

รายงานวิจัย  
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่าง  
อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*)  
โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจสอบในพื้นที่  
อพ.สธ.

Genetic variation and genetic assessment of possible natural hybridization  
between three species of toads in the genus *Microhyla* using mtDNA analysis  
in the RSPG area

อาจารย์ ดร. อัมพร วิเวกแว่ว  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชษฐ คนชื้อ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี และ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ คุณอนุสรณ์ ปานสุข และ คุณสุทธิณี เหลลาแก้ว ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่างอิ่งและจำแนกชนิดของอิ่งในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

## บทคัดย่อ

การผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันเชิงวิวัฒนาการที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรหรือสปีชีส์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ลูกผสม (hybrids) ที่เกิดขึ้นอาจทำให้เกิดการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ระหว่างประชากรหรือสปีชีส์ได้หากลูกผสมดังกล่าวสามารถอยู่รอดและสืบพันธุ์ได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล อิ่งน้ำเต้า (*Microhylla fissipes*) อิ่งข้างดำ (*M. heymonsii*) และอิงลายเลอะ (*M. butleri*) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อยู่ในสกุลเดียวกัน มีขนาดลำตัวใกล้เคียงกันและมีการกระจายอยู่ในทุกภาคของประเทศไทย จากการสำรวจเบื้องต้นพบว่าอิง 2 หรือ 3 ชนิด มีการใช้พื้นที่อยู่อาศัยร่วมกัน และที่สำคัญด้วยธรรมชาติของอิงที่มีการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจตรวจหาและออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมและความจำเพาะต่อชนิดของอิง เพื่อจำแนกและระบุชนิดของอิงทั้งสามชนิดเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ในธรรมชาติ โดยนำตัวอย่างอิงน้ำเต้าจำนวน 17 ตัวที่เก็บมาจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อิ่งข้างดำจำนวน 20 ตัว ที่เก็บมาจากอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิและจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว และอิงลายเลอะจำนวน 10 ตัวที่เก็บมาจากอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ มาตรวจหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อเยื่อตับของอิงทั้งสามชนิด โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลการศึกษาพบว่าเฉพาะผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอิงน้ำเต้าจำนวน 12 ตัวและของอิงข้างดำจำนวน 9 ตัว เท่านั้นที่ให้ผล sequencing ชัดเจนและน่าเชื่อถือ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 678 คู่เบส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Dnasp พบจำนวน haplotype ที่แตกต่างกันจำนวน 10 haplotype ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 138 (20.35%) ตำแหน่ง มี parsimony informative sites จำนวน 129 ตำแหน่ง และมีค่า haplotype diversity (hd) และค่า nucleotide diversity ( $\pi$ ) ค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ย  $hd = 0.810 \pm 0.080$  และ  $\pi = 0.09202 \pm 0.00887$  โดยมีค่า Genetic distance ระหว่างประชากรของอิงทั้งสองชนิดระหว่าง 0.000 ถึง 0.202 แสดงว่าประชากรของอิงน้ำเต้าและอิงข้างดำมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน COI ค่อนข้างสูง ซึ่งเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของอิงทั้งสองชนิด นอกจากนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการยังพบว่าอิงน้ำเต้าและอิงข้างดำมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group การตรวจพบการเกิด gene flow ระหว่างประชากรของอิงทั้งสองชนิดแสดงว่าอิงน้ำเต้าและอิงข้างดำสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้

**คำสำคัญ:** การผสมข้ามสายพันธุ์, สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก, ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ, ยีนโพลี

## Abstract

Hybridization is a mating between genetically different species. It results from incomplete reproductive isolation. Viable and fertile hybrids may lead to gene flow between populations or species. This can be checked using bio-molecular techniques. Ornate Chorus Frog (*Microhyla fissipes*), Dark-sided Chorus Frog (*M. heymonsi*) and Noisy Chorus Frog (*M. butleri*) are amphibian 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. Therefore, this study aims to design species-specific mtDNA marker to identify species and to detect possible natural hybridization among these three species. Seventeen *M. fissipes* were collected from Chulalongkorn University (CU) and Khao Khew Open zoo (KK), twenty *M. heymonsi* were collected from Thong Pha Phum Natural Park (TP) and KK and ten *M. butleri* were collected from TP. These 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 only twelve *M. fissipes* and nine *M. heymonsi* had obvious and reliable COI sequences, 678 base pairs. Ten unique haplotypes based on 138 (20.35%) variable sites were detected from the 21 aligned sequences using Dnasp program. The haplotype diversity (hd) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) were high. On average,  $hd = 0.810 \pm 0.080$  and  $\pi = 0.09202 \pm 0.00887$ . In addition, there were 129 parsimony informative sites and the genetic distance among populations ranged from 0.000 to 0.202. This indicates that the COI gene is suitable for use as a species-specific mtDNA marker. Moreover, phylogenetic analyses of the mtDNA haplotypes indicated that *M. fissipes* and *M. heymonsi* are monophyletic in their evolutionary relationships. Furthermore, the detections of gene flow between the two species may indicate the occurrence of historical natural hybridization between *M. fissipes* and *M. heymonsi*.

**Keywords:** hybridization, amphibian, gene flow, mitochondrial DNA

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญเรื่อง.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
วิธีดำเนินการศึกษา.....	9
ผลการศึกษา.....	15
สรุปและวิจารณ์ผล.....	33
เอกสารอ้างอิง.....	35
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	38

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างของอิ่งแต่ละชนิดที่ใช้ในการศึกษา.....	10
ตารางที่ 2	แสดงชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	12
ตารางที่ 3	แสดงผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนยีน CO ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์.....	15
ตารางที่ 4	แสดงค่า Genetic distance ด้วยวิธี Kimura two parameter ของอิ่งน้ำเต้า และอิ่งข้างดำ จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณ มีความยาวเท่ากับ 678 bp.....	27
ตารางที่ 5	แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของ <i>M. fissipes</i> ในแต่ละพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง.....	28
ตารางที่ 6	แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของ <i>M. heymonsi</i> ในแต่ละพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง.....	28

## สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของอิ่งน้ำเต้า.....	6
ภาพที่ 2	แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของอิ่งข้างดำ.....	7
ภาพที่ 3	แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของอิ่งลายเลอะ.....	8
ภาพที่ 4	แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอิ่งน้ำเต้า จำนวน 7 ตัวอย่างจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพฯ ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....	16
ภาพที่ 5	แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอิ่งข้างดำ จำนวน 10 ตัว จากพรุหนองปลิง อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....	16
ภาพที่ 6	แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอิ่งลายเลอะ จำนวน 10 ตัว จากพรุหนองปลิง อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....	17
ภาพที่ 7	แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอิ่งน้ำเต้า จำนวน 8 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี ด้วยการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....	17
ภาพที่ 8	แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอิ่งข้างดำ จำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี ด้วยการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....	18
ภาพที่ 9	แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอิ่งน้ำเต้า และอิ่งข้างดำจำนวนชนิดละ 3 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์.....	18

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 10	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 678 bp จำนวน 21 ตัวอย่างจาก 2 ประชากรของอึ่งน้ำเต้า ( <i>M. fissipes</i> ) จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (MF-CU) และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (MF-KK) และจาก 2 ประชากรของอึ่งข้างดำ ( <i>M. heymonsii</i> ) จากอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ (MH-TP) และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (MH-KK) เทียบกับ outgroup ได้แก่ <i>M. annectens</i> และ <i>M. marmorata</i> โดยเครื่องหมาย (.) แสดงตำแหน่งของเบสที่เหมือนกัน และ sequence ที่อยู่ด้านล่างสุด แสดง consensus sequence.....	20
ภาพที่ 11	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำ (Phylogenetic tree) ที่สร้างโดยวิธี Neighbor-joining โดยวิเคราะห์จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี <i>M. annectens</i> และ <i>M. marmorata</i> เป็น outgroup โดยตัวย่อแสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 1.....	30
ภาพที่ 12	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำ (Phylogenetic tree) ที่สร้างโดยวิธี Maximum parsimony โดยวิเคราะห์จาก ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี <i>M. annectens</i> และ <i>M. marmorata</i> เป็น outgroup โดยตัวย่อแสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 1.....	31
ภาพที่ 13	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำ (Phylogenetic tree) ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood method โดย วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิ แสดงค่าbootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี <i>M. annectens</i> และ <i>M. marmorata</i> เป็น outgroup โดยตัวย่อแสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 1.....	32

การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่าง  
 อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsii*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) โดย  
 ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจสอบในพื้นที่

อพ.สธ.

