

## บทคัดย่อ

การผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรหรือสปีชีส์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ลูกผสม (hybrids) ที่เกิดขึ้นอาจทำให้เกิดการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ระหว่างประชากรหรือสปีชีส์ได้หากลูกผสมสามารถอยู่รอดและสืบพันธุ์ได้ อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อยู่ในสกุลเดียวกัน มีขนาดลำตัวใกล้เคียงกันและมีการกระจายอยู่ในทุกภาคของประเทศไทย จากการสำรวจเบื้องต้นพบว่าอึ่ง 2 หรือ 3 ชนิด มีการใช้พื้นที่อยู่อาศัยร่วมกัน และที่สำคัญด้วยธรรมชาติของอึ่งที่มีการปฏิสนธิแบบภายนอกร่างกายเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างประชากรของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะในพื้นที่อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดยทำการเก็บตัวอย่างอึ่งทั้งสามชนิดและตรวจสอบการเกิด gene flow โดยเทคนิคทางด้านอนุชีววิทยา ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างพบว่ามีอึ่งน้ำเต้าเพียงสปีชีส์เดียวเท่านั้นที่สามารถเก็บตัวอย่างมาได้ จำนวนทั้งหมด 25 ตัว จากสองพื้นที่ในอำเภอเวียงสา คือ ที่ตำบลไหล่นาน (n = 9) และที่ตำบลสัน (n=16) ผลการเพิ่มปริมาณยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และการทำ DNA sequencing พบว่าอึ่งน้ำเต้าทั้ง 25 ตัวอย่างให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และผล sequencing ชัดเจนและน่าเชื่อถือ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 678 คู่เบส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Dnasp พบจำนวน haplotype ที่แตกต่างกันจำนวน 7 haplotype ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 6 (0.88%) ตำแหน่ง และมีค่าความหลากหลายของ haplotype (hd) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ ( $\pi$ ) ค่อนข้างต่ำ โดยเฉลี่ย  $hd = 0.627 \pm 0.102$  และ  $\pi = 0.00111 \pm 0.00024$  โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร อยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.003 แสดงว่าประชากรอึ่งน้ำเต้าจากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน COI ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการยังพบว่าอึ่งน้ำเต้ามีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group แต่เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการเก็บตัวอย่างอึ่งข้างดำและอึ่งลายเลอะจากพื้นที่ในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่านได้เลย ดังนั้นจึงไม่สามารถประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในพื้นที่ดังกล่าวได้

**คำสำคัญ:** การผสมข้ามสายพันธุ์, สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก, ยีน COI, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, เทคนิคพีซีอาร์

## Abstract

Hybridization is a mating between genetically different populations (or species). It results from incomplete reproductive isolation. Viable and fertile hybrids may lead to gene flow between populations or species. This can be examined using bio-molecular techniques. Ornate chorus frog (*Microhyla fissipes*), dark-sided chorus frog (*M. heymonsi*) and noisy chorus frog (*M. butleri*) are amphibians in the same genus. They are similar in body size, found all over Thailand and share their habitats. Essentially, the external fertilization of amphibians may increase the risk of hybridization. This study therefore aimed to examine genetic diversity and to detect possible natural hybridization among these amphibian species in Wiang Sa district, Nan province areas. Only twenty-five *M. fissipes* were collected from two areas of Wiang Sa district: Lainan sub-district (n=9) and San sub-district (n=16), while there was no any specimen of *M. heymonsi* and *M. butleri* was successfully collected in this study. The collected specimens were screened and compared in terms of the COI gene base sequences of the mitochondrial DNA extracted from the liver tissue. The results showed that all of twenty-five *M. fissipes* specimens had obvious and reliable COI sequences, 678 base pairs. Seven unique haplotypes based on 6 (0.88%) variable sites were detected from the 25 aligned sequences using Dnasp program. The haplotype diversity (hd) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were low. On average,  $hd = 0.627 \pm 0.102$  and  $\pi = 0.00111 \pm 0.00024$ . In addition, the genetic distance between *M. fissipes* populations ranged from 0.000 to 0.003 indicating that *M. fissipes* populations from Lainan and San sub-districts exhibited high similarity in their COI sequences. Moreover, phylogenetic analyses of the mtDNA haplotypes indicated that *M. fissipes* was monophyletic in their evolutionary relationships. The lack of *M. heymonsi* and *M. butleri* samples leads us unable to assess the possible natural hybridization among these three species in Wiang Sa district areas. Further intensive specimens collection is needed for achieve the goals.

**Keywords:** hybridization, amphibians, COI gene, genetic diversity, PCR technique