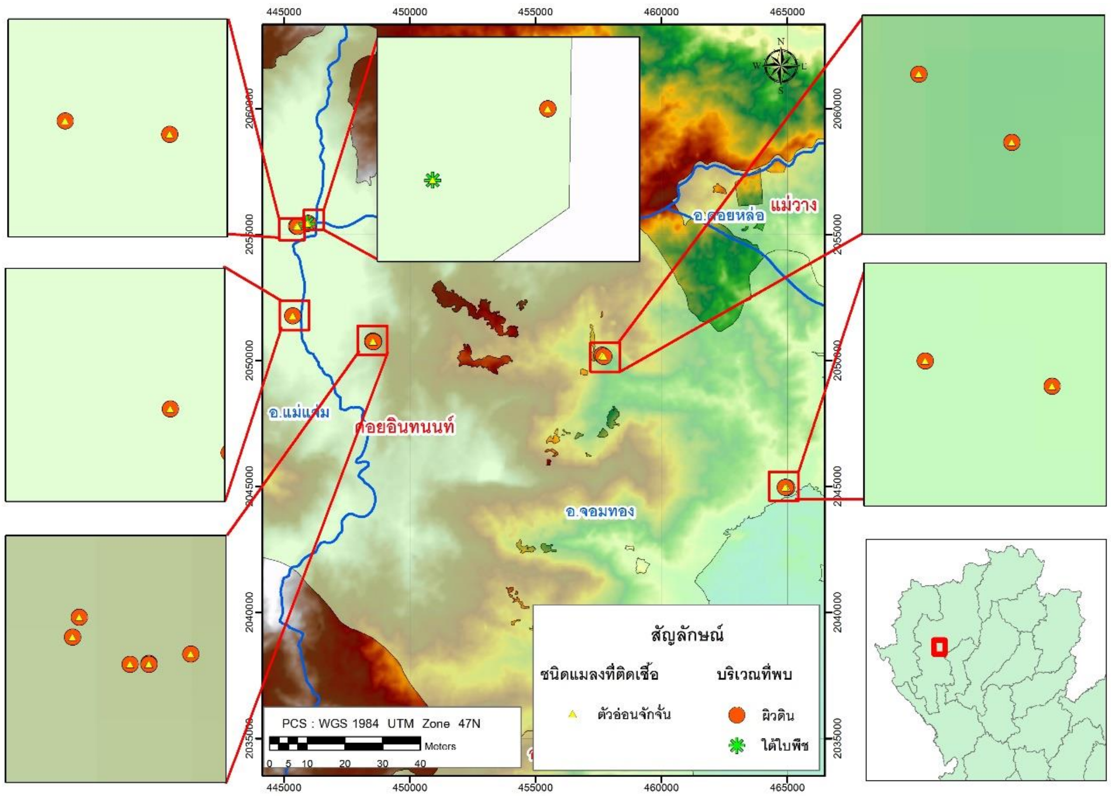
รหัสตัวอย่าง	ชนิดแมลงที่ติดเชื้อ	แหล่งที่พบ	พิกัด	
			เส้นรุ้ง (N)	เส้นแวง (E)
Cod-051	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 48.592"	98° 30' 44.348"
Cod-052	หนอนของแมลงไม่ทราบชนิด	ทางเดินชมธรรมชาติ อ่างกา /ผิวดิน	18° 35' 17.790"	98° 29' 7.087"
Cod-053	มด (Hymenoptera: Formicidae)	อ่างกาหลวง ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 35' 18.553"	98° 29' 8.596"
Cod-054	มด (Hymenoptera: Formicidae)	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ อ่างกา/ ใต้ใบพืช	18° 35' 20.695"	98° 29' 14.406"
Cod-055	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 48.746"	98° 30' 43.272"
Cod-056	มด (Hymenoptera: Formicidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 33' 21.438"	98° 28' 54.818"
Cod-057	ตัวอ่อนของแมลงไม่ทราบชนิด	อ่างกาหลวง ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 35' 17.614"	98° 29' 7.030"
Cod-058	มด (Hymenoptera: Formicidae)	อ่างกาหลวง ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18° 35' 17.081"	98°29' 2.004"
Cod-059	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	อ่างกาหลวง ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18°35' 17.084"	98° 29' 1.464"
Cod-060	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 30.048"	98° 35' 57.091"
Cod-061	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 49.092"	98° 30' 44.730"
Cod-062	มด (Hymenoptera: Formicidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 33' 21.737"	98° 28' 56.478"
Cod-063	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกวชิรธาร ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 31.060"	98° 35' 53.815"
Cod-064	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 48.826"	98° 30' 45.241"
Cod-065	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 49.096"	98° 30' 43.805"
Cod-066	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	อ่างกา ตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18° 35' 20.631"	98° 29' 14.420"

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

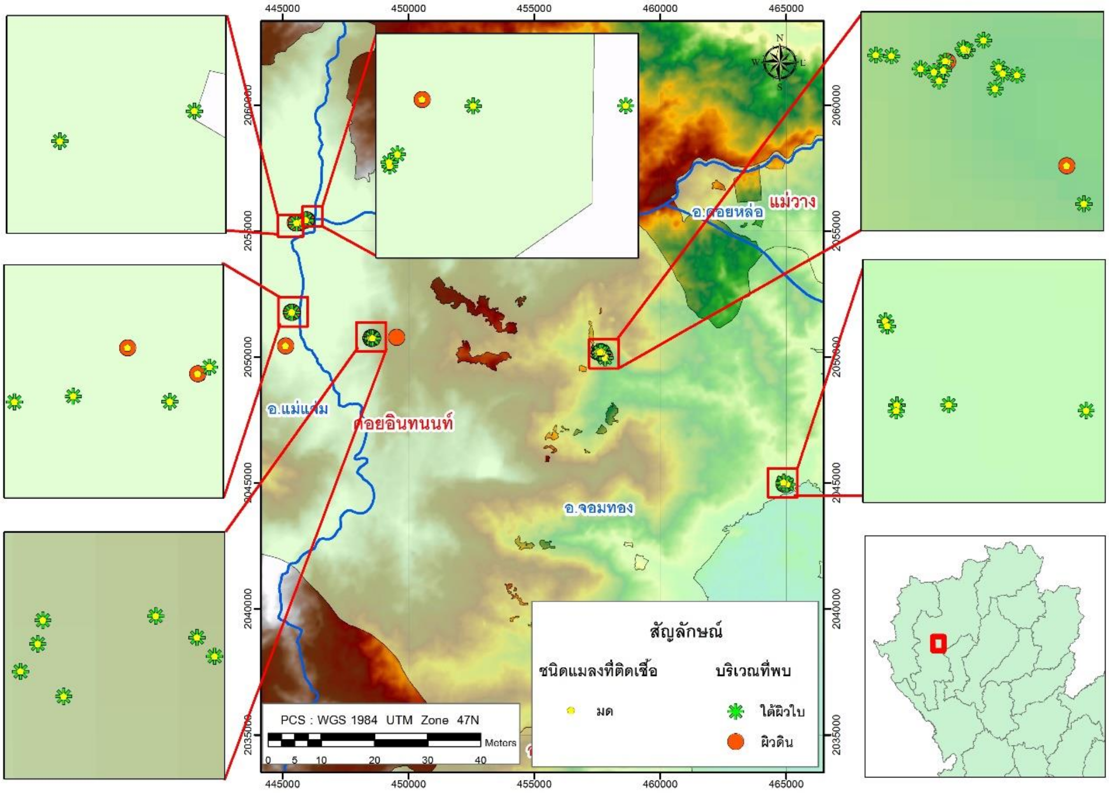
รหัสตัวอย่าง	ชนิดแมลงที่ติดเชื้อ	แหล่งที่พบ	พิกัด	
			เส้นรุ้ง (N)	เส้นแวง (E)
Cod-067	มด (Hymenoptera: Formicidae)	อ่างกาตำบล บ้านหลวง/ ใต้ใบพืช	18° 35' 20.646"	98° 29' 14.356"
Cod-068	ตัวอ่อนจักจั่น (Hemiptera: Cicadidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 32' 48.592"	98° 30' 44.550"
Cod-069	มด (Hymenoptera: Formicidae)	น้ำตกสิริภูมิ ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 32' 48.595"	98° 30' 45.457"
Cod-070	มด (Hymenoptera: Formicidae)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง / ใต้ใบพืช	18° 33' 21.442"	98° 28' 56.140"
Cod-071	ด้วงไม่ทราบชนิด (Coleoptera)	กิ่วแม่ปาน ตำบล บ้านหลวง /ผิวดิน	18° 33' 21.456"	98° 28' 56.140"



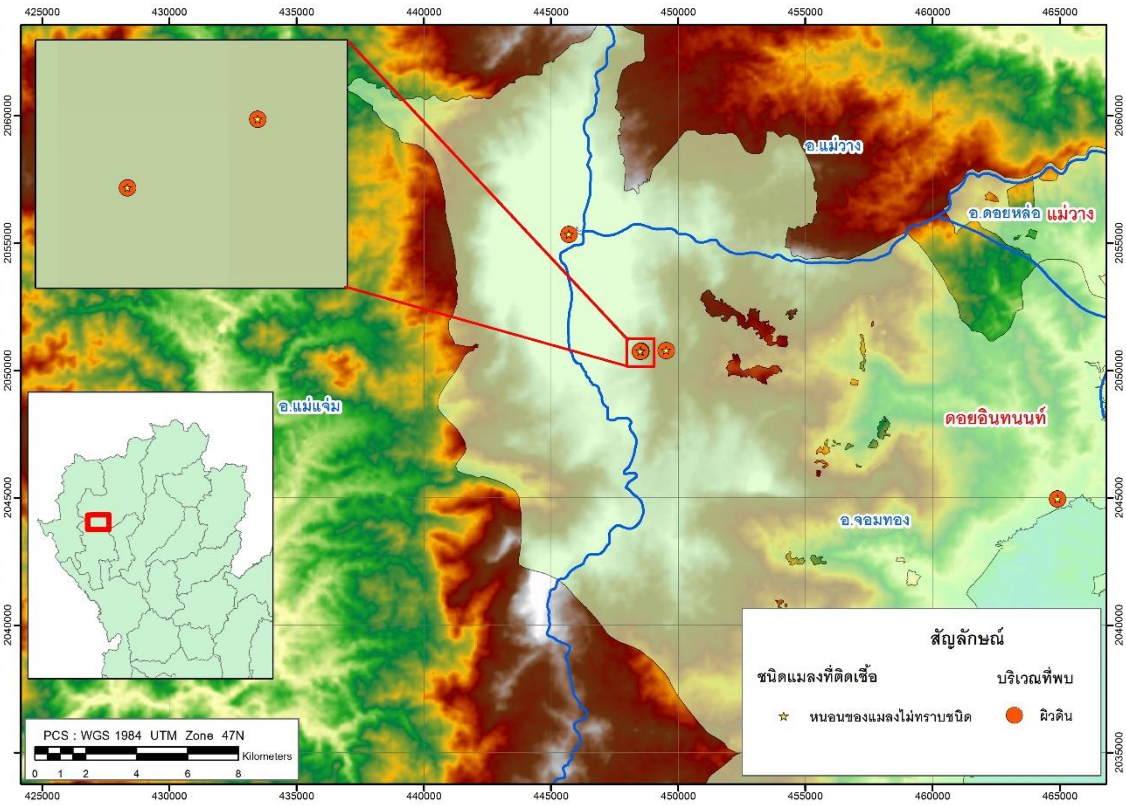
ภาพที่ 4.1 การแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps spp.* ที่ทำลายแมลง ซึ่งพบในพื้นที่ศึกษา อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 - กันยายน 2559



ภาพที่ 4.2 จุดที่พบการแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps spp.* เข้าทำลายตัวอ่อนจั๊กจั่น ซึ่งพบในพื้นที่ศึกษา อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือน มกราคม 2558 - กันยายน 2559



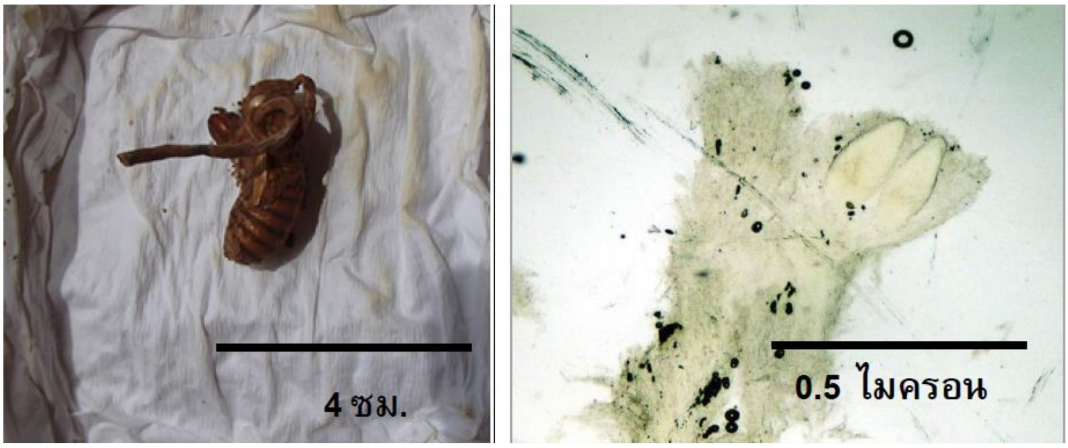
ภาพที่ 4.3 จุดที่พบการแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps spp.* เข้าทำลายมด ซึ่งพบในพื้นที่ศึกษา อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 – กันยายน 2559