GENETIC VARIATION AND GENETIC ASSESSMENT OF POSSIBLE NATURAL  
 HYBRIDIZATION BETWEEN THREE SPECIES OF TOADS IN THE GENUS *MICROHYLA*  
 USING MTDNA ANALYSIS IN THE RSPG AREA

อัมพร วิเวกแวว และ วิเชษฐ คนชื้อ

Amporn Wiwegweaw and Wichase Khonsue

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
 Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok,  
 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกลไกการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ (reproductive isolation) ของ  
 สิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวาง ทั้งในพืชและสัตว์ ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่าสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติหลายชนิดที่มีความ  
 ใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการ (closely related species) และมีการกระจายตัวทับซ้อนกัน (overlapping  
 ranges) หรือเข้ามาอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกัน (contact zone or sympatry) สามารถผสมต่างสายพันธุ์  
 (interspecific hybridization) และให้กำเนิดลูกผสม (hybrid) ที่มีชีวิต ที่อาจเป็นและไม่เป็นหมันได้ (Arnold,  
 1997; 2006) จากการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสัตว์หรือพืชทั้งสองสปีชีส์นั้นยังมีการแบ่งแยกกันทางการ  
 สืบพันธุ์ไม่สมบูรณ์ (incompletely reproductive isolation) ซึ่งการแบ่งแยกกันทางการสืบพันธุ์นี้เกิดจากสิ่งกีด  
 ขวางทางการสืบพันธุ์ (reproductive isolating barriers) ที่ทำหน้าที่ขัดขวางหรือป้องกันการเกิดขึ้นของลูกผสม  
 (Coyne & Orr, 2004) สิ่งกีดขวางทางการสืบพันธุ์นี้สามารถพบได้เกือบทุกระยะของกระบวนการสืบพันธุ์ ไม่ว่าจะเป็น  
 เป็นช่วงก่อนการปฏิสนธิ (prezygotic isolating barrier) เช่น รูปร่างหรือโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ไม่เข้าคู่กัน  
 (genitalia incompatibility) (Kubota & Sota, 1998) หรือหลังการปฏิสนธิ (postzygotic isolating barrier)  
 เช่น การไม่เข้าคู่กันระหว่างยีนของไข่และสเปิร์ม (genetic incompatibility) (Palumbi, 1991; Levitan, 2002)  
 ส่งผลให้ลูกผสมตายเนื่องจากไม่สามารถเจริญเป็นปกติได้ ถ้าสิ่งมีชีวิตทั้งสองสปีชีส์ที่ผสมต่างสายพันธุ์ยังไม่มี  
 วิวัฒนาการของสิ่งกีดขวางทางการสืบพันธุ์หลังการปฏิสนธิ การผสมต่างสายพันธุ์ย่อมนำไปสู่การเกิดขึ้นของ  
 ลูกผสม (hybrid) ที่มีชีวิตและไม่เป็นหมัน ซึ่งหากเหตุการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นจริงลูกผสมเหล่านั้นอาจทำหน้าที่เป็น  
 ตัวกลางในการถ่ายทอดยีนจากสัตว์ชนิดหนึ่งไปยังสัตว์อีกชนิดหนึ่งได้ (introgression or gene flow) (e.g.,  
 Barton & Hewitt, 1985; Mallet, 2005; Plotner et al., 2008)

อิงน้ำเต้า (Ornate chorus frog; *Microhyla fissipes* Boulenger, 1884) อิงข้างดำ (Dark-sided chorus frog; *M. heymonsi* Vogt, 1911) และอิงลายเลอะ (Noisy chorus frog; *M. butleri* Boulenger, 1900) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อยู่ในสกุลเดียวกันเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกัน มีขนาดลำตัวเล็ก ไม่แตกต่างกันมาก ในประเทศไทยสามารถพบการกระจายตัวของอิงทั้งสามชนิดได้ในทุกภาคของประเทศไทย อิงทั้งสามชนิดนี้มีลักษณะถิ่นอาศัยเฉพาะคล้ายๆ กัน คือใต้ใบไม้ กองหิน กองหญ้า และวัสดุอื่นๆ บนพื้นดิน มีการกระจายตัวทับซ้อนกันในหลายพื้นที่ในประเทศไทย และที่สำคัญอิงเป็นสัตว์มีกระดุกสันหลังที่มีการปฏิสนธิแบบภายนอก (external fertilization) ซึ่งเป็นกระบวนการที่สามารถเพิ่มโอกาสให้สเปิร์มของอิงชนิดหนึ่งเข้าผสมกับไข่ของอิงอีกชนิดหนึ่งได้ง่ายกว่าการมีการปฏิสนธิภายใน (internal fertilization) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ที่อิงสองหรือสามชนิดนี้จะผสมต่างสายพันธุ์กันได้ ดังนั้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมพันธุ์ข้ามกันระหว่างอิงทั้งสามชนิดนี้ จึงควรตรวจสอบดูว่ามียีนโพลีเมอร์จากอิงชนิดหนึ่งไปยังอิงอีกชนิดหนึ่งหรือไม่ โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลในการตรวจสอบ

## เอกสารที่เกี่ยวข้อง

การผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตสองชนิดที่มีความใกล้ชิดกันเชิงวิวัฒนาการที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรหรือสปีชีส์ที่แตกต่างกัน โดยการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์นั้นมีผลมาจากกระบวนการการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete reproductive isolation) (Futuyma, 1997) ในบางกรณีการผสมข้ามสายพันธุ์อาจนำไปสู่การผลิตลูกผสม (hybrid) โดยลูกผสมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะมีลักษณะสัณฐานภายนอกก้ำกึ่ง (intermediate) ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิด ทั้งนี้ถ้าลูกผสมที่เกิดขึ้นนั้นสามารถอยู่รอดและสืบพันธุ์ได้ ลูกผสมเหล่านั้นอาจทำให้เกิดการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ระหว่างสปีชีส์ทั้งสองได้ (Arnold, 1997, 2006; Mallet, 2005) โดยการผสมพันธุ์แบบ backcross กับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่ การที่ลูกผสมมีการผสมพันธุ์แบบ backcross กับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่จะทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนกับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่มากขึ้น จนในที่สุดเกิดเป็นลูกผสมที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่จนแยกไม่ออก ในกรณีนี้ จึงมีการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biology) มาใช้ในการตรวจสอบร่วมกับข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา เช่น การตรวจสอบยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตร่วมกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตจากลักษณะภายนอก ซึ่งหากสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นลูกผสม สิ่งมีชีวิตนั้นจะมีชนิดของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ไม่สอดคล้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นโดยใช้ลักษณะภายนอก การผสมข้ามสายพันธุ์ตามธรรมชาตินั้นเชื่อว่าจะเกิดขึ้นได้ยาก เนื่องจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีกลไกการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ไม่สามารถผสมพันธุ์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ได้ แต่ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ เช่น การผสมข้ามสายพันธุ์ในปลา (e.g. Wilson & Bernatchez, 1998) ในแมลงหวี่ (e.g. Bachtrog et al., 2006), ในกระต่ายป่า (e.g. Alves et al., 2008; Plötner et al., 2008), ในหนู (Bozilkova et al., 2005) รวมทั้งในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Spolsky & Uzzell, 1984; Sumida, et al., 2002)

อึ่งน้ำเต้า (Ornate chorus frog; *Microhyla fissipes* Boulenger, 1884) อึ่งข้างดำ (Dark-sided chorus frog; *M. heymonsi* Vogt, 1911) และอึ่งลายละเอียด (Noisy chorus frog; *M. butleri* Boulenger, 1900) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน จัดอยู่ในสกุลเดียวกัน คือ *Microhyla* อึ่งน้ำเต้ามีความยาวประมาณ 28 มิลลิเมตร กลางหลังมีลายคล้ายรูปน้ำเต้าสีน้ำตาลเข้ม ข้างหัวและลำตัวมีแถบสีดำด้าน (รูปที่ 1) อึ่งข้างดำ มีความยาวประมาณ 20-22 มิลลิเมตร กลางหลังมีเส้นแคบสีจาง พาดมาตามแนวสันหลัง 1 เส้น ระหว่างเส้นอาจมีจุดประคบ ข้างละจุด (รูปที่ 2) และอึ่งลายละเอียด มีความยาวประมาณ 22-26 มิลลิเมตร กลางหลังมีลวดลายสมมาตรกัน ขอบของลายหยักเป็นคลื่นสีจางลงมาถึงสีข้างและเป็นลายพาดมาที่ขา (รูปที่ 3) จากข้อมูลดังกล่าวจะพบว่าอึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้มีขนาดลำตัวไม่แตกต่างกัน มีลักษณะสัณฐานภายนอกคล้ายคลึงกัน และสามารถพบอึ่งทั้งสามชนิดได้ทุกภาคของประเทศไทย (Matsui, et al., 2011; Meijden, et al., 2007; ัญญา, 2546) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบอึ่งทั้งสามชนิดอาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกัน (Sympatric area) เช่น ในบริเวณอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี พบอึ่งทั้งสามชนิดอยู่ในบริเวณเดียวกันจำนวนมากโดยเฉพาะในฤดูฝน (วิเชษฐและคณะ 2546) และที่สำคัญการที่อึ่งทั้งสามชนิดมีการปฏิสนธิแบบภายนอก (external fertilization) ทำให้โอกาสที่จะเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์กันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดเป็นไปได้สูงกว่าการปฏิสนธิแบบภายใน (internal fertilization) เพราะการปฏิสนธิแบบภายนอกเป็นการเพิ่มโอกาสให้สเปิร์มของอึ่งชนิดหนึ่งเข้าผสมกับไข่ของอึ่งอีกชนิดหนึ่งได้ง่าย (Huxel, 1999; Wells, 1977) จากข้อมูลดังกล่าว

ประกอบกับการสำรวจพบอึ่งที่มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างอึ่งทั้งสามชนิด (intermediate) และมีการศึกษาพบว่ากบนา 2 สปีชีส์ คือ *Rana limnocharis* และ *R. cancrivora* สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ (Sumida, et al., 2002) จึงเกิดสมมติฐานขึ้นว่าอึ่งทั้งสามชนิดสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันในธรรมชาติได้หรือไม่ ซึ่งในการทดสอบสมมติฐานนี้ เราสามารถใช้วิธีการตรวจสอบได้ทั้งทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และทางพันธุกรรม (Genetics) แต่เนื่องจากการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดของอึ่ง โดยเฉพาะอึ่งที่มีลักษณะ intermediate ซึ่งยากต่อการจำแนกชนิดของอึ่ง ดังนั้นในการตรวจสอบสมมติฐานในครั้งนี้ จึงนำวิธีการตรวจสอบทางพันธุกรรมเข้ามาช่วย โดยจะทำการตรวจสอบการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน COI ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิด แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเริ่มต้นและยังไม่มีการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ดังนั้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์กันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดจึงต้องเริ่มจากการศึกษาแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งทั้ง 3 ชนิด เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่ออึ่งแต่ละชนิด (Species specific mitochondrial DNA markers) ก่อนเพื่อใช้ในการตรวจสอบการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน COI ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดต่อไปในอนาคต

