

ศึกษาโครโมโซมและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยศัตรูพืช
วงศ์ Succineidae ในประเทศไทย

Chromosomal Studies and the Geographical Distribution
of Pest Snails Family Succineidae In Thailand

ดาราพร รินทะรักษ์ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข ญัฐจิญา กาญจนนิธิพัฒน์
ปราสาททอง พรหมเกิด ทรงทัฬห แก้วตา
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ได้ดำเนินการสำรวจพื้นที่เกษตรที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจจังหวัดตาก นครปฐม กาญจนบุรี และราชบุรี ได้ตัวอย่างหอยศัตรูพืชวงศ์ Succineidae จำนวน 140 ตัวอย่าง พื้นที่ภาคเหนือได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงรายและเพชรบูรณ์ จำนวน 150 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิและนครราชสีมา จำนวน 85 ตัวอย่าง และภาคตะวันออก ได้แก่จันทบุรีและตาก จำนวน 17 ตัวอย่าง ดำเนินการศึกษาโครโมโซมจากตัวอย่างหอยทากบวงศ์ Succineidae จากบางพื้นที่ ๆ มีลักษณะของสัณฐานวิทยาของเปลือกที่แตกต่างกันชัดเจน ได้แก่ นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี จันทบุรีและตาก พบว่าจำนวนโครโมโซมมีค่าแฮพลอยด์ (haploid, n) เท่ากับ 19-24 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้ ว่าค่าแฮพลอยด์ของหอยทากบวงศ์นี้เท่ากับ 5-25

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-06-60



คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีลักษณะทางภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่อุดมสมบูรณ์ จึงเป็นแหล่งผลิตพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด อาทิเช่น กล้วยไม้ตัดดอก และพรรณไม้น้ำ เป็นต้น มีการผลิตและส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกเป็นอันดับ 1 ของโลก มูลค่าการส่งออกในปัจจุบันไม่ต่ำกว่า 3,000 ล้านบาท นอกจากนี้ ธุรกิจการเพาะขยายพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้น โดยสถิติการส่งออกพรรณไม้น้ำของไทย ในปี 2546 มีการส่งออกคิดเป็นมูลค่า 16.22 ล้านบาท ปี 2547 คิดเป็นมูลค่า 17.2 ล้านบาท

ปัญหาที่พบในแหล่งผลิตพืชเศรษฐกิจ ดังกล่าว นอกจากการทำลายของแมลงและโรคแล้ว ยังพบหอยทากศัตรูพืชหลายชนิด หอยทากที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูพืชในประเทศไทย ได้แก่ หอยทากยักษ์อัฟริกัน, *Achatina fulica*, หอยตักดาน, *Cryptozonia siamensis*, หอยทากสาธิตา, *Sarika* spp., หอยเจดีย์ใหญ่, *Prosopaea walkeri*, หอยเจดีย์เล็ก, *Lamellaxis gracilis*, หอยอำพันหรือหอยเล็บ, *Succinea* spp. และหอยเลขหนึ่ง, *Ovachlamys fulgens* เป็นต้น ซึ่งในจำนวนนี้มีหลายชนิดที่จัดเป็นศัตรูในสวนกล้วยไม้และก่อให้เกิดปัญหาการส่งออก โดยมีการตรวจพบตัวอย่างหอยที่มีชีวิต ณด่านตรวจพืชเพื่อการส่งออก ได้แก่ หอยอำพันและหอยเลขหนึ่ง นอกจากนี้ในแหล่งเพาะพรรณไม้น้ำยังพบหอยศัตรูพืชหลายชนิด เช่น หอยลิมนีย์, *Lymnaea* spp., หอยเชอร์รี่, *Pomacea* spp. และหอย *Indoplanorbis* spp. เป็นต้น ในปี 2553 มีรายงานการพบหอย *Bradybeana* spp. และหอยซัคซีเนียระบาดในแหล่งเพาะพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก ในเขตจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งหอยทากชนิดดังกล่าว เคยพบในสวนผลไม้และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด ทางภาคเหนือของประเทศไทย