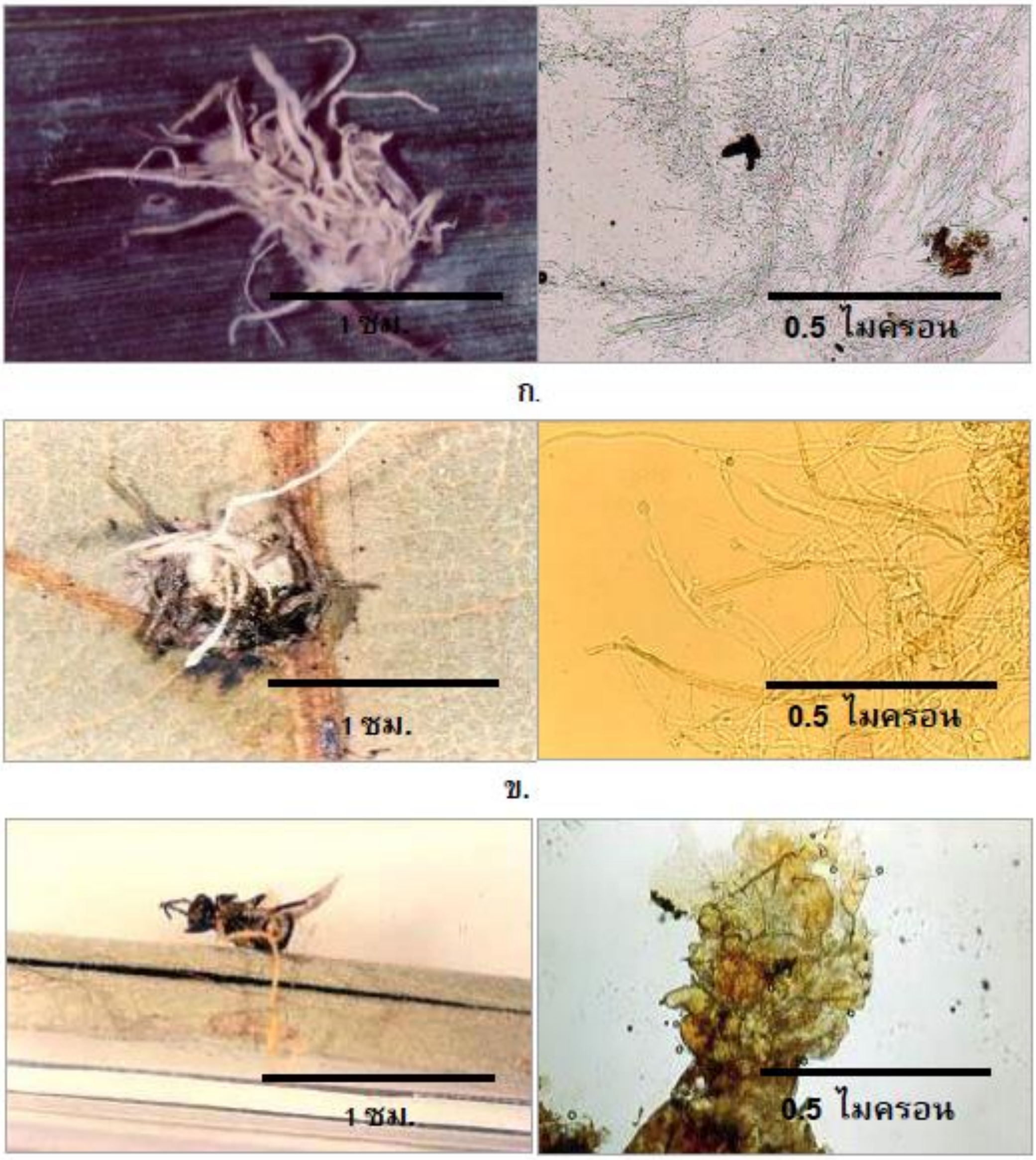
ภาพที่ 4.4 จุดที่พบการแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps spp.* เข้าทำลายหนอนของ แมลงที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ ซึ่งพบในพื้นที่ศึกษา อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 - กันยายน 2559

ภาพที่ 4.5 เชื้อรา *Ophiocordyceps irangiensis* ที่ทำลายมดซึ่งพบในเขตอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558- กันยายน 2559

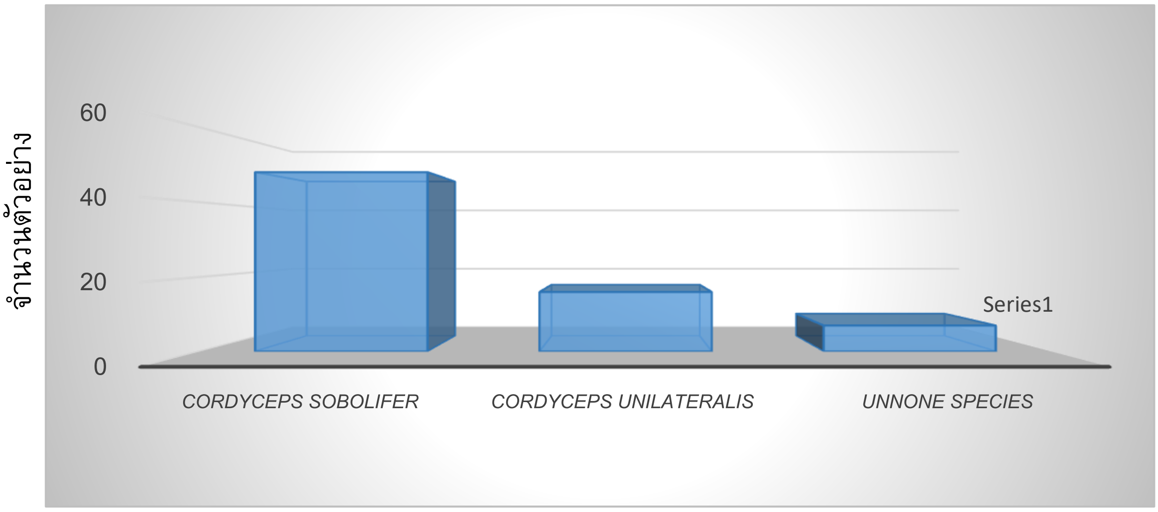
ภาพที่ 4.6 ลักษณะอาการและสปอร์ของเชื้อ *Ophiocordyceps irangiensis* ซึ่งพบบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 - กันยายน 2559



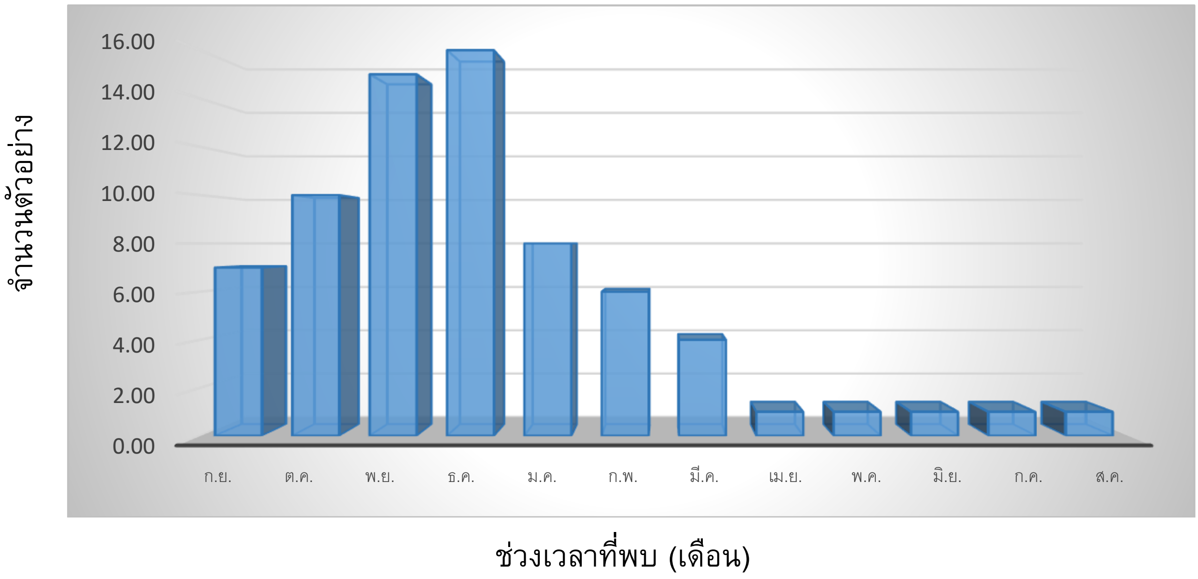
ภาพที่ 4.7 ลักษณะอาการและสปอร์ของเชื้อรา *Ophiocordyceps myrmecophila* ที่ทำลายจักจั่น ซึ่งพบบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือน มกราคม 2558 – กันยายน 2559



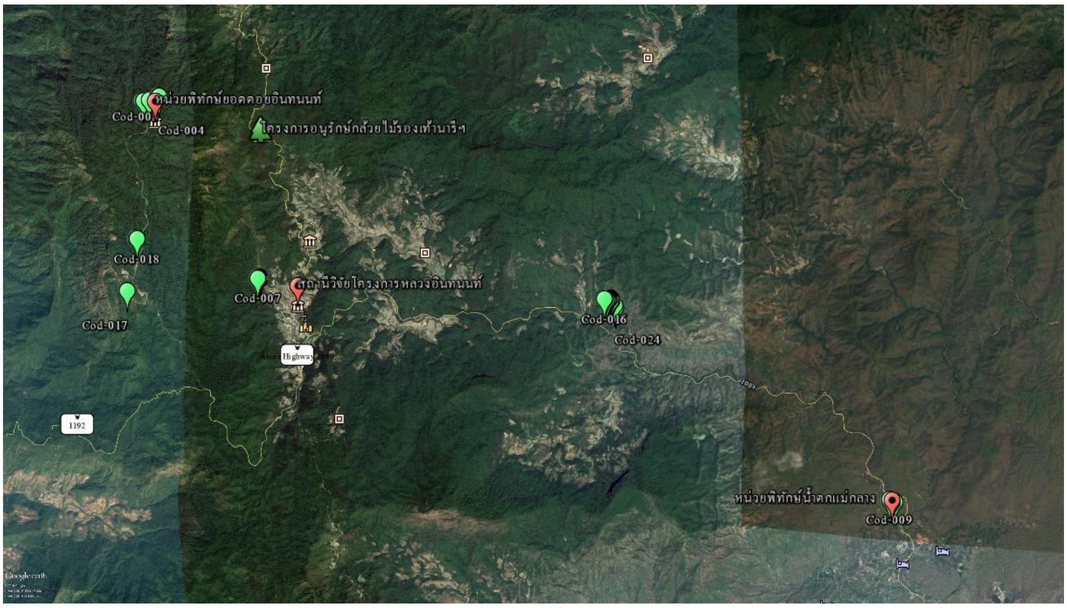
ภาพที่ 4.8 ลักษณะอาการและสปอร์ของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ซึ่งทำลายแมลงชนิดต่างๆ ได้แก่หนอนผีเสื้อ (ก.) ด้วง (ข.) และ ผึ้ง (ค.) ซึ่งพบบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 - กันยายน 2559



ภาพที่ 4.9 ปริมาณตัวอย่างของเชื้อราชนิดต่างๆ ที่พบทำลายแมลงในพื้นที่ศึกษา เขตอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือนมกราคม 2558 - กันยายน 2559



ภาพที่ 4.10 การขึ้นลงของประชากรของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* spp.ที่พบทำลายแมลงในพื้นที่ศึกษา เขตอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่างเดือน มกราคม 2558 - กันยายน 2559



ภาพที่ 4.11 แผนที่การแพร่กระจายของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบทำลายแมลงใน
พื้นที่ศึกษา เขตอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จากการสำรวจระหว่าง
เดือนมกราคม 2558 – กันยายน 2559
ที่มา: Google Maps (2014)

4.4 ผลการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบโดยคัดเลือกอาหารเทียมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิด

4.4.1 ผลการแยกเชื้อบริสุทธิ์

จากการนำตัวอย่างของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์มาฆ่าเชื้อบริเวณผิว โดยใช้วิธี triple surface sterilization แล้วแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation และ tissue culture ในอาหารวุ้น potato dextrose agar จากการทดลองในขั้นต้นพบว่าการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี single spore isolation ให้ผลที่ดีกว่าวิธี tissue culture เนื่องจากพบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์น้อยกว่า จึงใช้เลือกใช้วิธีการนี้ในการแยกเชื้อและสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ได้ทุกสปีชีส์