## ข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

อึ่งน้ำเต้า

Ornate Chorus Frog

*Microhyla fissipes* Boulenger, 1884

**ลักษณะ** ขนาดวัดจากปลายปากถึงก้น 23-30 มิลลิเมตร ขนาดปานกลางค่อนข้างเล็ก ลำตัวอ้วนแบน ดูคล้ายรูปสามเหลี่ยม หัวแหลม ไม่เห็นแผ่นหู ขาคู่หลังสั้น เมื่อเหยียดไปข้างหน้าข้อเท้าจะอยู่ตรงตำแหน่งคอหรือใกล้กับระดับลูกตาดำไม่เลยปากออกไป นิ้วเท้าพองออกตอนปลายแต่ไม่เป็นแผ่นกลมและมีพังผืดอยู่เพียงนิดเดียวพอสังเกตเห็นเท่านั้น ลำตัวด้านหลังสีออกน้ำตาลคล้ำ น้ำตาลอ่อน หรือน้ำตาลออกเทา ลวดลายรูปคล้ายน้ำเต้าเงินที่ชูยอดขึ้นไปอยู่ระหว่างลูกตาดำทั้งสอง มีความหลากหลายในรูปแบบและความเข้มบางตัวชัดเจน บางตัวแทบไม่มีลายเลย โดยเฉพาะตัวเมียมักมีลวดลายไม่ค่อยชัดเจน แขนและขามีลายสีคล้ำพาดขวางซึ่งมีลายที่เด่นๆ เพียง 2-3 ลายเท่านั้น ใต้คอตัวผู้สีคล้ำ ใต้ท้องและใต้แขนขาสีขาวออกเหลือง ใต้ฝ่ามือและฝ่าเท้าสีคล้ำกว่าส่วนใต้ขา ลูกอ๊อดมีขนาดตัวเล็กและโปร่งแสง ส่วนหน้าสุดของหัวป้าน ตาอยู่ทางด้านข้างของหัว มีจุดสีดำกระจายทั่วลำตัวแต่หนาแน่นมากบริเวณที่เป็นกล่องสมอง แผ่นครีบท่างใหญ่และมีจุดสีดำกระจายทั่วแผ่นครีบท่างยาวและส่วนปลายของหางเรียวยาวเล็กเป็นเส้น ปากอยู่ปลายสุดของหัว ช่องปากเล็ก ไม่มีตุ่มพินและไม่มีจะงอยปาก (รูปที่ 1) (ธัญญา, 2546; วิษณุฐ์ และคณะ 2546)

**การแพร่กระจาย** มีการกระจายกว้างขวาง ตั้งแต่อินเดียตอนเหนือ แถบเทือกเขาหิมาลัย ทิวอินเดีย ศรีลังกา จีน ฮองกง ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ พม่า เกาะไต้หวัน ตลอดประเทศอินโดจีนลงไปถึงคาบสมุทรมลายู ในประเทศไทยพบทุกภาคของประเทศที่อยู่อาศัย ช่อนตัวไต้ใบไม้ ขอนไม้ และวัสดุที่กองอยู่บนพื้นป่า ทั่วไปพบในปริมาณประชากรสูงที่สุดในกลุ่มอึ่งขนาดเล็กทั้งหมด โดยเฉพาะในฤดูฝนช่วงเดือนกรกฎาคม พบในปริมาณมากบริเวณป่าดิบแล้ง รอบๆ แอ่งน้ำที่เป็นแหล่งเติบโตของลูกอ๊อด ตั้งแต่ปลายเดือนมีนาคมจนถึงเดือนมิถุนายน ลูกอ๊อดขนาดเล็กมักหากินรอบๆ แอ่งที่เติบโตมาจากที่เป็นลูกอ๊อด

**อุปนิสัย** หลบซ่อนตัวในเวลากลางวันบริเวณที่มีความชุ่มชื้นและหากินเวลากลางคืน นิสัยการกระโดดหนีเวลาถูกตามจับว่องไวและกระโดดไปได้ไกล แต่มักหมอบนิ่งอยู่กับที่หลังจากกระโดดไปแล้ว อาศัยการพรางตัวหลบเลี่ยงการสังเกตของศัตรูมากกว่าจะพลิกตัวมุดเข้าใต้ใบไม้ที่อยู่ใกล้ที่สุด ผสมพันธุ์และวางไข่ในแอ่งน้ำขังชั่วคราวที่กระจายอยู่ในป่าเต็งรังและในป่าดิบแล้งระหว่างฤดูฝน

**สถานภาพ** ไม่ได้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2535 และไม่มีสถานภาพเพื่อการอนุรักษ์ตามกฎหมายของ Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (2005) และตามกฎหมายของ IUCN (2008)



รูปที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของอึ่งน้ำเต้า

อึ่งข้างดำ

Dark side chorus frog

*Microhyla heymonsi* Vogt, 1911

**ลักษณะ** มีขนาดตัวเล็ก ขนาดวัดจากปลายปากถึงก้นประมาณ 20 มิลลิเมตร ลำตัวยาวและแบน หัวแหลมผิวนิ่ง ลำตัวเรียบแต่ส่วนท้ายของลำตัวและด้านข้างลำตัวมีตุ่มเล็กกระจาย มีรอยพับของผิวนิ่งจากด้านท้ายตาไปที่หัวไหล่ ด้านหลังสีน้ำตาลเทาหรือสีน้ำตาลเหลืองหรือสีน้ำตาลแดง และมีเส้นสีเข้มพาดตามยาวบนหลังหลายเส้น บางตัวอาจมีแต้มเป็นลวดลายคล้ายน้ำเต้าอยู่บนหลังคล้ายกับของอึ่งน้ำเต้า แต่ไม่ชัดเจน และบางตัวอาจมีเส้นสีจางขอบสีดําอยู่บนหลังในแนวกลางตัว ด้านข้างลำตัวจากปลายหัวถึงขาหนีบเป็นสีดำ ด้านท้องสีขาวอมเหลือง แต่บริเวณคางและหน้าอกมีจุดสีดำเล็กกระจาย (เพศผู้ระหว่างฤดูสืบพันธุ์มีคางและส่วนต้นของหน้าอกสีดำ) ขาหน้าและขาหลังมีลายสีเข้มพาดขวาง บริเวณช่องเปิดรูท่อนมีแต้มสีดำขาหน้าสั้นและขาหลังค่อนข้างสั้น เมื่อพับขาหลังแนบกับลำตัวไปทางด้านหน้า ข้อเท้าอยู่ในตำแหน่งทางด้านหน้าของตา นิ้วเท้าหน้าไม่มีแผ่นหนังระหว่างนิ้ว นิ้วเท้าหลังมีแผ่นหนังเล็กมากอยู่ที่โคนนิ้ว ส่วนปลายของนิ้วทุกนิ้วขยายเป็นตุ่มเล็กน้อย ลูกอ๊อดมีลำตัวเรียวยาวสีคล้ำ ครีบหางเล็ก ระหว่างตาทั้งสองข้างมีสีเหลืองหรือสีเงิน พาดขวางอยู่ตรงส่วนหน้าสุดของหัว ริมฝีปากล่างเป็นแผ่นหนังรูปวงกลมและยึด-หดได้ (รูปที่ 2) (ธัญญา, 2546; วิษณุรักษ์และคณะ 2546)

**การแพร่กระจาย** ไต้หวัน จีน อินเดีย พม่า ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ ในประเทศไทยพบทุกภาคของประเทศ

**ที่อยู่อาศัย** ชุกซ่อนตัวใต้ใบไม้แห้ง กองหิน กองหญ้า และวัสดุอื่นๆ บนพื้นดิน มักอยู่ไม่ไกลจากแหล่งขยายพันธุ์ซึ่งเป็นแอ่งน้ำขัง พบในปริมาณมากบริเวณป่าดิบแล้ง รอบๆ แอ่งน้ำที่เป็นแหล่งเติบโตของลูกอ๊อด ตั้งแต่เดือนสิงหาคมจนถึงเดือนกันยายน ซึ่งเป็นหลายฤดูฝน ลูกอ๊อดขนาดเล็กมักหากินรอบๆ แอ่งที่เติบโตมาจากที่เป็นลูกอ๊อด

**อุปนิสัย** หลบซ่อนตัวในเวลากลางวันบริเวณที่มีความชุ่มชื้นและออกหากินเวลากลางคืน เมื่อถูกรบกวนจะกระโดดหนีเป็นระยะทางไกล เวลาตกลงสู่พื้นดินจะรีบพลิกตัวหลบเข้าใต้ใบไม้หรือวัสดุอื่นๆ ทันที ไม่หมอบนิ่งอยู่กับที่เหมือนอิงชนิดอื่นๆ จึงจับตัวมาศึกษาได้ยาก ผสมพันธุ์และวางไข่ในแอ่งน้ำขังชั่วคราวที่กระจายอยู่ในป่าเต็งรัง และในป่าดิบแล้งระหว่างฤดูฝน รวมทั้งในอ่างเก็บน้ำ และถังน้ำที่ตั้งไว้ในพื้นที่ป่า

**สถานภาพ** ไม่ได้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2535 และไม่มีสถานภาพเพื่อการอนุรักษ์ตามเกณฑ์ของ Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (2005) และตามเกณฑ์ของ IUCN (2008)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกอิงข้างดำ

อิงลายเลอะ

Noisy chorus frog

*Microhyla butleri* Boulenger, 1900

**ลักษณะ** มีขนาดตัวเล็ก ขนาดวัดจากปลายปากถึงก้นประมาณ 30 มิลลิเมตร ลำตัวเรียว หัวแหลม ผิวหนังลำตัวเรียบ แต่ทางส่วนต้นของด้านหลังมีตุ่มแบนกระจายอยู่บ้างด้านหลังสีเทาหรือสีน้ำตาลเทาหรือสีน้ำตาลแดง ส่วนปลายสุดของหัวเป็นสีจางและมีทางสีครีมจากด้านท้ายตัวลงไปที่ดินขาหน้า บน หลังมีลวดลายสีเข้มขอบขาวหรือขอบสีแดงรูปร่างคล้ายน้ำเต้า ด้านข้างลำตัวสีจางและมีจุดสีแดงกระจายเพศผู้มีคางเป็นจุดประสีเทาเข้มและขีดจางจนเกือบขาวในเพศเมีย ขาหน้าและขาหลังเรียวยาว เมื่อพับขาหลังแนบกับลำตัวไปทางด้านหน้า ข้อเท้าอยู่ในตำแหน่งใกล้ส่วนปลายของปาก นิ้วเท้าหน้าไม่มีแผ่นหนังระหว่างนิ้ว นิ้วเท้าหลังมีแผ่นหนังประมาณ 1/3 ของความยาวนิ้ว ส่วนปลายของนิ้ว ทุกนิ้วขยายออกเป็นตุ่มและมีรอยหยักทางด้านหน้าของตุ่ม กับมีร่องยาวอยู่ทางด้านบนของตุ่ม ตุ่มของนิ้วเท้าหลังใหญ่กว่าของนิ้วเท้าหน้า ลูกอ๊อดมีขนาดตัวเล็กและโปร่งแสงแต่มีจุดประสีดำทั่วลำตัว ส่วนหน้าของหัวป้าน แผ่นครีบบางสีแดง ส่วนปลายของหางเรียวเล็กเป็นเส้น ปากอยู่ปลายสุดของส่วนหัว ไม่มีตุ่มฟันและจงอยปาก (รูปที่ 3) (ธัญญา, 2546; วิษณุรักษ์และคณะ 2546)