หอยอำพัน หอยเล็บหรือหอยซัคซีเนีย, *Succinea* spp. เป็นหอยทากบกที่จัดอยู่ในวงศ์ Succineidae ในประเทศไทยมีรายงานเพียง 1 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Succinea cochinchinensis* และ *Succinea tenella* (Hemmen and Hemmen, 2002) และ (Panha, 1996) หอยซัคซีเนียมักพบอาศัยอยู่บริเวณที่มีความชื้นสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่าพบระบาดในสวนกล้วยไม้ หอยชนิดนี้มักอาศัยอยู่บริเวณพื้นดิน วัสดุปลูก และอาจไต่ขึ้นต้นและดอกกล้วยไม้ เข้าทำลายกล้วยไม้โดยการกัดกินส่วนของต้นอ่อนและดอกกล้วยไม้ ทำให้ต้นและดอกกล้วยไม้ไม่ได้คุณภาพ ปัจจุบันพบว่าหอยซัคซีเนียกลายเป็นศัตรูพืชที่ทำความเสียหายและเป็นปัญหาต่อการส่งออกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยหลายชนิด จากการเฝ้าระวังของผู้วิจัย เริ่มพบการระบาดของหอยซัคซีเนียตามแหล่งปลูกพืชผักหลายชนิด เช่น กระน้ำและผักกาดหอม เป็นต้น โดยหอยทากชนิดดังกล่าวที่พบระบาดในพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศไทย สามารถระบุได้เพียงระดับสกุล ว่าเป็นหอยสกุล *Succinea* แต่ยังไม่สามารถระบุ species ที่แน่นอนได้ เนื่องจากหอยทากในวงศ์นี้มีความผันแปรของลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกค่อนข้างมาก ทำให้การจำแนกชนิดไม่สามารถใช้ลักษณะของเปลือกเพียงอย่างเดียว และจากการสังเกต ติดตามการระบาดทั้งในประเทศไทยและจากรายงานของประเทศเพื่อนบ้านในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สันนิษฐานว่าหอยทากวงศ์ Succineidae ที่พบระบาดในพื้นที่เศรษฐกิจของประเทศไทย มีความเป็นไปได้ว่าเป็นชนิด introduced species และอาจมีมากกว่า 2 ชนิด ซึ่งแต่เดิมในการจำแนกชนิดจะใช้ข้อมูลเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของเปลือกในการจำแนกเป็นหลัก เช่น รูปทรงเปลือก ทิศของการขดวน ขนาดเปลือก สีสัน และลวดลายของเปลือก แต่บ่อยครั้งทำให้เกิดปัญหาในการจำแนก เนื่องจากเปลือกของหอยทากแต่ละชนิดมีความผันแปรมาก ทำให้การจำแนกชนิดโดยใช้สัณฐานวิทยาของเปลือกเพียงอย่างเดียว มีความสับสนและขาดความชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหอย

หากที่มีรูปทรงและขนาดของเปลือกใกล้เคียงกัน เช่น หอยขัดเปลือก, *Macrochlamys limbata* และ *M. hepbagyra* ที่มีความคล้ายคลึงกันมากในทางสัณฐานวิทยา แต่เมื่อมีการศึกษาข้อมูลทางด้านโครโมโซมประกอบกัน พบว่าหอยทากทั้ง 2 ชนิด มีจำนวนแฮพลอยด์ (haploid) เท่ากันคือ 10 โดยเมื่อนำมาจัดคาริโอไทป์จะเห็นความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และสามารถจำแนกได้ว่าเป็นคนละชนิด เป็นต้น