4.4.2 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นชนิดต่างๆ

จากการนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด คือ corn meal agar, Czapek’s agar, malt extract agar, oat-meal agar และ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) เป็นเวลา 15-60 วัน พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose agar รองลงมาคืออาหาร malt extract agar, corn meal agar, oat meal agar และ Czapek’s agar ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์พบว่า *Ophiocordyceps* sp.1

Ophiocordyceps sp.2 และ *Ophiocordyceps* sp.3 เจริญได้อย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ *O. nutans* เจริญได้ค่อนข้างช้า (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *Ophiocordyceps* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ ห้อง (27 ± 2° C) เป็นเวลา 15-60 วัน

Ophiocordyceps	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ (mm)				
		Corn meal agar	Czapek's agar	Malt extract agar	Oat meal agar	Potato dextrose agar
O.irangiensis	30	15	7.5	19.5	17.5	18.5
O.myrmecophila	30	7.4	5.5	10	7.5	16
O.nutans	60	8	5.5	15.5	8	18
O.sphecocephala	30	16	6.5	18.5	13	22.5
Ophiocordyceps sp.1	15	47	24.5	51.5	46.5	54
Ophiocordyceps sp.2	15	49.5	26.5	53	49	57
Ophiocordyceps sp.3	15	48	25	52	47	54

4.4.3 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์เลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar ซึ่งเป็นอาหารที่เชื้อเจริญได้ดีที่สุด บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 15-60 วัน พบว่า เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20, 25 และที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) โดยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25° C แต่มี 4 สปีชีส์ ได้แก่ *O. iranensis, Ophiocordyceps* sp.1 *Ophiocordyceps* sp.2 และ *Ophiocordyceps* sp.3 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30° C จากการทดลองไม่มีสปีชีส์ใดที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 45° C (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *Ophiocordyceps* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 15-60 วัน

Ophiocordyceps	**ระยะเวลาบ่ม (วัน)**	**เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (mm) ***					
		อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C)	**20° C**	**25° C**	**30° C**	**37° C**	**45° C**
O.irangiensis	30	20.5	19	20	7	-	-
O.myrmecophila	30	17	17.5	19	-	-	-
O.nutans	60	18	21	22.5	-	-	-
O.sphecocephala	30	22.5	23	25	-	-	-
Ophiocordyceps sp.1	15	54	55.6	59	6	-	-
Ophiocordyceps sp.2	15	57	59.5	63	37	-	-
Ophiocordyceps sp.3	15	56	57	60	37	-	-

* - หมายถึง ไม่มีการเจริญ

4.4.4 การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่ pH ต่างๆ

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์เลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar ซึ่งเป็นอาหารที่เชื้อเจริญได้ดีที่สุด ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 เทียบกับชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 25° C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ดีที่สุด เป็นเวลา 15-60 วัน พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose agar ที่มี pH เริ่มต้น 5-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 8 เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ไม่ดีนัก (ตารางที่ 4.14)

ตารางที่ 4.4 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *Ophiocordyceps* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ pH ต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25° C เป็นเวลา 15-60 วัน

Ophiocordyceps	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (mm) *					
		ชุดควบคุม (pH ~5.6)	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
O.irangiensis	30	21	18	21	21.5	16.5	15
O.myrmecophila	30	18	17	18.5	18	14.5	13.5
O.nutans	60	23.5	20	22	22.5	13	10.5
O.sphecocephala	30	25	23.5	25	25.5	22	21
Ophiocordyceps sp.1	15	59	56	59	61	54	52.5
Ophiocordyceps sp.2	15	63	59.5	62.5	63	56.5	54.5
Ophiocordyceps sp.3	15	59	57	58	62	55	53

4.5 การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อรา *Ophiocordyceps* **ที่มี ß-Glucan**

4.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อรา

องค์ประกอบทางเคมีอาหารหลัก ได้แก่ ปริมาณเถ้า ไขมัน ใยอาหาร โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ในตัวอย่างเชื้อราที่พบว่ามีปริมาณ beta glucan ตั้งแต่ 0.1-0.45% (โดยน้ำหนักแห้ง) และสามารถรวบรวมได้ปริมาณมากเพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี โดยผลการศึกษาพบว่า เชื้อรา *O. irangiensis* ซึ่งมีปริมาณ beta glucan สูง (0.38%) และมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับ *O. myrmecophila* และ *O. nutans* (0.34 และ 0.33% ตามลำดับ) นั้นมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตมากเกือบถึงร้อยละ 60 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่ง beta glucan จัดเป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง และเมื่อพิจารณาปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในเชื้อรา เชื้อราพบว่ามีปริมาณที่สูงเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ *O. sphecocephala* ซึ่งเป็นอีกชนิดหนึ่งที่พบว่ามีปริมาณ beta glucan สูงใกล้เคียงกับ *O. irangiensis* แต่มีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ค่อนข้างต่ำ แต่มีปริมาณเยื่อใยสูงถึง 51.68% ดังนั้นปริมาณของเยื่อใยร่วมกับปริมาณของคาร์โบไฮเดรตอาจจะสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดแนวโน้มระดับปริมาณของ beta glucan ได้

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อรา *Ophiocordyceps* (% นน.แห้ง)

Ophiocordyceps	Protein	Ash	Fats	Fiber	Carbohydrate
O.irangiensis	1.65	1.31	0.5	5.53	90.11
O.myrmecophila	2.89	0.14	17.68	7.21	70.98
O.nutans	0.61	0.69	17.98	50.68	31.14
O.sphecocephala	2.63	1.11	13.71	6.83	75.72
Ophiocordyceps sp.1	3.23	0.04	14.29	6.48	75.06
Ophiocordyceps sp.2	1.08	1.23	5.77	18.95	72.87
Ophiocordyceps sp.3	2.56	1.32	11.6	5.87	78.85

4.5.2 การวิเคราะห์ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของเชื้อรา

เชื้อราที่มีปริมาณเบต้ากลูแคนสูงหลายชนิดพบว่ามีองค์ประกอบที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟินอลิค สารประกอบฟลาโวนอยด์ กรดแอสคอร์บิก เบต้าแคโรทีนและไลโคปีน และพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระถือว่าเป็นคุณสมบัติทางเคมีที่สำคัญอีกคุณสมบัติหนึ่งที่มีรายงานการวิจัยหลายเรื่องพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการยับยั้งหรือต่อต้านการเกิดเซลล์มะเร็ง และอาจมีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Ribeiro et al. 2008) ดังนั้นนอกจากเบต้ากลูแคนแล้ว สารต้านอนุมูลอิสระอาจทำหน้าที่เสริมหรือมีส่วนช่วยให้การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเชื้อราดีขึ้น ซึ่งจะสามารถช่วยบอกแนวโน้มหรืออธิบายความสัมพันธ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในเซลล์ทดลองต่อไป จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า สารประกอบฟินอลิคพบได้ในปริมาณมากที่สุดใน *O. irangiensis*, *O. myrmecophila*, *O. nutans* และ *O. nutans* โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 23-25 มิลลิกรัม gallic acid equivalent ส่วนในเชื้อราที่มีปริมาณของสารประกอบฟินอลิคในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับเชื้อราทั้งหมดที่ทำการศึกษาได้แก่ *O. sphecocephala*, *Ophiocordyceps* sp.1, *Ophiocordyceps* sp.2 และ *Ophiocordyceps* sp.3 โดยมีปริมาณของสารประกอบฟินอลิคอยู่ในช่วง 10.5 19 มิลลิกรัม gallic acid equivalent ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปริมาณของสารประกอบฟินอลิคอาจมีความสัมพันธ์ต่อปริมาณของเบต้ากลูแคนซึ่งอาจมีผลต่อการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อพบว่าเชื้อราชนิดนี้ ที่มีปริมาณเบต้ากลูแคนสูง จะมีปริมาณของสารประกอบฟินอลิคสูงด้วย

ผลการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดสารประกอบฟลาโวนอยด์พบว่า เชื้อราที่ทำการศึกษาทุกชนิดมีสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ และมีอยู่ในช่วงปริมาณตั้งแต่ 13-43 มิลลิกรัมของ chatechin equivalent ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม และพบว่า *O. myrmecophila* และ

O. nutans มีปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ ประมาณ 37-43 มิลลิกรัมของ chatechin equivalent ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ซึ่งเชื้อราทั้งสองชนิดพบว่ามีปริมาณของเบต้ากลูแคนอยู่ในระดับปานกลางถึงใกล้เคียงกับปริมาณของเบต้ากลูแทนที่พบใน *O. irangiensis*

อย่างไรก็ตามในเชื้อราที่ทำการศึกษาทุกชนิดพบว่า ไม่มีกรดแอสคอร์บิก หรือไวตามินซีเป็นองค์ประกอบ แต่เชื้อราทุกชนิดมีสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเบต้าแคโรทีน และไลโคปีนอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยปริมาณของเบต้าแคโรทีนอยู่ในช่วงปริมาณที่สูงกว่าสารประกอบไลโคปีนในเชื้อราทุกชนิด โดยอยู่ในปริมาณตั้งแต่ 17-24 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ส่วนไลโคปีนพบอยู่ในช่วง 8-15 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม และเชื้อราที่พบว่ามีปริมาณเบต้าแคโรทีนมากที่สุด ได้แก่ *Ophiocordyceps* sp.1 และ *Ophiocordyceps* sp.2 (ประมาณ 23-24 ไมโคกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม) ส่วน *Ophiocordyceps* sp.3 พบว่ามีปริมาณไลโคปีนสูงสุด (ประมาณ 14-15 ไมโคกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม) เมื่อพิจารณาฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า เชื้อราทุกชนิดที่ทำการศึกษามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในค่าที่สูง โดยเฉพาะ *Ophiocordyceps* sp.2 และ *Ophiocordyceps* sp.3 พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งเชื้อราเหล่านี้พบว่ามีปริมาณของเบต้ากลูแคนอยู่ในช่วงปานกลางถึงสูงด้วย คือ 0.3% ของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ยกเว้นใน *Ophiocordyceps* sp.1 ที่มีปริมาณเบต้ากลูแคนเพียง 0.05% ของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง และเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างเชื้อราด้วยวิธี FRAP assay พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay สำหรับตัวอย่าง *O. irangiensis*, *O. myrmecophila* และ *O. nutans* ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดคือเกือบ 50 uM ของ ferric iron ที่ถูกรีดิวซ์ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ในขณะที่ *O. sphecocephala* กลับพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay น้อยกว่าที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH

ตารางที่ 4.6 สารต้านอนุมูลอิสระและ antioxidant activity ของเชื้อรา *Ophiocordyceps* ชนิดต่างๆ

เชื้อรา	สารประกอบฟิโนลิค (mg of gallic acid/g of dried extract)	สารประกอบฟลาโวนอยด์ (mg of chatechin/g of dried extract)	กรดแอสคอร์บิค (mg of ascorbic acid/g of dried extract)	เบต้าร์แคโรทีน และ ไลโคปีน (µg of carotenoid/g of dried extract)		DPPH (%RSA)	FRAP (µM of ferric iron reduced/g of dried extract)
				ß-carotene	Lycopene		
O. irangiensis	23.45	13.13	0	18.77	12.33	73	27.17
O. myrmecophila	2.41	24.54	0	18.18	11.67	78	34.14
O. nutans	13.44	37.17	0	19.51	12.15	86	50.31
O. sphecocephala	10.5	43.33	0	19.22	11.82	79	23.23
O. phiocordyceps sp.1	14.44	26.56	0	18.92	15.33	89	19.19
O. phiocordyceps sp.2	18.78	41.17	0	16.53	11.16	87	27.87
O. phiocordyceps sp.3	3.45	21.17	0	21.17	10.83	67	32.51

4.5.3 การสกัดแยกเบต้ากลูแคนและวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเบต้ากลูแคนจากเชื้อรา

การสกัดแยกเบต้ากลูแคนจากเชื้อรา

จากผลการศึกษาปริมาณเบต้ากลูแคนในเชื้อราที่รวบรวมได้จากพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์พบว่า และนำมาเพาะเลี้ยง แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Ophiocordyceps* ที่เพาะเลี้ยงได้ในปริมาณน้อย ดังนั้นจึงนำมาสกัดเบต้ากลูแคน โดยร้อยละของสารสกัดเบต้ากลูแคนแสดงในรูปของ % Yield ที่ได้ในเชื้อราแต่ละชนิดแสดงใน ตารางที่ 4.7 ซึ่งวิธีการสกัดที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นวิธีดัดแปลงมาจาก Rhee et al. (2008) เป็นการสกัดโดยใช้ด่าง (alkaline extraction) จากผลการสกัดพบว่าเชื้อรา *Ophiocordyceps* ทุกชนิดให้ปริมาณของเบต้ากลูแคนสกัดได้ในปริมาณต่ำมาก โดย % yield ของการสกัดใน *O. myrmecophila* มีค่ามากสุด รองลงมาได้แก่ *O. irangiensis* และ *O. nutans* ส่วนชนิดอื่นให้ค่า % extraction yield ที่ต่ำมาก