**การแพร่กระจาย** จีน พม่า ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ ในประเทศไทยพบทุกภาคของประเทศ

**ที่อยู่อาศัย** อยู่ตามพื้นล่างของป่าบริเวณที่มีความชุ่มชื้น โดยทั่วไปอยู่ตามชั้นใบไม้บนพื้นป่าดิบแล้งและป่ากรกฯ ริมลำห้วย ชอนอยู่ใต้ขอนไม้และกองใบไม้

**อุปนิสัย** หลบซ่อนตัวในเวลากลางวันบริเวณที่มีความชุ่มชื้นและออกหากินเวลากลางคืน ผสมพันธุ์และวางไข่ในอ่างเก็บน้ำ มีเสียงร้องดังกว่าสิ่งชนิดอื่นๆ

**สถานภาพ** ไม่ได้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2535 และไม่มีสถานภาพเพื่อการอนุรักษ์ตามเกณฑ์ของ Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (2005) และตามเกณฑ์ของ IUCN (2008)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของอีกลายเลอะ

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของอิงน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อิงข้างดำ (*M. heymonsi*) และอีกลายเลอะ (*M. butleri*) ทั้งภายในประชากรเดียวกัน และระหว่างประชากร โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอีทั้งสามชนิดที่กระจายตัวอยู่ในพื้นที่ต่างๆ ของโครงการ อพ.สธ.
3. เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างอีทั้งสามชนิด ที่มีพื้นที่การกระจายตัวทับซ้อนกัน โดยใช้ยีนบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ

## วิธีดำเนินการวิจัย

### วิธีดำเนินการวิจัยและแผนการปฏิบัติงาน

#### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

##### วัสดุและอุปกรณ์

- Digital Dry Bath (Labnet International, Inc.)
- DNA Thermal Cycler (Eppendorf)
- Centrifuge models 5418 (Eppendorf)
- Centrifuge models GMC-260 (Labtech, Korea)
- Microcentrifuge tube 0.2, 0.5 และ 1.5 ml. (Treff® Switzerland)
- Automatic Micropipette P2, P10, P20, P200 และ P1000 (Hirikul Science)
- Micropipette tip P10, P20 ,P200 และ P1000 (Treff® Switzerland)
- -20°C Freezer (Sharp, Japan)
- Whatman® Laboratory sealing film
- Collection Tube 2 ml. (QIAGEN, Germany)
- Mini column (QIAGEN, Germany)
- Microwave (Sumsung, Korea)
- I – MyRun Electrophoresis (Cosmo Bio Co., Ltd)
- Power supply (Cosmo Bio Co., Ltd)
- Chamber, tray, comb
- PCR-Cooler (Eppendorf)
- Safe Imager Transluminator (Invitrogen Corporation)
- Digital camera (Nikon)
- Electronic clock timer Model CT-30 (Canon co. Ltd., Japan)
- Vortex Mixer (Gemmy Industrail Corp.)
- กรรไกร, คีม (Forcept)
- กระดาษทิชชู (Scott, Thailand)
- ถุงมือยาง (Hycare International Co., Ltd)

##### สารเคมี

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany)
- Favorgen Gel/PCR Purification Kit (FAVORGEN, Taiwan)
- MilliQ
- 10 µM LCO1490 primer
- 10 µM HCO2198 primer
- 100 bp + 1.5 kb DNA ladder (SibEnzyme)

- Loading Dye (SibEnzyme)
- Agarose (Promega corporation, USA)
- SYBR® Safe DNA gel stain (InvitrogenTM)
- Sterile water
- Absolute Ethanol (Merck, Germany)

### เอนไซม์

- EmeraldAmp®GT PCR Master Mix (TAKARA BIO, Japan)

### 3.2 สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

เก็บตัวอย่างอึ่งทั้งสามชนิดจากพื้นที่ต่างๆ ของโครงการ อพ.สธ. และจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ตารางที่ 1) จำนวนชนิดละประมาณ 10 ตัวต่อ 1 พื้นที่ที่ศึกษา โดยตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บมาได้จะถูกเก็บรักษาไว้ใน 95% เอทานอล

ตารางที่ 1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างของอึ่งแต่ละชนิดที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดของอึ่ง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ตัวย่อ	จังหวัด	ปีที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง
อึ่งน้ำเต้า	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	CU	เขตปทุมวัน, กรุงเทพฯ	2555	7
	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว	KK	อ. ศรีราชา, ชลบุรี	2555	10
อึ่งข้างดำ	อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ	TP	อ. ทองผาภูมิ, กาญจนบุรี	2547	10
	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว	KK	อ. ศรีราชา, ชลบุรี	2555	10
อึ่งลายเลอะ	อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ	TP	อ. ทองผาภูมิ, กาญจนบุรี	2547	10
	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว	KK	อ. ศรีราชา, ชลบุรี	2555	0

### 3.3 ขั้นตอนการทดลอง

ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลักๆ ได้แก่

- 3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)
- 3.3.2 การเพิ่มจำนวนยีน COI โดยเทคนิคพีซีอาร์ (DNA amplification)
- 3.3.3 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis
- 3.3.4 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการให้บริสุทธิ์ (PCR product purification)
- 3.3.5 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)
- 3.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple sequence alignment and genetic analyses)

### 3.3.6 การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอ

#### 3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตับของอึ่งแต่ละชนิดโดยใช้ QIAamp® DNA Mini Kit ของบริษัท QIAGEN, Germany ตาม protocol: DNA Purification from Tissues ดังขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1). นำเนื้อเยื่อตับของอึ่งแต่ละชนิด ชนิดละประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2). เติม buffer ATL 180 ไมโครลิตร และ สารละลายเอนไซม์ 10 mg/ml Proteinase K 9 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์ (Vortex Mixer) นำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง (กลับหลอดไปมาทุกๆ 1 ชั่วโมง)
- 3). เติม buffer AL 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 10 ครั้ง แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์ ทำการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
- 4). เติม Absolute Ethanol 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 10 ครั้ง ปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
- 5). สวมคอลัมน์ (mini column) ลงในหลอดคอลเล็กชัน (collection tube) แล้วนำตัวอย่างเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายใส่ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที
- 6). ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำออกจากหลอดคอลเล็กชัน หลังจากนั้นเติม buffer AW1 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- 7). ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำออกจากหลอดคอลเล็กชัน แล้วเติม buffer AW2 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
- 8). เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง ปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ของเหลวที่เหลือทั้งหมดตกลงในหลอดคอลเล็กชัน ทิ้งส่วนของเหลวทั้งหมด
- 9). นำเฉพาะคอลัมน์สวมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม buffer AE 30 ไมโครลิตรลงไปตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเติม buffer AE อีก 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- 10). เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ต่อไป

### 3.3.2. การเพิ่มจำนวนยีน COI โดยเทคนิคพีซีอาร์ (DNA amplification)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย คือ ยีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ คือ LCO1490 และ HCO2198 (Folmer, 1994) (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** แสดงชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อ primer (Forward/Reverse)	ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	ความยาว (bp)	TM (°C)
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25	59.2
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	25	61.6

ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

เตรียมส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยจะใช้ปริมาณสารต่างๆ ในแต่ละหลอดดังนี้

Total DNA template	5.0	µl
10 µM LCO1490 (forward primer)	2.5	µl
10 µM HCO2198 (reverse primer)	2.5	µl
MilliQ water	15.0	µl
EmeraldAmp® GT PCR Master Mix	<u>25.0</u>	µl
Total volume	<u>50.0</u>	µl

สังเคราะห์ยีนเป้าหมายโดยใช้เครื่อง DNA Thermal Cycler PCR โดยกำหนดโปรแกรมให้มีสภาวะที่ซีอาร์ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	Initial denaturation	94°C	2 นาที
ขั้นตอนที่ 2	Denaturation	94°C	30 วินาที
	Annealing	45°C	1 นาที
	Extension	72°C	1 นาที 30 วินาที
ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยทั้งสิ้น 35 รอบ			
ขั้นตอนที่ 3	Final extension	72°C	3 นาที

นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycler และเดินเครื่อง

### 3.3.3 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียม 1% agarose gel โดย ชั่งผง agarose หนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เต็ม 1X TBE buffer 50 ml เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

เติม SYBR® Safe DNA gel stain 5 µl เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้หายร้อนแล้วเท agarose gel solution ลงใน tray และใส่ comb ลงไป ตั้งทิ้งไว้ให้ agarose gel แข็งตัวประมาณ 30 นาที แล้วดึง comb ออก จากนั้นนำภาดเจลไปวางลงใน agarose gel chamber ใส่ 1X TBE buffer เทลงใน chamber ให้ได้ปริมาณที่สูงกว่าผิวหน้า agarose gel ≈ 2-3 mm ใช้ micropipette ดูด PCR product ทีละ 1 ตัวอย่าง และ maker ลงใน well จากนั้นเปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที อ่านผลของ PCR product โดยใช้ Safe Imager transluminator และถ่ายภาพเจลด้วยกล้องดิจิทัล