ดังนั้นในการศึกษาค้างนี้ จึงมุ่งเน้นศึกษาอนุกรมวิธานในระดับโครโมโซม เพื่อสนับสนุนข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาของเปลือก และเขตการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยวงศ์ Succineidae ที่พบในประเทศไทย ซึ่งจากการศึกษาและค้นคว้างานทางด้านโครโมโซม พบว่าหอยทากแต่ละวงศ์จะมีจำนวนโครโมโซมคงที่และมีลักษณะเป็นแบบเชิงอนุรักษ์ (conservatism) กล่าวคือหอยที่อยู่ในวงศ์เดียวกันจะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน ซึ่งหากจะจำแนกให้ได้ถึงระดับชนิด (species) จะต้องมี การศึกษารูปแบบของการจัดเรียงโครโมโซมหรือคาริโอไทป์ และข้อมูลด้านอื่น ๆ สนับสนุนกัน เพื่อให้ฐานข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานของหอยศัตรูพืช มีความชัดเจนและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยอาศัยหลักทางอนุกรมวิธานที่ว่า “คาริโอไทป์ (karyotype) ของสิ่งมีชีวิตเดียวกันจะเหมือนกันและจะแตกต่างกันกับคาริโอไทป์ของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน” (Nakamura, 1985)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ /กระดาษเอนกประสงค์ /ไฟฉายและแบตเตอรี่
- สวิงสำหรับเก็บตัวอย่างหอย และอาหารชนิดเม็ด และผักสด สำหรับเลี้ยงหอย
- เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และเครื่องวัดอุณหภูมิและค่า pH ของดิน
- อุปกรณ์ศึกษากายวิภาคและโครโมโซม ได้แก่ ขวดแก้วสำหรับใส่น้ำยาเคมี สไลด์แก้ว และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องไม้สำหรับเก็บสไลด์ ชุด Jar สำหรับย้อมสี 1 ชุด
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโครโมโซม ได้แก่ 0.01 % Colchicin, Giemsa Solution และ Carnoy Fixative Solution stock Giemsa's Solution
- ภาพถ่ายโครโมโซมขนาด 4”x 6 สำหรับศึกษาคาร์ิโอไทป์
- เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น เวอร์เนียร์ thermo-hygrometer

วิธีการ

วิธีดำเนินการวิจัย แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. สำรวจ/ เก็บตัวอย่าง และจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์
โดยสำรวจทุก ๆ 2 เดือน ตามพื้นที่ป่า เขาหินปูน และพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ดังนี้
- ภาคเหนือ : พื้นที่จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน น่าน และลำปาง
 - ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : พื้นที่จังหวัดหนองคาย เลย ชัยภูมิ ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี
 - ภาคกลาง : พื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี ชัยนาถ ปทุมธานี และนครนายก
 - ภาคตะวันตก : พื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และราชบุรี
 - ภาคตะวันออก : พื้นที่จังหวัดจันทบุรี ชลบุรี ตราด ระยอง และสระแก้ว
 - ภาคใต้ : พื้นที่จังหวัดชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี

เก็บตัวอย่างพื้นที่ละ 30 ตัว และบันทึกพิกัดด้วย GPS เพื่อจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยทากวงศ์ Succineidae ด้วยโปรแกรม ArcView หรือ ArcGIS จากนั้นนำตัวอย่างมาพักในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร และอ่างซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร เพื่อรอจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร โดยฉีดพ่นน้ำ วันละ 1 ครั้งและให้ผักชนิดต่าง ๆ เป็นอาหาร สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2. ตรวจสอบและวิเคราะห์ชนิด

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก โดยการถ่ายภาพ วัดภาพและวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width ด้วยเวอร์เนียร์นำไปวิเคราะห์ชื่อตามระบบอนุกรมวิธาน เปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากทั้งในและต่างประเทศ ยึดตามเอกสารของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2002) , Laws (1973), Panha (1996), Patterson (1971) และ Vaught (1989)