ตารางที่ 4.7 ปริมาณ Beta-glucan ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Ophiocordyceps*

ตัวอย่าง	ตัวอย่าง (g)	Beta-glucan (g)	% Yield
O. irangiensis	200	0.26	0.14
O. myrmecophila	200	0.32	0.16
O. nutans	50	ต่ำกว่าค่า detection	ต่ำกว่าค่า detection
O. sphecocephala	50	ต่ำกว่าค่า detection	ต่ำกว่าค่า detection
O. phiocordyceps sp.1	50	ต่ำกว่าค่า detection	ต่ำกว่าค่า detection
O. phiocordyceps sp.2	50	ต่ำกว่าค่า detection	ต่ำกว่าค่า detection
O. phiocordyceps sp.3	50	ต่ำกว่าค่า detection	ต่ำกว่าค่า detection

4.5.4 การศึกษา Beta glucans ชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ

เชื้อรา *O. myrmecophila* เป็นเชื้อราที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมากสุด ท่ามกลางชนิดอื่นที่มีข้อจำกัดในการเจริญมาก โดยจะนำเชื้อรามาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C และวิเคราะห์ชนิดของใยอาหาร (dietary fiber) ด้วยวิธี enzymatic-gravimetric method ซึ่งสารสกัดเชื้อราจะถูกทำปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ amylase protease และ amyloglucosidase ผลการศึกษาพบว่า เชื้อรา *O. myrmecophila* มีปริมาณของใยอาหารรวมทั้งหมดค่อนข้างสูง (45%) และเป็นใยอาหารชนิดที่ไม่ละลายน้ำ 41% และชนิดที่ละลายได้ในน้ำ 4% และเมื่อทำการสกัดเบต้ากลูแคนด้วยวิธีการสกัดด้วยด่าง (Rhee et al.,2008) ซึ่งเป็นวิธีการสกัดเบต้ากลูแคนชนิดที่ละลายน้ำได้นั้น พบว่ามีปริมาณเบต้ากลูแคนเท่ากับ 0.58 มิลลิกรัมในตัวอย่างแห้ง 100 มิลลิกรัม ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในใย

อาหารชนิดที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดที่พบใน *O. myrmecophila* นั้นมีเบต้ากลูแคนคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 4.85% ของใยอาหารชนิดที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณ beta glucan ที่ละลายน้ำได้ ในเชื้อรา *O. myrmecophila*

เส้นใยอาหาร	**ปริมาณ (% w/w)**	**Beta glucan ละลายน้ำได้ (% w/w)**	**Beta glucan ใยอาหารที่ละลายน้ำได้ (%)**
เส้นใยอาหารทั้งหมด	45.10		
เส้นใยอาหารที่ละลายน้ำได้	4.58	0.58	4.85
เส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ	41.10		

4.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวภาพของเชื้อรา *Ophiocordyceps*

ส่วนประกอบของ cordycepin และ adenosine ที่พบในเชื้อรา *O. nutans* คือ cordycepin 440.65 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และจาก *O. sphecocephala* 306.41 มก./100 กรัม, ในขณะที่ *O. irangiensis* พบ cordycepin 230.86 มก./100 กรัม พบ adenosine ใน *O. irangiensis* เท่ากับ 13.80 มก./100 กรัม ตามด้วยใน *O. nutans* 5.90 มก./100 (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 ปริมาณ Cordycepin และ Adenosine จากเชื้อรา *Ophiocordyceps*

ตัวอย่าง	**สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (มก./100 ก.)**	
	Cordycepin	Adenosine
O. irangiensis	230.86	13.80
O. myrmecophila	230.00	3.40
O. nutans	440.65	5.90
O. sphecocephala	306.41	4.51

นอกจากนี้พบว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดมีค่าระหว่าง 0.01 ถึง 4.14 มก./กรัม ใน *O. irangiensis* และ 0.01 ถึง 7.37 มก./กรัม ใน *O. nutans* มีค่าสูงสุด ปริมาณของกรดอะมิโนหลักมีค่า arginine 7.37 มก./กรัม, methionine 2.96 มก./กรัม และ proline 2.34 มก./กรัม *O. myrmecophila* มี alanine 3.96 มก./กรัม, valine 0.96 มก./กรัม และ leucine 0.57 มก./กรัม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4.10 ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ จากเชื้อรา *Ophiocordyceps*

	ปริมาณ (มก./ก.)		
กรดอะมิโน	***O. irangiensis***	***O. myrmecophila***	***O. nutans***
Aspartic acid	0.05	0.13	0.31
Serine	0.08	0.25	0.49
Glutamic acid	0.06	0.24	0.51
Glycine	0	0.29	0
Histidine	0.02	0.23	0.01
Arginine	4.14	0	7.37
Threonine	0	0	0
Alanine	1.70	3.96	3.03
Proline	0.59	0	2.34
Tyrosine	0.01	0.02	0
Valine	0	0.96	0
Methionine	0.94	0	2.96
Lysine	0.10	0.28	1.35
Isoleucine	0	0.23	1.11
Leucine	1.02	0.57	1.39
Phenylalanine	0.16	0.18	0.29
รวม	**7.80**	**5.49**	**5.40**

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การสำรวจ รวบรวม จำแนกชนิด และระบุจุดพิกัด ของแมลงที่ถูกเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ลงทำลาย ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2558 - กันยายน 2559 ในช่วงพิกัด เส้นรุ้งที่ 18 องศา 24 ลิปดา 00 พิลิปดาเหนือ (พิกัด UTM; 2034381 N) ถึง 18 องศา 40 ลิปดา 00 พิลิปดาเหนือ (พิกัด UTM; 2063808 N) และเส้นแวงที่ 98 องศา 24 ลิปดา 00 พิลิปดาตะวันออก (พิกัด UTM; 436635 E) ถึง 98 องศา 41 ลิปดา 00 พิลิปดาตะวันออก (พิกัด UTM; 466609 E) ความสูงจากระดับทะเลปานกลาง 2,565 เมตร ครอบคลุม พื้นที่บริเวณอ่างกาก็ว แม่ปาน และน้ำตกวชิรธาร ของอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ สามารถรวบรวมตัวอย่างเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* รวมทั้งหมด 71 ตัวอย่าง โดยพบว่าแมลงอาศัยที่ถูกเชื้อราชนิดนี้ลงทำลาย โดยมากเป็น มด และจักจั่น นอกจากนี้ยังได้พบในแมลงอาศัยในกลุ่มด้วง ผึ้ง และหนอนผีเสื้อ ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดด้วย และจากการจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* สามารถระบุได้ว่า 48 ตัวอย่าง คือ เชื้อรามดซอมบี้ (zombie ant fungus) หรือ *Ophiocordyceps irangiensis* และ ที่ทำลายจักจั่นคือ เชื้อราจักจั่น (cicada fungus หรือ cicada flower) หรือ *Ophiocordyceps myrmecophila*a และ *Ophiocordyceps sphecocephala, Ophiocordyceps nutans* ส่วนที่เหลืออีก 6 ตัวอย่าง ยังไม่สามารถระบุชนิดได้

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางนิเวศวิทยาประชากรของเชื้อราเหล่านี้ พบว่ามีการแพร่กระจายสูงในช่วงตั้งแต่เดือนตุลาคม ถึงเดือนธันวาคม โดยมีการแพร่กระจายสูงสุดในเดือนธันวาคม และมีดัชนีความหลากหลายทางชนิด โดยการใช้การคำนวณค่าดัชนีความหลากหลาย (Diversity index) ทางชนิด เช่น Shannon-Wiener Index (Shannon, 1948, pp.623-656) มีค่าเท่ากับ 0.56 อีกทั้งได้มีการจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงพื้นที่ (spatial distribution) ในรูปแผนที่การแพร่กระจายแบบจุด (dot distribution map) และเชื่อมโยงกับระบบภูมิสารสนเทศ (Geographic information systems - GIS) อ้างอิงถึงตำแหน่งที่มีอยู่จริงบนพื้นโลก เพื่อนำเสนอข้อมูลความหลากหลายทางชนิดควบคู่ไปกับข้อมูล การแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ (Geographical distribution) โดยใช้โปรแกรม ArcView GIS เพื่อการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์โรคแมลง และความหลากหลายทางชนิดที่พบ ผ่านระบบออนไลน์ ณ ปัจจุบัน

จากการวิเคราะห์ Ophiocordyceps spp. ทั้ง 4 สปีชีส์ คือ Ophiocordyceps nutans, Ophiocordyceps myrmecophila, Ophiocordyceps sphecocephala และ Ophiocordyceps irangiensis และที่ไม่สามารถระบุชื่อได้อีก 3 สปีชีส์ คือ Ophiocordyceps sp.1 Ophiocordyceps sp.2 และ Ophiocordyceps sp.3 แยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ทุกสปีชีส์นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในอาหารวุ้นที่มีสูตรอาหาร pH และอุณหภูมิ

ต่างๆ เป็นเวลา 15-60 วันในที่มืด พบว่าทุกสปีชีส์ได้ดีในอาหาร potato dextrose agar ที่มี pH เริ่มต้น 5-6 ที่อุณหภูมิ 25° C และสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบเทียมได้ ยกเว้น *Ophiocordyceps nutans*

จากการวิเคราะห์สาร cordycepin ในเชื้อรา พบปริมาณ cordycepin สูงที่สุดใน *O. nutans* คือ 440.65 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และใน *O. nutans* พบปริมาณกรดอะมิโนหลัก arginine สูงสุดถึง 7.37 มก./กรัม

อภิปรายผล

จากตัวอย่างแมลงและแมงมุมที่พบถูกทำลายโดยเชื้อราโรคแมลงในวงศ์ Ophiocordycipitaceae ที่พบบนต้นพืชในระดับความสูงไม่เกิน 1.5 เมตร รวมทั้ง พื้นดิน ตามวิธีของ Poinar and Thomas (1984, 392pp.) ซึ่งพบว่าสามารถรวบรวมตัวอย่างได้ 71 ตัวอย่าง โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีความชื้นสูงเช่นบริเวณน้ำตกในเขตวนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อีกทั้งช่วงเดือนที่พบมากจะเป็นช่วงปลายฝนต้นหนาว แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบอุปสรรค์คือการเกิดภัยแล้งในช่วงปี 2558 ซึ่งส่งผลอย่างมากต่อการพบตัวอย่างแมลงที่ติดเชื้อ เนื่องจากความแห้งแล้งของอากาศไม่เหมาะสมต่อการก่อโรคของเชื้อรา ประกอบกับการเกิดไฟป่าเป็นระยะ ทั้งนี้จากการจำแนกชนิดพบว่า เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* ที่สำรวจพบมากที่สุดได้แก่ *O. irangiensis* ซึ่งลงทำลายมด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kittakoopa *et al.* (1999, pp. 453–457) ซึ่งได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราชนิดนี้ และอ้างว่าเป็นเชื้อราที่สำคัญในการก่อโรคกับมดสกุลต่างๆ โดยทั้งนี้จากผลการศึกษาของนี้ชี้ว่าเชื้อราดังกล่าวก่อโรคกับมดมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pontoppidan *et al.* (2009) ซึ่งรายงานว่า *O. irangiensis* มีความสำคัญต่อประชากรมด และเป็นชื้อราสาเหตุโรคแมลงชนิดหนึ่งซึ่งทำลายมดมากที่สุด โดยจากการสำรวจในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยสามารถพบมดที่ติดเชื้อนี้ ถึง 26 ตัวต่อตารางเมตร ในส่วนของเชื้อรามดซอมบี้ (zombie ant fungus) หรือ *O. irangiensis* ที่พบบนมดซอมบี้ (zombie ant) หรือ มด *Camponotus leonardi* ที่พบในเขตร้อนและในประเทศไทยที่สถานีรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาช่อง จังหวัดตรัง (Harmon, 2009, Pontoppidan *et al.,* 2009, Evans *et al.,* 2011, pp. 598-602) อาจเป็น *Ophiocordyceps irangiensis* sensu lato complex