### 3.3.4 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการให้บริสุทธิ์ (PCR product purification)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการมาทำให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป คือ Favorgen Gel/PCR Purification Kit (FAVORGEN, Taiwan) โดยมีวิธีการดังนี้

- 1). เติม FADF buffer 5 เท่าของตัวอย่างในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ดูดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาณ 56 ไมโครลิตรหรือทั้งหมดลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เท็กซ์
- 2). ดูดตัวอย่างลงไปนาคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- 3). เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง เติม wash buffer 700 ไมโครลิตรลงไปตรงกลางของคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที
- 4). เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
- 5). นำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติม elution buffer 25 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของคอลัมน์แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอหลุดจากคอลัมน์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่บริสุทธิ์แล้วไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
- 6). นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์ทั้งหมดมาตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วย SYBR® Safe DNA gel stain ใน TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้กระแสไฟฟ้าระดับ 135 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที
- 7). อ่านผลของ PCR product โดยใช้ Safe Imager Transluminator และถ่ายภาพดีเอ็นเอที่ปรากฏบน อะกาโรสเจลด้วยกล้องดิจิทัล

### 3.3.5 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นในขั้นตอนที่ 4 ปริมาณ 50 ไมโครลิตรส่งไปยังบริษัท MacroGen Inc. ที่ประเทศเกาหลีใต้เพื่อทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี automated DNA sequencing โดยทางบริษัทจะส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาในรูปแบบไฟล์ข้อมูล

### 3.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple sequence alignment and genetic analyses)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องด้วยตาเปล่า (visual correction) จากนั้นนำผลที่ได้มาทำ Multiple sequences Alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W version 1.81 (Thompson et al, 1994) หาค่า Genetic distance ของอิ่งทั้งสามชนิดภายในประชากรเดียวกันและระหว่างประชากร โดยใช้โปรแกรม Mega version 5.05 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) (Tamura et al, 2011) ใช้โปรแกรม DnaSP5 ([www.ub.edu/dnasp](http://www.ub.edu/dnasp)) (Rozas et al, 2003) สำหรับคำนวณค่า Haplotype Diversity และ Nucleotide Diversity วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยอาศัยวิธี Neighbor-joining, Maximum parsimony และ Maximum Likelihood method โดยคำนวณ bootstrap percentage 1,000 ครั้ง เพื่อสนับสนุน tree ที่ได้ ด้วยโปรแกรม Mega version 5.05 โดยใช้ *M. annectens* (Genbank accession number AB611944) และ *M. marmorata* (AB611952) เป็น outgroup ของการศึกษา จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์เพื่อหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพื่อทำการออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่ออิ่งแต่ละชนิด

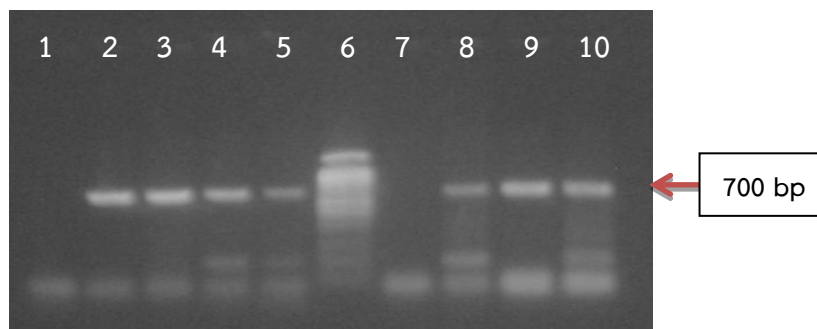
## ผลการศึกษา

### 1. ผลการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลาย เลอะ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตับจากอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ จำนวนทั้งหมด 47 ตัวอย่าง และนำมาเพิ่มปริมาณยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ LCO1490 และ HCO2198 โดยเทคนิคพีซีอาร์และตรวจสอบขนาด PCR product ที่ได้โดย 1% agarose gel electrophoresis พบว่ามีเพียง 23 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ผล PCR product ที่ต้องการ (ตารางที่ 2) โดย PCR product ที่ต้องการมีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (รูปที่ 4-9)

ตารางที่ 3 แสดงผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนยีน CO ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

	ชนิด/สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง					
	อึ่งน้ำเต้า		อึ่งข้างดำ		อึ่งลายเลอะ	
	CU	KK	TP	KK	TP	KK
จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	7	10	10	10	10	0
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เป็นแถบสีเข้มชัดเจน	7	6	2	7	2	0
จำนวนตัวอย่างที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ชัดเจนและน่าเชื่อถือ	7	5	2	7	0	0



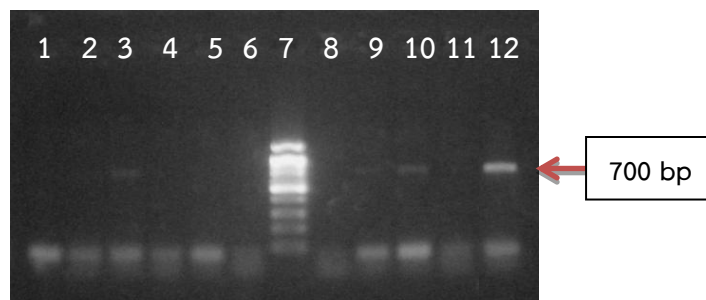
**รูปที่ 4** แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 7 ตัวอย่างจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จ. กรุงเทพฯ ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

- |                  |  |
|------------------|--|
| แฉวที่ 1, 7      | : Negative control   |
| แฉว 2-5 และ 8-10 | : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 7 ตัว (ตัวอย่างที่ 1-7) |
| แฉวที่ 6         | : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder                                   |



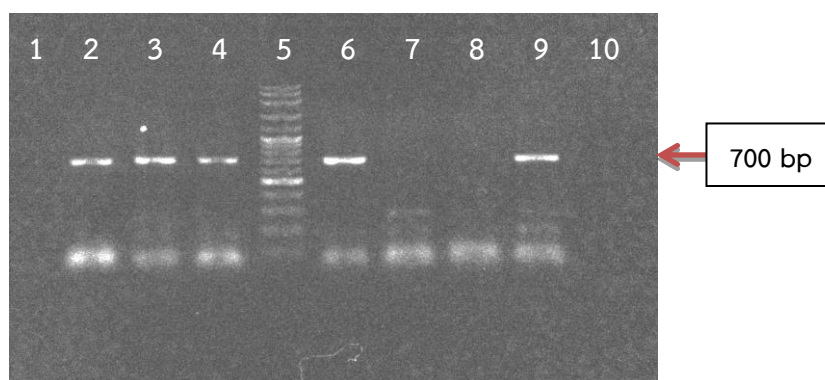
**รูปที่ 5** แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัว จากพรุหนองปลิง อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

- |                  |   |
|------------------|---|
| แฉวที่ 1         | : Negative control  |
| แฉว 2-6 และ 8-12 | : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัว (ตัวอย่างที่ 1-10) |
| แฉวที่ 7         | : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder                                    |



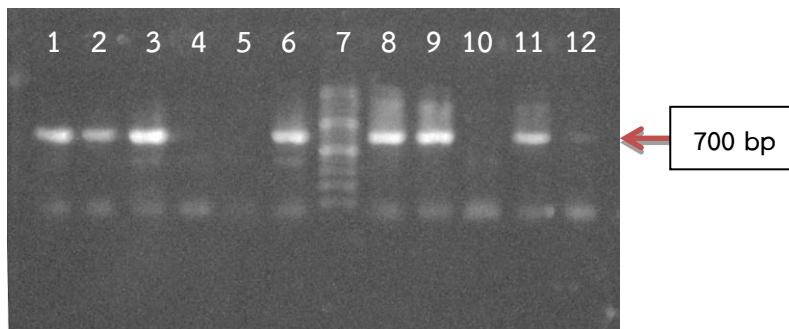
**รูปที่ 6** แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งลายเลอะจำนวน 10 ตัว จากพรุหนองปลิง อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี ด้วยการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

- แฉวที่ 1 : Negative control
- แฉว 2-6 และ 8-12 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งลายเลอะจำนวน 10 ตัว (ตัวอย่างที่ 1-10)
- แฉวที่ 7 : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

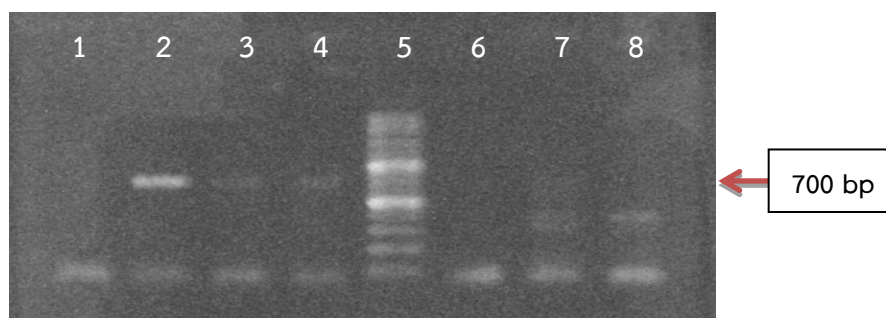


**รูปที่ 7** แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 8 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี ด้วยการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

- แฉวที่ 1-4 และ 6-9 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 8 ตัว (ตัวอย่างที่ 1-8)
- แฉวที่ 5 : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder
- แฉวที่ 10 : Negative control



**รูปที่ 8** แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์  
 แถว 1-6 และ 8-12 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัว (ตัวอย่างที่ 1-10)  
 แถวที่ 7 : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder



**รูปที่ 9** แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำจำนวนชนิดละ 3 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

- แถว 1 : Negative control  
 แถว 2-4 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 3 ตัว (ตัวอย่างที่ 1, 6 และ 7)  
 แถว 6-8 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 3 ตัว (ตัวอย่างที่ 4, 5 และ 9)  
 แถวที่ 5 : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