จากนั้นนำข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยทากที่วิเคราะห์แล้ว มาเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันไปศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจัดเรียงคาริโอไทป์ต่อไป

3. ขั้นตอนการศึกษาคาริโอไทป์ โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อ ovotestis ดังนี้

3.1 Pre-treatment โดยการฉีด 0.01 - 0.02 % colchicines จำนวน 1 - 2 มิลลิลิตร เข้าไปในลำตัวหอยทาก เป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง เพื่อยับยั้งการทำงานของ spindle fiber ในโครโมโซม

3.2 Hypotonic treatment โดยการนำเนื้อเยื่อ ovotestis ของหอยทากมาแช่ใน hypotonic solution (สารละลาย KCl) ประมาณ 30 - 45 นาที เพื่อให้เซลล์บวม (swelling)

3.3 Fixation โดยการนำเซลล์ไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้หลอดดูดส่วนที่เป็น supernatant ออกให้หมด แล้วเติมสาร fixative (Carnoy solution) 3 - 4 ครั้ง

3.4 Air dried slide ดูดตัวอย่างเซลล์ที่ผ่านขั้นตอน fixation ลงบนสไลด์ จากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.5 Staining ย้อมสไลด์ที่แห้งแล้วด้วย 20% Giemsa ที่มีส่วนผสมของ stock Giemsa's Solution เป็นเวลา 30 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นและทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง รอนำไปศึกษาต่อไป

3.6 Analyzation นำสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 100 X ยี่ห้อ Olympus Model Bx 40F เลนส์แบบ pancromatic วิเคราะห์โครโมโซมโดยเลือกจากระยะเมทาเฟส (metaphase) ซึ่งมีการกระจายดี ไม่ซ้อนทับกัน นับจำนวนโครโมโซม จับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) มาจัดเรียงคาริโอไทป์ตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้ จากนั้นใช้ภาพถ่ายมาวิเคราะห์และคำนวณหาค่า relative length (RL) และค่า centromeric index (CI) เพื่อจัดชนิดโครโมโซม ต่อไป

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561 รวม 2 ปี

สถานที่ : พื้นที่ป่าบริเวณเขาหินปูน พื้นที่เกษตรกรรม เช่น สวนกล้วยไม้ แปลงผัก

สวนไม้ดอก ไม้ผล ภาคต่างๆของประเทศไทย

: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกัญและสัตววิทยา สอพ.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ได้ดำเนินการสำรวจพื้นที่เกษตรที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจจังหวัดตาก นครปฐม กาญจนบุรี และราชบุรี ได้ตัวอย่างหอยศัตรูพืชวงศ์ Succineidae จำนวน 140 ตัวอย่าง พื้นที่ภาคเหนือได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงรายและเพชรบูรณ์ จำนวน 150 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิและนครราชสีมา จำนวน 85 ตัวอย่าง และภาคตะวันออก ได้แก่จันทบุรีและตาก จำนวน 17 ตัวอย่าง อยู่ระหว่างยืนยันชนิดและนำมาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ

ดำเนินการศึกษาโครโมโซมจากตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Succineidae จากบางพื้นที่ ๆ มีลักษณะของสัณฐานวิทยาของเปลือกที่แตกต่างกันชัดเจน ได้แก่นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี จันทบุรี และตาก พบว่าจำนวนโครโมโซมมีค่าแฮพลอยด์ (haploid, n) เท่ากับ 19-24 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้ ว่าค่าแฮพลอยด์ของหอยทากบกวงศ์นี้เท่ากับ 5-25