ส่วนวินันท์ดา หิมะมาน และคณะ (2554, น.13) รายงานว่า การสำรวจและเก็บตัวอย่างราทำลายแมลงและแมงมุม ที่ดำเนินการระหว่างเดือนธันวาคม 2550 ถึงกันยายน 2552 ในกลุ่มป่าแก่งกระจาน โดยเฉพาะพื้นที่อุทยานแห่งชาติแก่งกระจานและอุทยานแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติไทยประจันจังหวัดเพชรบุรี พบเชื้อรา Ophiocordyceps spp. รวม 10 ชนิดคือ O. communis, O. dipertigena, O. humbertii, O. irangiensis, O. irangensis myrmecophila, O. myrmecophila, O. nutans, O. pseudolloydii, O. sphaecocephala และ O. irangiensis กับต่อมาได้เพิ่ม O. myrmecophilaa รวมเป็น 11 ชนิดโดยเชื้อรา Ophiocordyceps spp. ทั้งหมดพบว่าลงทำลายแมลงส่วนใหญ่ในอันดับ Hymenoptera ยกเว้น *O. dipertigena* ลงทำลายแมลงในอันดับ Diptera และ *O. nutans* ลงทำลายแมลงในอันดับ Hemiptera ส่วนเชื้อราอีกชนิดหนึ่งคือ *O. myrmecophilaa* คงจะได้ชื่อในภายหลัง

แต่ไม่ได้ระบุชนิดของแมลงอาศัย และยังไม่มีรายงานยืนยันที่แน่นอน แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานของ Hsu *et al.* (2015, p.432) ว่าเชื้อราที่ทำลายจักจั่นคือ *C.cicadae* ซึ่งเป็นเชื้อในสกุล *Ophiocordyceps* อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีสรรพคุณทางยาและเภสัชกรรม ทั้งนี้จึงควรมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป ซึ่งอาจใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลในการจำแนกเพื่อยืนยันว่าเชื้อราสองชนิดที่ทำลายจักจั่นนั้นเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ ทั้งนี้จากการที่การศึกษาในครั้งนี้ มีการบันทึกจุดพิกัดของแหล่งที่พบแมลง และ/หรือ แมงมุมที่ถูกทำลายโดยเชื้อราโรคแมลงในวงศ์ Ophiocordycipitaceae ประกอบกับการวิเคราะห์ข้อมูลทางนิเวศวิทยาประชากรของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ซึ่งเก็บตัวอย่างได้จากอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ นำมาบูรณาการกับระบบภูมิสารสนเทศ (Geographic information systems - GIS) อ้างอิงถึงตำแหน่งที่มีอยู่จริงบนพื้นโลกเพื่อนำเสนอข้อมูลความหลากหลายทางชนิดควบคู่ไปกับข้อมูล (Geographical distribution)น่าจะมีประโยชน์ในการต่อยอดการวิจัย โดยช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตามเก็บตัวอย่างเพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ทำได้ด้วยวิธี single spore isolation และ tissue culture บนอาหาร potato dextrose agar จากการศึกษาในขั้นต้นพบว่าการแยกเชื้อด้วยวิธี tissue culture ใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อให้เจริญเป็นเส้นใย และมักเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียหรือยีสต์บนชิ้นเนื้อเยื่อที่วางบนอาหาร การแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์จึงทำได้ยาก สำหรับการแยกเชื้อโดยวิธี single spore isolation พบว่าสปอร์สามารถงอกเป็นเส้นใย และเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้รวดเร็วกว่า รวมทั้งมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นน้อยกว่าด้วย วิธีนี้จึงน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps*

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บนอาหารวุ้น corn meal agar, Czapek's agar, malt extract agar, oat meal agar และ potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า Ophiocordyceps เจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar ได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่นๆ อาจเนื่องมาจากอาหารชนิดนี้มีสารอาหารต่างๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *Ophiocordyceps* มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น (corn meal agar, malt extract agar และ oat meal agar) หรืออาจเป็นเพราะว่าอาหาร potato dextrose agar มีแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* จึงนำไปใช้ได้ง่ายกว่าในขณะที่แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ สำหรับอาหารสังเคราะห์ (Czapek's agar) เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ไม่ดี อาจเป็นเพราะอาหารชนิดนี้มีแหล่งคาร์บอนที่ย่อยสลายยากและยังขาดแคลนวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยด้วย เชื้อ *Ophiocordyceps* จึงเจริญได้เพียงเล็กน้อย ถ้าหากมีการปรับสูตรอาหาร Czapek's agar ให้มีความเหมาะกับการเจริญของ *Ophiocordyceps* ก็อาจนำอาหารชนิดนี้ไปใช้ในการทดสอบความต้องการแหล่งอาหารของเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ได้ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Wang (1989) ที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* 7 สปีชีส์ และ Sung and Hyun (1995) เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* 6 สปีชีส์ ก็พบว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar เช่นเดียวกัน

เมื่อเทียบอัตราการเจริญเติบโตในอาหาร potato dextrose agar ของเชื้อบริสุทธิ์ของ Ophiocordyceps กับการเจริญของฟังไจชนิดอื่นพบว่าเชื้อ *Ophiocordyceps* เจริญได้ค่อนข้างช้า สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ *Ophiocordyceps* ต้องการสารอาหารบางอย่างจากแมลงในการเจริญของเส้นใยด้วย ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Sung (2000) ที่ทดลองเลี้ยง *Ophiocordyceps militaris* ในอาหารที่มีข้าวและดักแด้ของแมลงเป็นส่วนประกอบ พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญเติบโตได้ดีและยังสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar ที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 20, 25, 30, 37 45° C และที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) พบว่า *Ophiocordyceps* ทุกสปีชีส์สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20, 25 และที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2° C) โดยเจริญได้ดีที่ 25° C มีบางสปีชีส์เจริญได้ที่ 30° C แต่เจริญได้ไม่ดีนัก ที่อุณหภูมิ 37 และ 45° C ไม่พบการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ ผลการทดลองนี้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อ *Ophiocordyceps* ของ Hywel-Jones (1994); Sung *et al*. (1995) ที่รายงานว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 22 และ 20° C ตามลำดับ

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บนอาหาร potato dextrose agar ที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 4, 5, 6, 7, 8 และ ไม่ปรับ pH (pH 5.6) ที่อุณหภูมิ 25° C พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ในอาหารทุก pH ที่ทดลอง กล่าวคือมีความกว้างของโคโลนีใกล้เคียงกัน โดยอาหารที่มี pH 5-6 จะเป็นอาหารที่เส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์เจริญได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Ophiocordyceps* เจริญได้ในอาหารที่มี pH ทั้งที่เป็นกรดและเบส โดยจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดอ่อน

โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในเชื้อราที่มีปริมาณของใยอาหารสูงจะมีปริมาณของbeta glucan มากด้วย (Bhatty 1992; Whang 1998; Manzi et al. 2001) อย่างไรก็ตามโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของหมู่ทางเคมีของbeta glucan ในเชื้อราแต่ละชนิดอาจจะมีผลต่อคุณสมบัติทางเคมีของ beta glucan ที่สามารถถูกย่อยด้วยกรดหรือด่างอย่างอ่อนในขั้นตอนของการวิเคราะห์เยื่อใยได้ ทำให้ได้ปริมาณของเยื่อใยในระดับที่ต่างกัน เชื้อราชนิดที่ทำการศึกษาและพบว่ามีปริมาณของใยอาหารสูง ได้แก่ *Ophiocordyceps* sp.1, *O.* sp.2 และ *O.* sp.3

โดยผลการศึกษาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในตัวอย่าง *Ophiocordyceps* sp.1, *O.* sp. 2, และ *O.* sp.3 ที่ทำการศึกษาและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการวิเคราะห์ทั้งวิธี DPPH assay และ FRAP assay และเปรียบเทียบกับชนิดและฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบใน *O. irangiensis* และ *O. myrmecophila* พบว่า สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่พบได้ใน *O. irangiensis* และ *O. myrmecophila* สามารถพบได้ใน *Ophiocordyceps* sp.1, *O.* sp. 2, และ *O.* sp.3 ที่มีปริมาณเบต้ากลูแคนสูงหลายชนิด รวมถึงเชื้อราทั้งสามชนิดนี้ มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระที่สูงใกล้เคียงกับ *O. irangiensis* และ *O. myrmecophila* อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านการเกิดมะเร็ง และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Hwan et al. 2009) ดังนั้นเชื้อราทั้งสามชนิดนี้อาจมีแนวโน้มที่สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นการสร้างระบบภูมิคุ้มกันในเซลล์ทดลองได้ดี และสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ที่พบในเชื้อรา อาจมีผลในการช่วยเสริมการกระตุ้นระบบ

ภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตาม จาก *O. nutans* เป็นชนิดที่สามารถเก็บรวมรวมได้ในปริมาณมากที่สุดในฤดูกาลในช่วงเดือนมิถุนายน-มกราคมในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

จากผลการสกัดพบว่าเชื้อรา *Ophiocordyceps* ทุกชนิดให้ปริมาณของเบต้ากลูแคนสกัดได้ในปริมาณต่ำมาก โดย % yield ของการสกัดใน *O. myrmecophila* มีค่ามากสุด รองลงมาได้แก่ *O. irangiensis* และ *O. nutans* ส่วนชนิดอื่นให้ค่า % extraction yield ที่ต่ำมาก นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดโดยใช้เอนไซม์ และการสกัดด้วยด่างในข้าวโอ๊ต พบว่า % extraction yield จากการสกัดด้วยเอนไซม์จะมีค่าสูงกว่า (Johansson et al., 2007)

ข้อเสนอแนะในการนำผลงานวิจัยไปใช้และการทำวิจัยครั้งต่อไป

การศึกษาในโครงการนี้ เป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสำรวจความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราทำลายแมลงชนิดต่างๆ ในสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบในพื้นที่วนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์ในปีแรกของการวิจัย คือการระบุชนิด คำนวณหาดัชนีความหลากหลายทางชนิด และสร้างข้อมูลภูมิสารสนเทศจาก https://www.google.com/maps/d/viewer?mid=cHhbEiVuYDmLUNYqfzJtUh-VM (Google Maps, 2014) ซึ่งจะมีส่วนช่วยเสริมพื้นฐานงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อยอดการวิจัยในปีต่อไป กล่าวคือจะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการเข้าสู่พื้นที่และจุดที่พบการระบาดของเชื้อราดังกล่าว โดยอาศัยระบบนำทางจากระบบดาวเทียม Google Earth ซึ่งจะเป็นการลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการสำรวจและการดำเนินงานวิจัย เช่น การเข้าเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ โดยการศึกษานี้ในปีวิจัยที่สอง ได้คาดหวังว่าจะมีการเก็บตัวอย่างเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceops* ที่อาจสามารถนำมาจำแนกสายพันธุ์ (isolates) เพื่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ และนำมาวิเคราะห์สารประกอบเพื่อการใช้ประโยชน์ในทางยาและเภสัชกรรม ซึ่งอาจช่วยนำไปสู่การลดหรือทดแทนการนำเข้าถั่งเช่า หรือ *Ophiocordyceps sinensis* หรือ *Ophiocordyceps* ชนิดอื่นๆ จากต่างประเทศในอนาคตได้

เนื่องงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสำรวจความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราทำลายแมลงชนิดต่างๆ ในสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบในพื้นที่วนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ทำให้ทราบว่า การศึกษา *Ophiocordyceps* ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก และยังอยู่ในวงจำกัด ข้อมูลต่างๆ รวมทั้งหนังสือ หรือรูปวิธานมีอยู่น้อย จึงเกิดปัญหาในการบ่งบอกชื่อวิทยาศาสตร์ในระดับสปีชีส์ จึงควรสอบถามข้อมูลโดยตรงจากผู้เชี่ยวชาญหรือผู้ที่ศึกษา *Ophiocordyceps* มาก่อนควรทำฐานข้อมูลและ pictorial key เพื่อให้งานอนุกรมวิธานทำได้รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

กนก เลิศพานิช. (2557). *นิเวศวิทยาประชากร (Population Ecology).* ค้นเมื่อ 27 กรกฎาคม 2557. จาก http://www.kmitl.ac.th/agritech/nutthakorn/04090035_2202/multiweb/environ/pdf/population.pdf.

กรมแผนที่ทหาร. (2535*). แผนที่สภาพภูมิประเทศจังหวัดเชียงใหม่ มาตราส่วน 1:50,000.* กรุงเทพมหานคร: กระทรวงกลาโหม.

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย. (2557). *ศูนย์วิจัยภูมิสารสนเทศเพื่อประเทศไทย.* ค้นเมื่อ 27 กรกฎาคม 2557. จาก http://www.gisthai.org/about-gis/gis.html.

ไทยออฟโรดดอทคอม. (มปป.). *แหล่งท่องเที่ยวพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์.* ค้นเมื่อ 27 กรกฎาคม 2557. จาก http://www.thailandoffroad.com/.

นิวัติ อนงค์รักษ์. (2545). *ลำดับดินบนพื้นที่สูงที่ได้รับอิทธิพลจากการใช้ประโยชน์ที่ดินและสิ่งปกคลุมดินในบริเวณดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่.* วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุ่งเกียรติ แก้วเพชร และศมาพร แสงยศ. (2559). *แฟ้มข้อมูลแผนที่เพื่อการวิจัยและการเรียนการสอน.* กรุงเทพมหานคร.