## 2. ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของอิงน้ำเต้า อิงข้างดำ และอิงลายละเอียด

จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอิงน้ำเต้า อิงข้างดำ และอิงลายละเอียดในสามพื้นที่ของประเทศไทยจำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่าเฉพาะผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอิงน้ำเต้าจำนวน 12 ตัวและอิงข้างดำจำนวน 9 ตัว เท่านั้นที่ให้ผล sequencing ชัดเจนและไม่เกิดการซ้อนทับกันของลำดับเบส (ตารางที่ 2) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 678 คู่เบส มีเบสที่มีเปอร์เซ็นต์ A+T เฉลี่ยเท่ากับ 0.58 ซึ่งมี nucleotide composition เป็น: T(33.8%), C(25.2%), A(24.1%) และ G(16.9%)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Dnasp พบจำนวน haplotype ที่แตกต่างกันจำนวน 10 haplotype ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 138 (20.35%) ตำแหน่ง (รูปที่ 10) มี parsimony informative sites จำนวน 129 ตำแหน่ง นอกจากนี้ในการหาค่า Genetic distance โดยวิธี Kimura two parameter พบว่าระหว่างประชากรของอิงน้ำเต้าและอิงข้างดำมีค่า Genetic distance อยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.202 (ตารางที่ 4)

การคำนวณค่าต่างๆ ของอิงน้ำเต้าและอิงข้างดำในแต่ละประชากร ได้แก่ จำนวนตัวอย่าง (n), จำนวนของ mutation (m), จำนวนของ haplotype (h), haplotype diversity (hd), และ  $\pi$  = nucleotide diversity แสดงไว้ในตารางที่ 5 หากพิจารณาจากทุกประชากรของอิงทั้งสองชนิดจะพบว่า โดยเฉลี่ยค่า haplotype diversity (hd) และค่า nucleotide diversity ( $\pi$ ) มีค่าค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ย  $hd = 0.810 \pm 0.080$  และ  $\pi = 0.09202 \pm 0.00887$

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100
MF2-KK : AAAGATATTGGTACCCTTTATTTAATTTTTGGTGCCTGAGCTGGAATAGTGGGCACTGCCCTCAGTCTCTTAATTCGTGCAGAACTAAGCCAACCAGGCT : 100
MH1-KK : ..... : 100
MH2-KK : ..... : 100
MH8-KK : ..... : 100
MH3-KK : ..... : 100
MH7-KK : .....G..... : 100
MH6-KK : .....G.....G..... : 100
MH10-KK : ..... : 100
MF4-KK : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....G..T.....C...A : 100
MF8-KK : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....G..G..T.....C...A : 100
MF3-KK : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....G..G.....C...A : 100
MF7-CU : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
MH3-TP : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
MF5-CU : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
MF6-CU : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
MF3-CU : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
MF4-CU : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
MF1-CU : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
MF2-CU : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
MH5-TP : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
MF5-KK : .....C..T....CC...C...G.....C.....A..A..A....T.....C...C.....T.....C...A : 100
M. annecte : .....C..C...C...T.G..CC.TG.A.....C..C.....G..A....A..C..TC..C....A.....T..GG : 100
M. marmora : .....C..C...C...A..CC.TG.A.....A.....T.....A..A..C...T.A....TC..T....A....G..C.....AA : 100
          C T   CC  C   G       C       A A A   T   C   C           T       C   A

```

```

*           120           *           140           *           160           *           180           *           200
MF2-KK      : CTCTTCTAGGAGATGACCAAATTTATAATGTCATTGTTACTGCTCAGCATTTGTTATAATTTTTTTTATGGTTATACCTATTATGATTGGAGGTTTTGG : 200
MH1-KK      : ..... : 200
MH2-KK      : ..... : 200
MH8-KK      : .....G..... : 200
MH3-KK      : ..... : 200
MH7-KK      : ..... : 200
MH6-KK      : .....A..... : 200
MH10-KK     : .....A..... : 200
MF4-KK      : ...G...C...C.C.T...C...T...A...G.A...C.C... : 200
MF8-KK      : ...G...C...C.C.T...C...A...G.A...C.C... : 200
MF3-KK      : ...G...C...C.C.T...C...A...G.A...C.C... : 200
MF7-CU      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
MH3-TP      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
MF5-CU      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
MF6-CU      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
MF3-CU      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
MF4-CU      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
MF1-CU      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
MF2-CU      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
MH5-TP      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
MF5-KK      : ...G...C...C.T...C...C.A...A.C...C.T.C... : 200
M. annecte : .C...G.C...A.C...C.C.T.T...G...C.C.A...G.C.C.A...G.A... : 200
M. marmora : ...T...C.C.T...A...A.C.C.T.T...C.G...C.G.C.C.A...C.C... : 200
           G   C           C T   C           A           A C           T C

```

```

*      220      *      240      *      260      *      280      *      300
MF2-KK : TAACTGACTGGTCCCTTTAATAAATTGGAGCCCCAGACATAGCATTTCCTCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTCCCTCCATCGTTCCCTTTTACTC : 300
MH1-KK : ..... : 300
MH2-KK : ..... : 300
MH8-KK : .....G.....A..... : 300
MH3-KK : .....A..... : 300
MH7-KK : .....A..... : 300
MH6-KK : .....G...A...C...A..... : 300
MH10-KK : .....C...A..... : 300
MF4-KK : ...T...T..T..AC.....C.....G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.TT.G : 300
MF8-KK : ...T...T..T..AC.....C.....G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.TT.G : 300
MF3-KK : ...T...T..T..AC.....C.....G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.TT.G : 300
MF7-CU : ...T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
MH3-TP : ...T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
MF5-CU : ...T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
MF6-CU : ...T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
MF3-CU : ...T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
MF4-CU : ...T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
MF1-CU : ...T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
MF2-CU : ...T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
MH5-TP : ...T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
MF5-KK : C..T...T..T..AC.....T..G.....G.....C.....T..C..T..T..T..CC.CT.G : 300
M. annecte : ...T...T..A..CC.T..G..C..G..A.....G.....A.....C...G.....C..G..A..C.....C..C..T : 300
M. marmora : A.....T..A..AC.C.....A.....G.....T.....C..T.....T..T..T..G..T..C..C..C.....C..T... : 300
      T      T  T  AC              G              C              T  C  T  T  T  CC CT G

```

```

*           320           *           340           *           360           *           380           *           400
MF2-KK      : TTAGCCTCATCAGCCGTAGAAGCTGGGGCAGGAACAGGATGGACTGTTTATCCACCCCTAGCCGGTAATCTTGCACATGCAGGTCCATCCGTGGATTAA : 400
MH1-KK      : ..... : 400
MH2-KK      : ..... : 400
MH8-KK      : ..... : 400
MH3-KK      : ..... : 400
MH7-KK      : ..... : 400
MH6-KK      : ..... : 400
MH10-KK     : .....C..... : 400
MF4-KK      : C...T...A..T..T.A...T...T..T.A..A.....C..T...T.....C..C..C..C.....CC.T : 400
MF8-KK      : C...T...A..T..T.A...T...T..T.A..A.....C..T...T.....C..C..C..C.....CC.T : 400
MF3-KK      : C...T...A..T...A...T...T..T.A..A.....C..T...T.....C..C..C..C.....CC.T : 400
MF7-CU      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
MH3-TP      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
MF5-CU      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
MF6-CU      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
MF3-CU      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
MF4-CU      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
MF1-CU      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
MF2-CU      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
MH5-TP      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
MF5-KK      : C...A...A..T...A..A.C...T..T.A..A.....C..T...T.....C...T..C..C..C.....CC.T : 400
M. annecte : C.G..A..C...T..T...G.....G..T.A..C..A..C..C...C...C..C...T...C..C..C..T..A..CC... : 400
M. marmora : C...A..T..T..A..T...C..A..T..T...C..A.....T..T..T..C..C..C..C..C..C..T..T..A..C... : 400
C           A T A C T T A A C T T C T C C C CC T

```

```

*      420      *      440      *      460      *      480      *      500
MF2-KK : CAATTTTTTCCTTACATCTAGCCGGAGTTTCATCAATTTTAGGTGCAATTAATTTTATTACTACCATTATTAACATAAAAACCCCATCTGTTACTCAATA : 500
MH1-KK : ..... : 500
MH2-KK : ..... : 500
MH8-KK : ..... : 500
MH3-KK : .....T..... : 500
MH7-KK : .....T..... : 500
MH6-KK : ..... : 500
MH10-KK : ..... : 500
MF4-KK : .....C.G..T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..G..... : 500
MF8-KK : .....C.G..T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..G..... : 500
MF3-KK : .....C.G..T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..G..... : 500
MF7-CU : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
MH3-TP : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
MF5-CU : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
MF6-CU : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
MF3-CU : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
MF4-CU : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
MF1-CU : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
MF2-CU : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
MH5-TP : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
MF5-KK : .....C...G...T...T..G...T...C.T..G.....T.....T.....A..A...G... : 500
M. annecte : .C..C..C..C.C.....A..G..A..C...CC...G..T..C..C...C...T..CC.A.....C..A..C..C..... : 500
M. marmora : .T.....C...T...T..G..A..C...C.C..G..C.....A..T..CC.C.....T...A..C..... : 500
          G  T  T  G  T      C  T  G              T                      A  A

```