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทราบจำนวนและรูปแบบการจัดเรียงโครโมโซม จะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ ที่ช่วยสนับสนุนงานทางด้านการจำแนกชนิดและระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้แม่นยำยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางอนุกรมวิธานหอยทากศัตรูพืช รวมไปถึงการสำรวจการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของทากบกที่จัดอยู่ในวงศ์ Succineidae ที่พบในประเทศไทย สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ เช่น การป้องกันกำจัด ซึ่งหอยดังกล่าวเป็นศัตรูสำคัญในพืชหลายชนิด รวมทั้งยังมีตัวอย่างหอยทากวงศ์ Succineidae ที่วิเคราะห์ชนิดแล้ว เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นแหล่งค้นคว้าอ้างอิง และสามารถจัดทำเป็นเอกสารถ่ายทอดแก่เกษตรกรและผู้สนใจ ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวณัฐกานต์ ธาแก้ว นักวิทยาศาสตร์ และนายพุดพิงศ์ สอนองคุณ พนักงานประจำห้องทดลอง ที่ช่วยปฏิบัติงานภาคสนามและบันทึกข้อมูลที่จำเป็นตลอดการทดลอง จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- ชมพูนุท จรรยาเพศ และปิยาณี หนูกาฬ. 2545. ชีวิตวิทยาหอยทากศัตรูพืชชนิดศัตรูกล้วยไม้. รายงานผลงานวิจัยประจำปี. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 304.
- ชมพูนุท จรรยาเพศ ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาฬ และดารารพร รินทะรักษ์. 2550. ความหลากหลายของหอยทากและทากในแหล่งสวนชีวมณฑลสะแกกราช. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 8 : อารักขาพืชใต้ร่มพระบารมี. หน้า
- ปราสาททอง พรหมเกิด ดารารพร รินทะรักษ์ ปิยาณี หนูกาฬ สมเกียรติ กล้าแข็ง และทรงทัฬ แก้วตา. 2554. ความหลากหลายและประชากรของหอยทากและทากในโรงเรือนปลูกพืช. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1822-1828.

- พงษ์รัตน์ ดำรงโรจน์วัฒนา ชัดนารี มีสุขโข และชุตานา คุณสุข. 2550. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของหอยทากบกจำนวน 14 ชนิดของประเทศไทย. *วารสารวิจัย มช.* 12:(2) หน้า 102-108.
- Abbott, R.T. 1989. *Compendium of landshell*. Melbourne, Australia : American Malacologist, Inc.
- Cowie, R. H., Jr., R. T., Dillon, D. G. Robinson and J. W. Smith. 2009. Alien non-marine snails and slugs of priority quarantine importance in the United States: A preliminary risk assessment. *Amer. Malac. Bull.* 27: 113-132.
- Dumrongrojwattana, P., R Chaijirawong, S. Matchacheep and R.G. Moolenbeek. 2007. Comparative anatomy of land snail genus *Succinea* from eastern Thailand (Pulmonata : Succineidae). *Kasetsart Journal : Natural Science*, 41: 229-238.
- Hemmen, J. and C. Hemmen, 2001. Aktualisierte liste der terrestrischen gastropoden Thailands. *Schr. Malakozool.* 18:53-70.
- Laws, H.M. 1973. The chromosome of some Australian camaenid land snails. *Cytologia.* 38:p.229-235.
- Nakamura, H.K. 1985. A review of molluscan cytogenetic information based on the CISMOCH: Computerized index system for molluscan chromosomes, Bivalvia, polyplacophora and cephalopoda. *Venus* 44(3): 199-225.
- Panha, S. 1996. A Checklist and classification of the terrestrial Pulmonate snails of Thailand. *Walkerana.* 8 (19): 11-64.
- Patterson, C. M. 1971. Taxonomic studies of the land snails family Succineidae. *Malacological Review.* Vol. 4: 131-202.
- Vaught, K.C. 1989. A classification of the living mollusca. U.S.A. : *American Malacologists.*



Figure 1 The amber snails, *Succinea* spp. are feeding on orchid leaf and stem in orchid plantation in Kanchanaburi province



Figure 2 The pest snails, genus *Succinea* from eastern region of Thailand



Figure 3 Shell morphology of pest snail, Succineidae from western region of Thailand (orchid plantation in Kanchanaburi, Nakornpathom and Ratchaburi)