วรรณฤดี หิรัญรัตน์. (2557). *สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ (Bioactive Compounds from Endophytic Fungi).* ค้นเมื่อ 27 กรกฎาคม 2557. จาก http://rms.rdi.tsu.ac.th/ejournal/jornaldetail/12_2/10.pdf

วินันท์ดา หิมะมาน จันจิรา อายะวงศ์ กิตติมา ด้วงแค และกฤษณา พงษ์พานิช. (2554). *ความหลากหลายของราทำลายแมลงและแมงมุมในกลุ่มป่าแก่งกระจาน. สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช.* กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. น.13.

สารานุกรมเสรี. (2557). *ถั่งเช่า.* ค้นเมื่อ 27 กรกฎาคม 2557. จาก http://th.wikipedia.org/wiki/ถั่งเช่า.

สุชาดา มงคลสัมฤทธิ์ เจเน็ต เจนนิเฟอร์ เหลืองสะอาด กนกศรี ทัศนาทัย และสมศักดิ์ ศิวิชัย. (2553). *ราก่อโรคในแมลงของประเทศไทย*. ปทุมธานี: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. น.163.

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

An, D., Zhu, B., (2012). *Optimization of enzyme extraction conditions of cordycepin polysaccha- ride by using response surface methodology. J. Anhui Agric. Sci.* (25)120.

AOAC (1990). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists.* Vol. II. (15th ed.) AOAC International, Arlington.

Ban, S., Sakane T., Toyama, K. & Nakagiri, A. (2009). *Teleomorph-anamorph relationships and reclassification of Cordyceps cuboidae and its allied species. Mycoscience*, 50, 261-272.

Bao, J.S., Cai, Y., Sun, M., Wang, G.Y., Corke, H. (2005). *Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (Myrica rubra) extracts and their color properties and stability. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2327–2332.

Baral, B. & Maharjan, J. (2012). *In-vitro culture of Ophiocordyceps sinensis (Yarsagumba) and their associated endophytic fungi of Nepal Himalaya. Scientific World*, 10 (10), 38-42.

Bhatty, R.S. (1992). *Total andextractab le b-glucan contents of oats andtheir relationship to viscosity. Journal of Cereal Science,* 15: 185–192.

Blackwell, M. (1984). *New information on Cordycepioideus bisporus and Cordycepioideus octosporus. Mycologia*, 76(4), 763-765.

Boesi A. & Cardi, F. (2009*). Cordyceps sinensis Medicinal Fungus: Traditional Use among Tibetan People, Harvesting Techniques, and Modern Uses by HerbalGram*, 83, 52-61.

Bok, J.W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H. & Towers, G.N. (1999). *Antitumour sterols from the mycelia of Cordyceps sinensis. Phytochemistry,* 51, 891-898.

Burrough, P.A. & McDonnell, R.A. (1998). *Principles of geographical information systems*. Oxford: Oxford University Press, p.327.

Chen, X., Wang, Z., Hua, C., Zhou, F., Wang, R., Wang, X., et al., (2014). *Optimization of the extraction of Cordyceps militaris polysaccharides by combined ultrasonic wave treatment and enzyme hydrolysis. Food Sci. Technol*. 39, 142-147.

Chen, X.L., Wu, G.H., Gu, Q.X., Huang, Z.L., (2010). *Optimization of extraction process of polysaccharides from fruiting body of Cordyceps militaris L. Link by orthogonal test. Med. Plan.t* 1, 92-94.

Chen, Y.J., Shiao, M.S., Lee, S.S. & Wang, S.Y., (1997*). Effect of Cordyceps sinensis on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells*. *Life Sciences, 60*, 2349–2359.

Copping, L.G. (2009). The manual of biocontrol agents. 4th ed. Hampshire, UK: BCPC, 702 pp.

Dictionary. (2014). *Perithecia.* Retrieved July 28, 2014. From http://dictionary.reference.com/browse/Perithecia?s=t

Dong, C.-H., Xie, X.-Q., Wang, X.-L., Zhan, Y., Yao, Y.-J., 2009. *Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharides extraction from cultured mycelium of Cordyceps sinensis. Food Bioprod. Process* 87, 139-144.

Evan, H. C., & Samson, R.A. (1982). Cordyceps species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems: The Cephalotes (Myrmicinae) complex. *Transaction British Mycological* Society, 79 (3), 431-453.

Evan, H.C., Simon, L.E. & Hughes, D.P. (2011). *Ophiocordyceps irangiensis - A keystone species for unraveling ecosystem functioning and biodiversity of fungiin tropical forests*? *Commucatives & Integrative Biology*, 4(5), 598-602.

Gao, F., Yu, Y., Liu, J., Zhang, S., (2010). *Study on extraction of polysaccharides from Cordyceps militaris assisted by hot water. Food Sci.* Technol. 213-216.

Gao, F., Zhang, S., Liu, J., Yu, Y., (2009). Ultra high pressure extraction of polysaccharides from *Cordyceps militaris* (L. Fr) Link. *Food Sci* 16, 41-43.

Google. *Maps.* (2014). Retrieved July 27, 2014. https://www.google.com/maps/d ?mid=1cHhbEiVuYD6mLUNYqfz5JtUh-VM

Harmon, K. (2009). *Fungus makes zombie ants do all the work". Scientific American*. Retrieved 2010-08-22.

Heleno, S.A., Lillian, B.L., Sousa, M.J., Martins, A, Ferreira, R. (2009). *Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography*. *Microchemical Journal* 93: 195-199.

Hendricks, C.A. (1981). *Soil-vegetation relations in the north continental highland region of Thailand: A preliminary investigation of soil-vegetation correlation*. *Soil Survey Report Technical Bulletin*, 32, 1-112.

Holliday, J. & Cleaver, M. (2008). *Medicinal value of the caterpillar fungi species of Genus Cordyceps (Hr.) Ling (Sacomycetes).* A review. *International Journal of Medicinal Mushroom*, 10(3), 219-234.

Hobbs, C. (1995*). Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing, & culture. 2nd ed.* Santa Cruz, CA, USA: Botanica Press, 252 pp.

Hsu, J.H., Jhou, B.Y., Yeh, S.H., Yen-lien Chen, Y.I. and Chin-Chen, C.C. (2015). *Healthcare Functions of Cordyceps cicadae. Journal of Nutrition & Food Sciences,* 5(6), 432. Doi: 10.4172/2155-9600.1006432

Huang, L., Q. Li. Y. Chen, X. Wang and X. Zhou. (2009). *Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of Cordyceps spp*. *African Journal of Microbiology Research*, 3 (12): 957-961.

Huang, Q.-L., Siu, K.-C., Wang, W.-Q., Cheung, Y.-C., Wu, J.-Y., (2013). *Fractionation, charac- terization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a Cordyceps sinensis fungus*. *Process Biochem*. 48, 380-386.

Hywel-Jones, N. L. (1994). *Cordyceps khaoyaiensis and Cordyceps pseudomilitaris, two new pathogens of lepidopteran larvae from Thailand. Mycological Research*, 98, 939-942.

Hywel-Jones, N. L. (1995a). *Cordyceps sphecocephala* and a *Hymenostilbe* sp. infecting wasps and bees in Thailand. *Mycological Research*, 99, 154-158.

Hywel-Jones, N. L. (1995b). *Cordyceps nutans* and its anamorph, a pathogen of Hemipteran bugs in Thailand. *Mycological Research*, 99, 724-726.

Hywel-Jones, N. L. (1995c). *Cordyceps brunneapunctata* sp. nov. infecting beetle larvae (Coleoptera: Elateridae) in Thailand. *Mycological Research*, 99, 1195-1198.

Hywel-Jones, N. L. (1996). *Cordyceps myrmecophila* -like fungi infecting ants in the leaf litter of tropical forest in Thailand. *Mycological Research*, 100, 613-619.

Hywel-Jones, N. L. (2002). Whole ascospores and part-spores in the megagenus *Cordyceps*. *Mycological Research*, 106, 2-3.

Hywel-Jones, N. L. & Sivichai, S. (1995). *Cordyceps cylindrica* and its association with *Nomuraea atypicola* in Thailand. *Mycological Research*, 99, 809-812.

Jing, Y., Cui, X., Chen, Z., Huang, L., Song, L., Liu, T., et al., (2014). Elucidation and biological activities of a new polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydr. Polym*. 102, 288-296.

Johansson L, Tuomainen P, Anttila H, Rita H, Virkki, L (2007). Effect of processing on the extractability of oat beta-glucans. *Food Chemistry* 105: 1439–1445.

Jone, K. (1993). A brief pharmacologic review of *Cordyceps sinensis* and *C. ophiolglossoides*. Armana Research.

Kiho, T., Tabata, H., Ukai, S., Hara, C., (1986). A minor, protein-containing galactomannan from a sodium carbonate extract of *Cordyceps sinensis*. *Carbohydr. Res.* 156, 189-197.

Kittakoop, P., Punyaa, J., Kongsaeree, P., Lertwerawat, Y., Jintasirikul, A., Tanticharoen, M., & Thebtaranonth, Y. (1999). "Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps irangiensis.*" *Phytochemistry*. 52 (3): 453–457.

LeClerg, E.L., Leonard, W.H. & Clark, A.G. (1966). *Field plot technique*. 2nd ed. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing, 373 pp.

Li, D., (2011). Liquid fermentation of *Cordyceps gunnii* and extraction of polysaccharides and its anti-tumor activity. Jinlin University.

Liang, C., Shang, H., (2010). Extraction and antioxidant performance of polysaccharide from culture medium of *Cordyceps militaris*. *Food Res. Dev.* 31, 26-29.

Manzi, P, Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. (2001) Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. Food Chemistry, 73 (3): 321–325.

McCleary B.V., Holmes, M.G. (1985) Enzymic quantification of (1-3), (1-4) beta-glucan in barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing* 91:285–295.

Miyazaki, T., Oikawa, N., Yamada, H., (1977). Studies on fungal polysaccharides Galactomannan of *Cordyceps sinensis. Chem. Pharm. Bull*. 25, 3324-3328.

Mizuno, T. (1998). Immunological diet for cancer serious disease. Gendaishorin, Tokyo, 188 pp. *Mycobiology*, 33(4), 235-239.

Nakajima, Y. Sato, Y. Konishi, T. (2007) Antioxidant small phenolic ingredients in Inonotus obliquus (persoon) Pilat (Chaga). *Chem. Pharm. Bull*. 55: 1222–1226.

Nie, S. Cui, S. W. & Xie, M. (2018) Cordyceps polysaccharide, *Bioactive Polysaccharides.* India: Elsevier Inc.

Poinar, G.O. Jr. & Thomas, G.M.. (1984). *Laboratory guide to insect pathogens and parasites*. New York: Plenum Press. p. 392

Pontoppidan, M.B., Himaman, W., Hywel-Jones, N.., Boomsma, J.J. & Hughes D.P. (2009). "Graveyards on the move: The spatio-temporal distribution of dead *Ophiocordyceps*-infected ants." *PLOS ONE.* 4 (3): e4835.

Pooma, R. & Barfod, A. (2001). Vegetation type of Northern Thailand, pp.11-15. In E. Poulsen, F. Skov, S. Lakanavichian, S. Thanisawanyangkura, H. Borgtoft & O. Hoiris. *Forest in Culture- Culture in Forest. Research Centre on Forest and People in Thailand*, Danish. Institute of Agricultural Sciences, Denmark.

Prosky, L., N.G., Schweizer, T.F., De Vreis, T.F., Furda, I. (1988) Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist.* 71: 1017–1023.

Qin, X., Li, F., (2011). Optimization of the extraction of *Cordyceps militaris* polysaccharides by combined ultrasonic wave treatment and enzyme hydrolysis. *Jiangsu Agric. Sci.*5: 378-380.

Rhee SJ, Cho SY, Kim KM, Cha DS, Park HJ (2008). A comparative study of analytical methods for alkali-soluble-glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). 41(3), 545-549.

Ribeiro, B, Lopes R, Andrade. P.B., Seabra, R.M., Goncalves, R.F., Baptista, P., Quelhas, I., Valentao, P. (2008). Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chemistry.* 110,pp.47–56.

Shannon, C.E., (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*. 27, pp.379-423.

Samson, R.A., Even, H.C. & Latgé, J. P. (1988). *Atlas of Entomopathogenic fungi*. New York : Springer-Verlag. p.187

Shrestha, B. & Sung J.M. (2005). Notes on *Cordyceps* species collected from the Central Region of Nepal. *Mycobiology*, 33(4), pp.235-239.

Srivilai, P., Surapron, S. & Louchanwoot, P. (2013). First report of *Cordyceps* sp. isolated from cicada in Northeastern Thailand and their characterizations. *Journal of Biological Sciences*, 13 (7), 587-595. Doi: 10.3923/jbs.2013.587.595

Steinhaus, E.A. (1967). *Principles of insect pathology*. New York: Hafner Publishing, 756 pp. (Facsimile of the Edition of 1949).

Sun, S.Q., Wang, Y.J., Zhu, C.J., Xu, W., Liu, X.X., (2012). Extraction conditions of polysaccha ride from cultured *Cordyceps militaris* by ultrasonic assisted aqueous two phase system. *J. Anhui Agric. Sci.* 33, p.130.

Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B. & Spatafora, J.W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*. 57,pp. 5-59.

Tanada, Y. & Kaya, H.K. (1993). *Insect pathology*. San Diego: Academic Press, 666 pp.

TCM Wiki. (2014). Dong-chong-xia-cao. Retrieved July 27, 2014. from http://www.tcmwiki.com/wiki/dong-chong-xia-cao

Thefreedictionary. 2014. *Stroma.* Retrieved July 28, 2014. From http://www.thefreedictionary.com/stroma

Wang, L., Wang, G., Zhang, J., Zhang, G., Jia, L., Liu, X., et al., (2011). Extraction optimization and antioxidant activity of intracellular selenium polysaccharide by *Cordyceps sinensis* SU-02. *Carbohydr. Polym*. 86, pp.1745-1750.

Weng, L., Wen, L., Yang, F., Wang, J.-J., (2008). Empirical study of different extraction methods influence on the antioxidation of polysaccharide in *Cordyceps militaris*. *Food Sci. Technol.* 11 (076).

Whang, K. (1998) Contents of glucan in various cereals and its functional properties. *Journal of Food Science and Nutrition,* 3(4), pp.382–386.

wikipedia. (2014). Cordycepin.Retrieved July 27, 2014. From http://en.wikipedia.org/wiki/Cordycepin.

wikipedia. (2014). Spatial distribution. Retrieved July 27, 2014. From http://en.wikipedia.org/wiki/spatal distribution.

Wiener, N. (1948). Cybernatics: or control and communication in the animal and the machine. Cambridge, MA: Herman et Cie, Paris and MIT Press, pp.194

Winkler, D. (2008). Yartsa Gunbu (*Cordyceps sinensis*) and the fungal commodification of Tibet's rural economy1. *Economic Botany*, 62(3), pp.291–305.

Wu, Y., Hu, N., Pan, Y., Zhou, L., Zhou, X., (2007). Isolation and characterization of a mannoglu- can from edible *Cordyceps sinensis* mycelium. *Carbohydr. Res.* 342, pp.870-875.

Wu, Y.L., Sun, C.R., Pan, Y.J., (2006). Studies on isolation and structural features of a polysac- charide from the mycelium of an Chinese edible fungus (*Cordyceps sinensis*). *Carbohydr. Polym*. 63, pp.251-256.

Xiang, F., Lin, L., Hu, M., Qi, X., 2016. Therapeutic efficacy of a polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis* on hypertensive rats. *Int. J. Biol. Macromol.* 82, pp.308-314.

Yang, R., Chen, W., Wu, X., Liu, X., (2007). Extraction technology optimization for extra-cellular polysaccharide (EPS) of *Cordyceps brasiliensis*. *Food Sci*. 28, pp.91-96.

Yi-Hong, Z., (2009). Comparative study on polysaccharide extraction from northern Cordyceps by Microwave Method and Traditional Technology. *Inn. Mong. Agric. Sci. Technol.* 3, 043.

Yu, R., Song, L., Zhao, Y., Bin, W., Wang, L., Zhang, H., et al., (2004). Isolation and biological prop- erties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia* 75, pp.465-472.

Yu, X., Luo, C., Liao, J., (2002). Optimation of the extraction process of Cordyceps polysaccha ride. *Zhong Cao Yao* 33, pp.1086-1087.

Zhang, J., Sun, Y., (2013). Ultrasonic extraction and anti-oxidation of polysaccharide from mycelium of *Cordyceps militaris*. *Food Sci. Technol*. 38, 203-207.

Zhao, F., (2008). Effect of pretreatment on extraction of cordycepic polysaccharides by water extraction and alcohol precipitation. *Sci. Technol. Food Ind.* 1, pp.140-142.

Zhu, B.C., Chai, Y.Q., Zhang, S.S., Peng, X.X., Jin, Y.W. & Chen, G.J. (2016). Effects of active components from *Ophiocordyceps myrmecophilaa* on anticonvulsions. *Mycosystema*, 35(5), pp0.619-627.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

corn meal agar

ข้าวโพดอบ	30	กรัม
agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ห่อข้าวโพดที่นำไปบดจนละเอียดด้วยผ้าขาวบาง ต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ประมาณ 30 นาที กรองเอากากออก เติมวุ้น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Czapek's agar

$NaNO_3$	3	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4$ $7H_2O$	0.01	กรัม
Sucrose	30	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ยกเว้น K_2HPO_4ให้เติมหลังจากส่วนผสมอื่น ๆ ละลายจนหมดแล้ว เติมน้ำตาลและวุ้น ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นต้มจนวุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

malt extract agar (MEA)

malt extract	20	กรัม
agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

oat meal agar (OA)

ข้าวโอ๊ตอบ	20	กรัม
salt solution	1	มิลลิลิตร
agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.2	

salt solution 100 มิลลิลิตร :	$FeSO_4$ $7H_2O$	0.1 กรัม
	$MnCl_2$ $4H_2O$	0.1 กรัม
	$ZnSO_4$ $4H_2O$	0.1 กรัม

ต้มข้าวโอ๊ตอบในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15-20 นาที คนตลอดเวลา จากนั้นกรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง เติมวุ้น และ salt solution แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

potata dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
dextorse	20	กรัม
agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	5.6	

ล้างหัวมันฝรั่งให้สะอาด ปอกเปลือก แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 x 1 x 1 เซนติเมตร ชั่งให้ได้ 200 กรัม แล้วนำมาต้มกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นาน 15-20 นาที กรองเอาส่วนที่เป็นกากออก เติมน้ำตาลและวุ้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปต้มจนวุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

น้ำยาทดสอบและวิธีการเตรียม

น้ำยาทดสอบการติดสีของ ascospores

Melzer's iodine reagent

chloral hydrate	100	กรัม
potassium iodine	5	กรัม
iodine	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ข

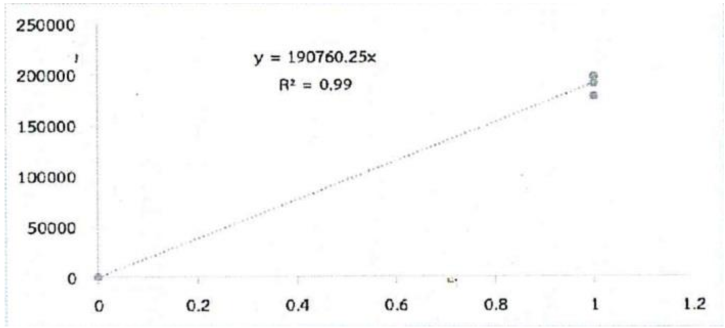
การคำนวณค่า adenosine และ cordycepin content

การคำนวณค่า adenosine content

20/4/2017

adenosine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	11.506	180,725
1	10	11.873	177,647
1	10	11.762	197,519
1	10	11.729	187,150



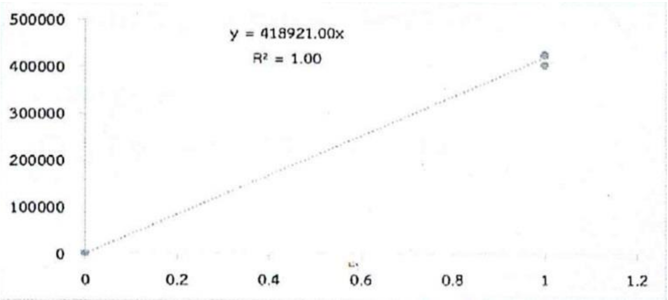
	µl	RT	Area	Dilute	Calculate(ug/ml)	Weight (g)	conc . (ug/g)	Average (ug/kg)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	11.914	3068895	10	160.88	1	1608.77	1587.69	158.77
	10	11.972	2988454	10	156.66	1	1566.60		
O. myrmecophila	10	11.299	1075728	10	56.39	0.5	1127.83	1130.47	113.05
	10	11.946	1080767	10	56.66	0.5	1133.12		
O. nutans	10	11.589	4333153	10	227.15	1	2271.52	2300.01	230.00
	10	11.814	4441860	10	232.85	1	2238.50		
O. sphecocephala	10	11.491	1263963	10	66.26	0.5	1325.18	1756.00	175.60
	10	12.084	2085793	10	109.34	0.5	2186.82		

การคำนวณค่า cordycepin content

20/4/2017

cordycepin

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	8.691	433,628
1	10	9.160	402,290
1	10	9.172	434,618
1	10	8.853	425,148



	µl	RT	Area	Dilute	Calculate(ug/ml)	Weight (g)	conc . (ug/g)	Average (ug/kg)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	8.712	86875	10	2.07	1	20.74	19.45	1.94
	10	8.759	76083	10	1.82	1	18.16		
O. myrmecophila	10	0.000	0	10	0.00	0.5	0.00	0.00	0.00
	10	0.000	0	10	0.00	0.5	0.00		
O. nutans	10	9.033	116027	10	2.77	1	27.70	33.96	3.40
	10	8.728	168522	10	4.02	1	40.23		
O. sphecocephala	10	9.301	111416	10	2.66	0.5	53.19	137.93	13.79
	10	8.711	466397	10	11.13	0.5	222.67		

ภาคผนวก ค

การคำนวณค่ากรอะมิโน

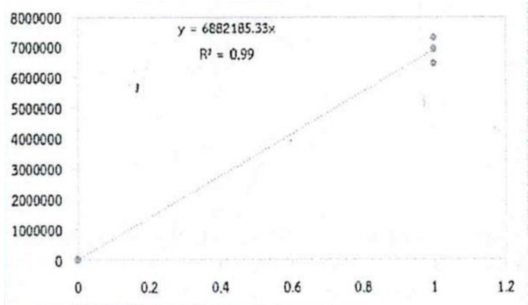
การคำนวณค่ากรอะมิโน

การคำนวณค่า Phenylalanine

20/4/2017

Phenylalanine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	20.987	7,285,275
1	10	21.547	6,440,608
1	10	20.187	6,920,671



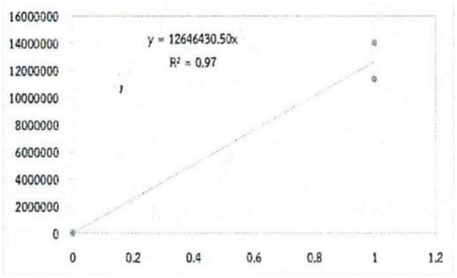
	µl	RT	Area	Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	conc . (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	21.080	8636879	10	12.55	6.27	20	0.5	12.55	501.98	250.99	0.502	0.25
	10	0.000	0	100	0.00		20	0.5	0.00	0.00		0.000	
O. myrmecophila	10	21.533	5644936	10	8.20	4.10	20	1	8.20	164.04	82.02	0.164	0.08
	10	0.000	0	100	0.00		20	1	0.00	0.00		0.000	
O. nutans	10	21.133	16908741	10	24.57	12.28	20	0.5	24.57	982.75	491.38	0.983	0.49
	10	0.000	0	100	0.00		20	0.5	0.00	0.00		0.000	

การคำนวณค่า isoleusine

12/5/2015

isoleusine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	22.453	13,988,915
1	10	22.613	11,303,946



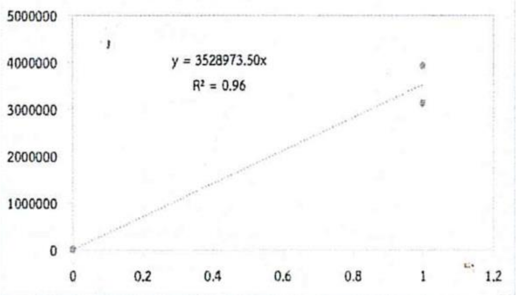
	µl	RT	Area Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	. conc (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	0.000	0	10	0.00	7.34	20	0.5	0.00	0.00	0.000	0.29
	10	22.440	1856858	100	14.68		20	0.5	14.68	587.31	0.587	
O. myrmecophila	10	0.000	0	10	0.00	0.00	20	1	0.00	0.00	0.000	0.00
	10	0.000	0	100	0.00		20	1	0.00	0.00	0.000	
O. nutans	10	0.000	0	10	0.00	0.00	20	0.5	0.00	0.00	0.000	0.00
	10	0.000	0	100	0.00		20	0.5	0.00	0.00	0.000	

การคำนวณค่า methionine

20/4/2017

methionine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	23.187	3,130,695
1	10	22.467	3,927,252