```

*      520      *      540      *      560      *      580      *      600
MF2-KK : CCAAACACCCCTATTT-GTGTGATCTGTTCTAATTACTGCTGTACTTCTTCTTCTATCTCTCCCTGTCCTTGCTGCAGGCATTACTATACTTTTAACTGA : 599
MH1-KK : .....-..... : 599
MH2-KK : .....-..... : 599
MH8-KK : .....-..... : 599
MH3-KK : .....-..... : 599
MH7-KK : .....-..... : 599
MH6-KK : .....-..... : 599
MH10-KK : .....-..... : 599
MF4-KK : T.....C-.T.G.C.CT...C...A.C.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MF8-KK : T.....CT.T.G.C.CT...C...A.C.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 600
MF3-KK : T.....C-.T.G.C.CT...C...A.C.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MF7-CU : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MH3-TP : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MF5-CU : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MF6-CU : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MF3-CU : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MF4-CU : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MF1-CU : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MF2-CU : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MH5-TP : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
MF5-KK : T.....-C...C..T...C...A.T.A.A...T.C...A.T...C...T.....C..... : 599
M. annecte : T....C.A....C-.T...G.C.C.C.A.....C.....T.A...C.TT.A.G.C.G.C.A..T.AC...C. : 599
M. marmora : .....C..AT.....-T...A..T...C.A.....AT.A.AT.G.C...A...A.C..T.A.....AC.C..... : 599
T          C      C      T      C      A      W      A      A      T      C      A      T      C      T          C

```

	*	620	*	640	*	660	*	
MF2-KK	:	CCGCAACCTAAACACAACATTTTTTGATCCTGCAGGAGGGGGGACCCAGTCCTTTACCAGCACCTCTTCTGATTTTT	:	677				
MH1-KK	:	.....	:	677				
MH2-KK	:	.....	:	677				
MH8-KK	:	.....	A	.....	A	:	677	
MH3-KK	:	.....	A	.....	A	:	677	
MH7-KK	:	.....	A	.....	A	:	677	
MH6-KK	:	.....	A	.....	A	:	677	
MH10-KK	:	.....	A	.....	A	:	677	
MF4-KK	:	. . . T . . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . T . . . . . C . T . A . T . T . . . . .	:	677				
MF8-KK	:	. . . T . . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . T . . . . . C . T . A . T . T . . . . .	:	678				
MF3-KK	:	. . . T . . . T . G . . T . C . C . C . . . . . C . . . . . T . . G . A . A . T . . . . . C . T . A . T . T . . . . .	:	677				
MF7-CU	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
MH3-TP	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
MF5-CU	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
MF6-CU	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
MF3-CU	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
MF4-CU	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
MF1-CU	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
MF2-CU	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
MH5-TP	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
MF5-KK	:	T . . A . . T . G . . T . C . C . C . . . . . T . . G . A . A . . . . . T . . A . T . T . . . . .	:	677				
<i>M. annecte</i>	:	. . . A . . T . . . . T . C . . . . . C . C . G . . . . . C . . . . . C . T . A . . . . G . . . . . C . . . . .	:	677				
<i>M. marmorata</i>	:	T . . A . . T . . . . . C . . . . . C . . . . . G . A . A . . . . CA . . . . C . T . A . . . . A . T . . . . .	:	677				
		A T G T C C C		T G A A		T A T T		

รูปที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 678 bp จำนวน 21 ตัวอย่างจาก 2 ประชากรของอิงน้ำเต้า (*M. fissipes*) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (MF-CU) และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (MF-KK) และจาก 2 ประชากรของอิงข้างดำ (*M. heymonsi*) จากอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ (MH-TP) และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (MH-KK) เทียบกับ outgroup ได้แก่ *M. annectens* และ *M. marmorata* โดยเครื่องหมาย (.) แสดงตำแหน่งของเบสที่เหมือนกัน และ sequence ที่อยู่ด้านล่างสุดแสดง consensus sequence

ตารางที่ 4 แสดงค่า Genetic distance ด้วยวิธี Kimura two parameter ของอิ่งน้ำเต้าและอิ่งข้างดำ จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 678 bp

	MF1-CU	MF2-CU	MF2-KK	MF3-CU	MF3-KK	MF4-CU	MF4-KK	MF5-CU	MF5-KK	MF6-CU	MF7-CU	MF8-KK	MH1-KK	MH2-KK	MH3-KK	MH3-TP	MH5-TP	MH6-KK	MH7-KK	MH8-KK	MH10-KK	
MF1-CU	—																					
MF2-CU	0.000																					