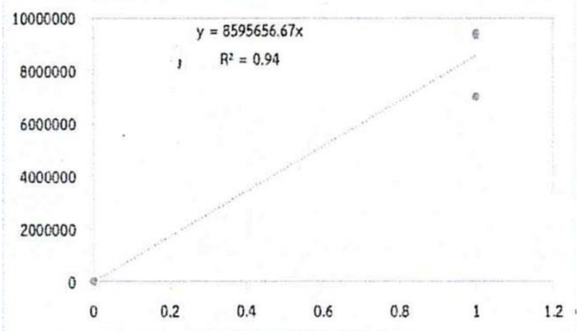
	µl	RT	Area	Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	conc . (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	0.000	0	10	0.00	0.00	20	0.5	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00
	10	0.000	0	100	0.00		20	0.5	0.00	0.00		0.000	
O. myrmecophila	10	0.000	0	10	0.00	251.62	20	1	0.00	0.00	5032.35	0.000	5.03
	10	23.000	17759042	100	503.24		20	1	503.24	10064.71		10.065	
O. nutans	10	0.000	0	10	0.00	184.34	20	0.5	0.00	0.00	7373.79	0.000	7.37
	10	23.027	13010961	100	368.69		20	0.5	368.69	14747.59		14.748	

การคำนวณค่า tyrosine

20/4/2017

tyrosine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	24.6	7,026,594
1	10	23.987	9,348,938
1	10	23.107	9,411,438



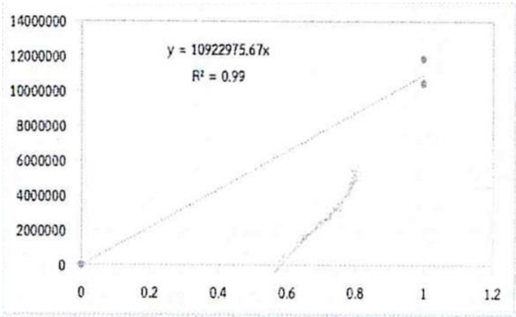
	µl	RT	Area	Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	conc . (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	23.707	3559168	10	4.14	99.10	20	0.5	4.14	165.63	3963.93	0.166	3.96
	10	23.707	16680355	100	194.06		20	0.5	194.06	7762.22		7.762	
O. myrmecophila	10	0.000	0	10	0.00	0.00	20	1	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00
	10	0.000	0	100	0.00		20	1	0.00	0.00		0.000	
O. nutans	10	0.000	0	10	0.00	75.68	20	0.5	0.00	0.00	3027.33	0.000	3.03
	10	23.027	13010961	100	151.37		20	0.5	151.37	6054.67		6.055	

การคำนวณค่า alanine

20/4/2017

alanine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	24.333	11,858,637
1	10	24.933	10,443,507
1	10	23.507	10,466,783



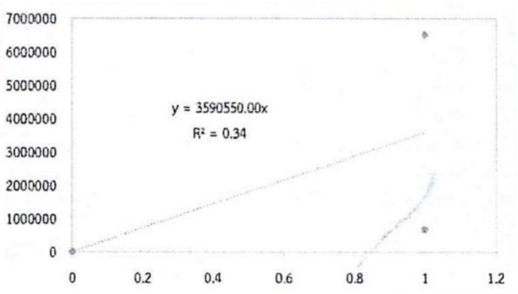
	µl	RT	Area	Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	conc . (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	0.000	0	10	0.00	0.00	20	0.5	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00
	10	0.000	0	100	0.00		20	0.5	0.00	0.00		0.000	
O. myrmecophila	10	0.000	0	10	0.00	37.18	20	1	0.00	0.00	743.63	0.000	0.74
	10	24.933	8122639	100	74.36		20	1	74.36	1487.26		1.487	
O. nutans	10	0.000	0	10	0.00	58.59	20	0.5	0.00	0.00	2343.78	0.000	2.34
	10	24.933	12800517	100	117.19		20	0.5	117.19	4687.56		4.688	

การคำนวณค่า arginine

20/4/2017

arginine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	35.147	674,771
1	10	33.333	6,506,329



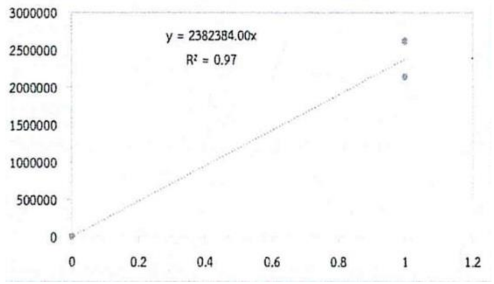
	µl	RT	Area	Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	conc . (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	35.627	336470	10	0.94	0.47	20	0.5	0.94	37.48	18.74	0.037	0.02
	10	0.000	0	100	0.00		20	0.5	0.00	0.00		0.000	
O. myrmecophila	10	0.000	0	10	0.00	0.00	20	1	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00
	10	0.000	0	100	0.00		20	1	0.00	0.00		0.000	
O. nutans	10	0.000	0	10	0.00	0.00	20	0.5	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00
	10	0.000	0	100	0.00		20	0.5	0.00	0.00		0.000	

การคำนวณค่า glycine

20/4/2017

glycine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	28.827	2,142,826
1	10	28	2,621,942



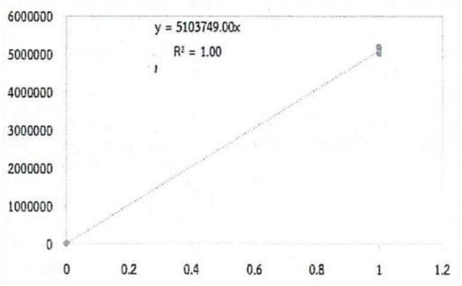
	µl	RT	Area	Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	conc . (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	0.000	0	10	0.00	0.00	20	0.5	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00
	10	0.000	0	100	0.00		20	0.5	0.00	0.00		0.000	
O. myrmecophila	10	27.987	25374508	10	106.51	84.65	20	1	106.51	2130.18	1692.97	2.130	1.69
	10	27.973	1495864	100	62.79		20	1	62.79	1255.77		1.256	
O. nutans	10	28.013	22650499	10	95.07	74.00	20	0.5	95.07	3803.00	2959.85	3.803	2.96
	10	28.027	1260696	100	52.92		20	0.5	52.92	2116.70		2.117	

การคำนวณค่า serine

20/4/2017

serine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	31.587	5,170,094
1	10	30.587	5,037,404



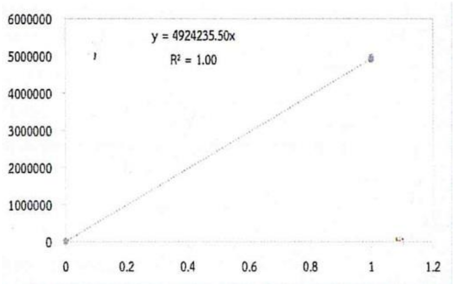
	µl	RT	Area	Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	conc . (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	21.507	5970283	10	11.70	5.85	20	0.5	11.70	467.91	233.96	0.468	0.23
	10	0.000	0	100	0.00		20	0.5	0.00	0.00		0.000	
O. myrmecophila	10	21.407	7177661	10	14.06	21.04	20	1	14.06	281.27	420.73	0.281	0.42
	10	21.507	1429544	100	28.01		20	1	28.01	560.19		0.560	
O. nutans	10	21.013	13783400	10	27.01	27.72	20	0.5	27.01	1080.26	1108.93	1.080	1.11
	10	21.520	1451512	100	28.44		20	0.5	28.44	1137.60		1.138	

การคำนวณค่า leucine

20/4/2017

Leucine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	32.093	4,909,527
1	10	31.16	4,938,944



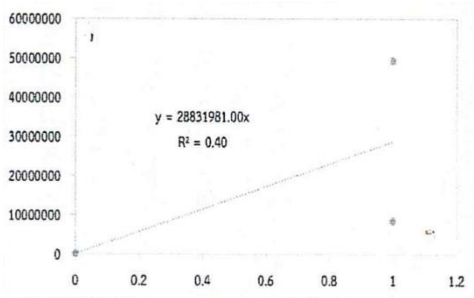
	µl	RT	Area	Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	conc . (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	0.000	0	10	0.00	14.26	20	0.5	0.00	0.00	570.46	0.000	0.57
	10	31.080	1404531	100	28.52		20	0.5	28.52	1140.91		1.141	
O.myrmecophila	10	32.333	20508928	10	41.65	31.34	20	1	41.65	832.98	626.85	0.833	0.63
	10	33.333	1035880	100	21.04		20	1	21.04	420.73		0.421	
O. nutans	10	32.347	23618186	10	47.96	34.73	20	0.5	47.96	1918.53	1389.06	1.919	1.39
	10	32.347	1058201	100	21.49		20	0.5	21.49	859.59		0.860	

การคำนวณค่า proline

20/4/2017

serine

STD (ug/ml)	µl	RT	Area
0	0	0	0
1	10	33.373	49,221,595
1	10	32.507	8,442,367
1	10	32.507	8,662,559



	µl	RT	Area	Dilute	Calculate (ug/ml)	Average (ug/kg)	Final conc. (ml)	Weight (g)	conc . (ug/ml)	conc . (ug/g)	Average (ug/g)	conc . (mg/g)	Average (mg/100g)
O. irangiensis	10	32.333	15818412	10	5.49	4.59	20	0.5	5.49	219.46	183.57	0.219	0.18
	10	32.573	1064552	100	3.69		20	0.5	3.69	147.69		0.148	
O. myrmecophila	10	32.880	26549382	10	9.21	8.20	20	1	9.21	184.17	163.92	0.184	0.16
	10	32.867	2071056	100	7.18		20	1	7.18	143.66		0.144	
O. nutans	10	32.880	25917957	10	8.99	7.37	20	0.5	8.99	359.57	294.73	0.360	0.29
	10	32.347	1657026	100	5.75		20	0.5	5.75	229.89		0.230	

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นายรุ่งเกียรติ แก้วเพชร

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2542 ระดับปริญญาตรี วท.บ. (โรคพืชวิทยา)
พ.ศ. 2547 ระดับปริญญาโท วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ด้วยทุนสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ เทคโนโลยีของเอนไซม์ (Enzyme Technology) การใช้จุลินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร (Microbial Control of Agricultural Pests) และการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อรา (Fungi Control of Insect Pests)

ประสบการณ์การทำงาน

- รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต พ.ศ. 2548 - 2551
- เลขานุการคณะกรรมการพัฒนางานวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต พ.ศ.2548 - 2551

ผลงานตีพิมพ์และงานวิจัยที่สำคัญ

Kawpet, R. and S. Saengyot. 2017. Study on Culturing Methods to Increase the Quantities of *Ophiocordyceps* Found in the Area of Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province, Thailand, p. 61-65. In Proceeding of International Science Congress Thailand 2017. International Multidisciplinary Research Foundation, Asian Institute of Technology (AIT), Pathum Thani, Thailand.

Kawpet, R. and S. Saengyot. 2018. Effect of Artificial and Local Mass Production Media on Growth of Endogenous Strains of *Beauveria Bassiana* towards Sustainable Insect Control. Life Sciences International Research Journal. 5 (1): 57-62.

Kawpet, R., M. De Bels and S. Saengyot. 2018. Biodiversity and Investigating Pathogenic Levels of Endogenous Strains of *Pandora neaoaphidis* Collected from Cruciferous Crops in Northern Thailand. International Journal of Agricultural Technology. 14 (3): 313-324.

Utilization of *Beauveria bassiana* for biological control of Thrips Pests of Solanaceous Crops in Organic Farming Way (หัวหน้าโครงการ, พ.ศ.2561; วช.)

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
228-228/1-3 ถนนสิรินธร บางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์/โทรสาร: 0 2423 9403
Email: rungkiat99@yahoo.com

ชื่อ นางสาวศมาพร แสงยศ

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2542 - ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (โรคพืชวิทยา) มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2546 - ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กีฏวิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2554 - ปริญญาดุษฎีบัณฑิต (กีฏวิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(ทุนโครงการ Biodiversity Research and Technology Program (BRT Program) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ กีฏวิทยาทางการเกษตร (Agricultural Entomology) การควบคุมแมลงศัตรูพืชและวัชพืชโดยชีววิธี (Biological Control of Insect Pests and Weeds) และความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Biosafety of Genetically Modified crops)

ประสบการณ์การทำงาน

- นักวิจัย ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (พ.ศ. 2543-2555)
- รองคณบดีฝ่ายวิชาการและมาตรฐานการศึกษา คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (พ.ศ. 2557 – 2559)

ผลงานตีพิมพ์และงานวิจัยที่สำคัญ

Saengyot, S. and B. Napompeth. 2008. Simple technique for mass propagation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) for microbial control in Thailand. Journal of ISSAAS. 13 (Supplement): 96-102.

Saengyot S. and I. Burikam. 2011. Host plants and natural enemies of papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Thailand. Thai Journal of Agricultural Science 44(3): 197-205.

Saengyot, S. and I. Burikam. 2012. Development and growth ratio of predaceous coccinellid, *Sasajiscymnus quinquepunctatus* (Weise) on papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* Williams & Granara de Willink. Kasetsart Journal (Natural Science) 46(3): 418-426.

Species Diversity and Utilization of Predatory Thrips for Biological Control of Insect Pests. (หัวหน้าโครงการ, พ.ศ. 2556; สวทช.)

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

สถานที่ทำงาน หลักสูตรอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตู้ ปณ. 49 แม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์/โทรสาร: 0 5387 5840
Email: samaporn@mju.ac.th