MF2-KK	0.193	0.193																				
MF3-CU	0.000	0.000	0.193																			
MF3-KK	0.053	0.053	0.200	0.053																		
MF4-CU	0.000	0.000	0.193	0.000	0.053																	
MF4-KK	0.053	0.053	0.202	0.053	0.006	0.053																
MF5-CU	0.000	0.000	0.193	0.000	0.053	0.000	0.053															
MF5-KK	0.001	0.001	0.195	0.001	0.054	0.001	0.054	0.001														
MF6-CU	0.000	0.000	0.193	0.000	0.053	0.000	0.053	0.000	0.001													
MF7-CU	0.000	0.000	0.193	0.000	0.053	0.000	0.053	0.000	0.001	0.000												
MF8-KK	0.053	0.053	0.202	0.053	0.006	0.053	0.003	0.053	0.054	0.053	0.053											
MH1-KK	0.193	0.193	0.000	0.193	0.200	0.193	0.202	0.193	0.195	0.193	0.193	0.202										
MH2-KK	0.193	0.193	0.000	0.193	0.200	0.193	0.202	0.193	0.195	0.193	0.193	0.202	0.000									
MH3-KK	0.193	0.193	0.007	0.193	0.196	0.193	0.197	0.193	0.195	0.193	0.193	0.197	0.007	0.007								
MH3-TP	0.000	0.000	0.193	0.000	0.053	0.000	0.053	0.000	0.001	0.000	0.000	0.053	0.193	0.193	0.193							
MH5-TP	0.000	0.000	0.193	0.000	0.053	0.000	0.053	0.000	0.001	0.000	0.000	0.053	0.193	0.193	0.193	0.000						
MH6-KK	0.195	0.195	0.013	0.195	0.202	0.195	0.203	0.195	0.197	0.195	0.195	0.203	0.013	0.013	0.009	0.195	0.195					
MH7-KK	0.193	0.193	0.007	0.193	0.196	0.193	0.197	0.193	0.195	0.193	0.193	0.197	0.007	0.007	0.000	0.193	0.193	0.009				
MH8-KK	0.191	0.191	0.007	0.191	0.198	0.191	0.200	0.191	0.193	0.191	0.191	0.200	0.007	0.007	0.006	0.191	0.191	0.012	0.006			
MH10-KK	0.187	0.187	0.009	0.187	0.194	0.187	0.196	0.187	0.190	0.187	0.187	0.196	0.009	0.009	0.007	0.187	0.187	0.010	0.007	0.007	—	

หมายเหตุ MF-CU = *M. fissipes* จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, MF-KK = *M. fissipes* จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว, MH-TP = *M. heymonsi* จากอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ, MH-KK = *M. heymonsi* จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว

ตารางที่ 5 แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของ *M. fissipes* ในแต่ละพื้นที่ที่เก็บ ตัวอย่าง ตัวอักษรย่อที่ใช้ในตาราง: N = จำนวนตัวอย่าง; M = จำนวนของ mutation; h = จำนวนของ haplotype; hd = haplotype diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $\pm$  S.D) และ  $\pi$  = nucleotide diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $\pm$  S.D)

สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	<i>M. fissipes</i>				
	N	M	h	hd $\pm$ S.D.	$\pi \pm$ S.D.
CU	7	0	1	0	0
KK	5	132	5	1.000 $\pm$ 0.126	0.08612 $\pm$ 0.03601

ตารางที่ 6 แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของ *M. heymonsi* ในแต่ละพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง

สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	<i>M. heymonsi</i>				
	N	M	h	hd $\pm$ S.D.	$\pi \pm$ S.D.
TP	2	0	1	0	0
KK	7	14	5	0.905 $\pm$ 0.103	0.00774 $\pm$ 0.00127

#### หมายเหตุ

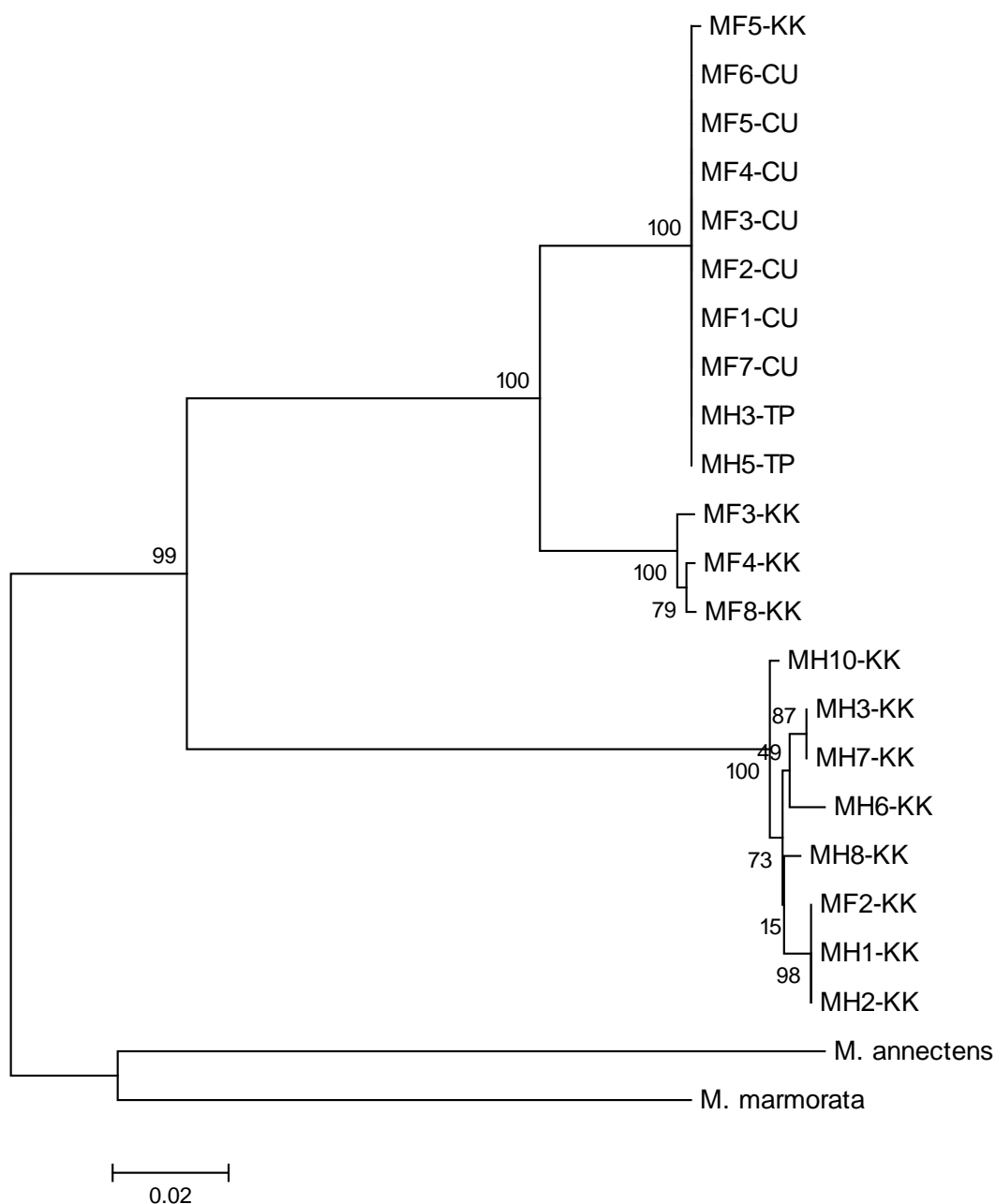
haplotype diversity (hd) หมายถึง จำนวนและความถี่ของ haplotype ที่แตกต่างกันที่พบในตัวอย่าง คำนวณจาก  $hd = (1 - \sum x_i^2) / (n - 1)$  (Nei and Tajima, 1981) เมื่อ  $x_i$  คือ ความถี่ของ haplotype และ  $n$  คือ จำนวนตัวอย่าง

nucleotide diversity ( $\pi$ ) หมายถึง ค่าเฉลี่ยของจำนวน nucleotide ที่แตกต่างกันต่อ 1 ตำแหน่ง เทียบกับ sequence อื่นแบบสุ่ม คำนวณจาก  $\pi = n / (n - 1) \sum x_{ij} \pi_{ij}$  (Nei 1987, equation 10.5)

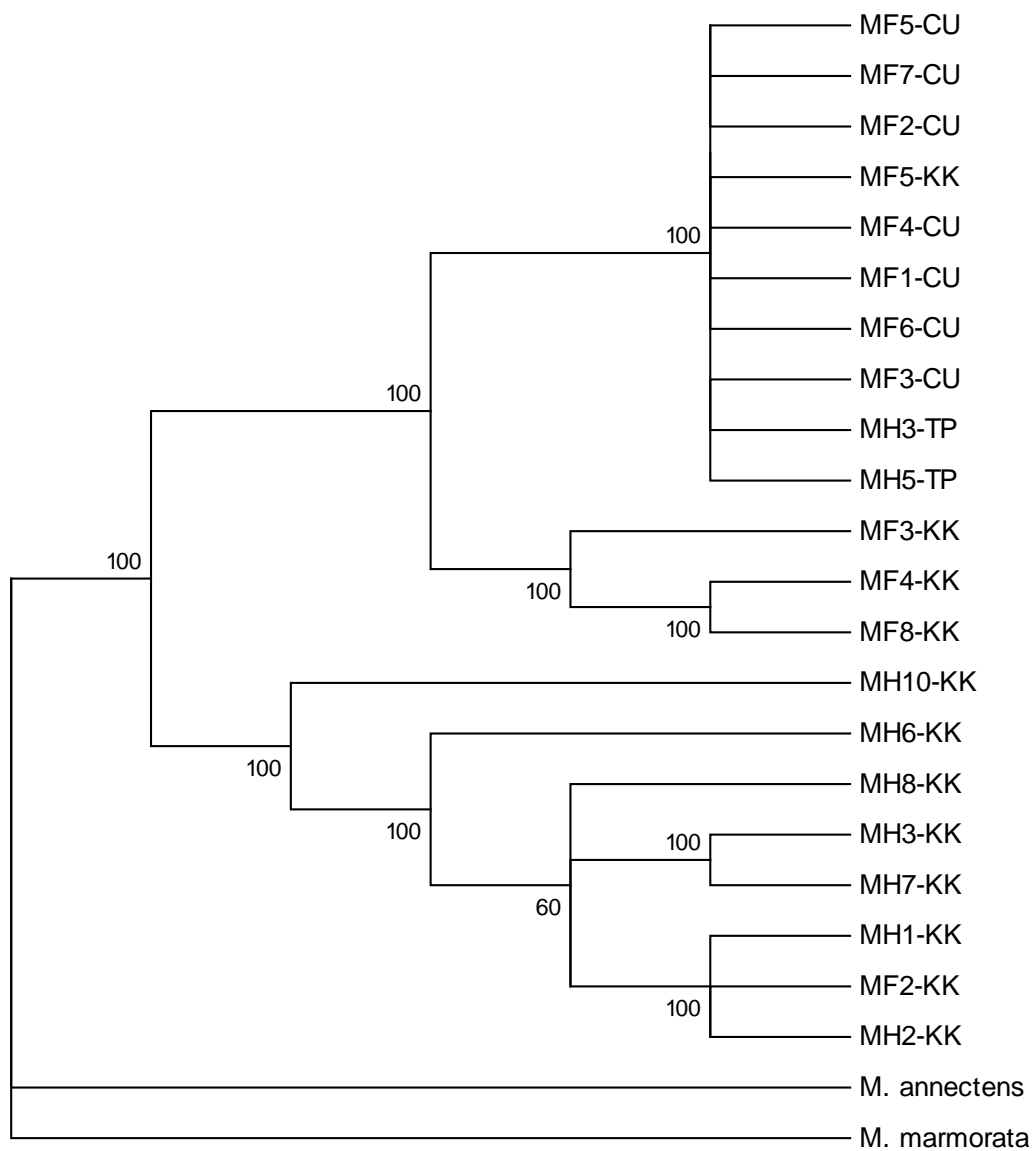
หรือ  $\pi = \sum x_{ij} / nc$  (Nei 1987, equation 10.6) เมื่อ  $n$  คือ จำนวนของ sequence ที่ทำการวิเคราะห์ผล,  $x_i$  คือ ความถี่ของรูปแบบ  $i$ th ใน sequence ของดีเอ็นเอตัวอย่าง และ  $nc$  คือ จำนวนของ sequence ทั้งหมดที่ทำการเปรียบเทียบ

### 3. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำ

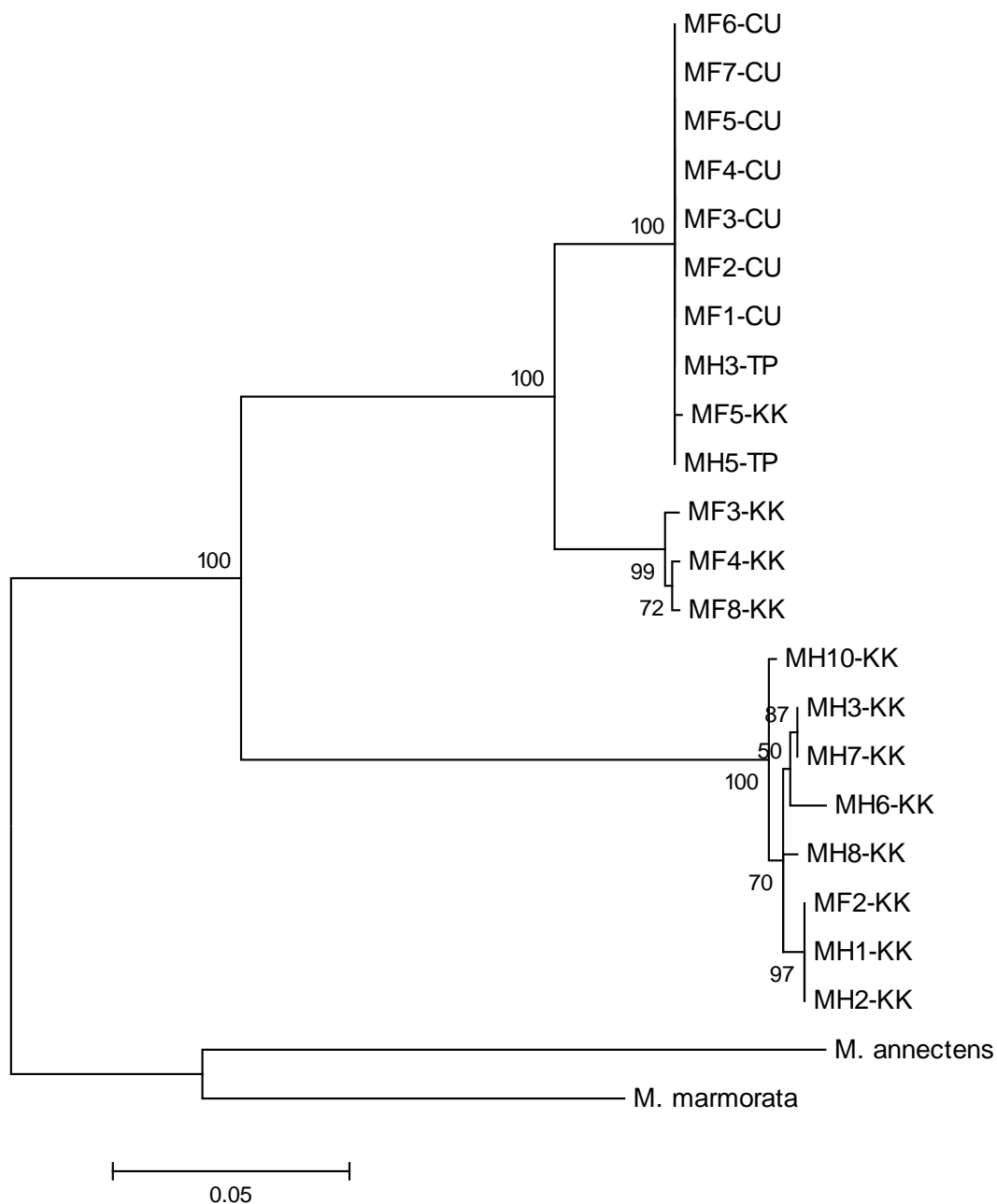
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ระหว่างอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำ จากลำดับเบสที่มีความยาว 678 bp พบว่าแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สร้างโดยวิธี Neighbor-joining, Maximum parsimony และ Maximum Likelihood ให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกัน กล่าวคือ พบว่าประชากรของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำส่วนใหญ่แบ่งออกเป็น 2 clade ใหญ่ๆ ด้วยกัน ด้วยค่า bootstrap probability ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 90% โดย clade ที่หนึ่งประกอบด้วยประชากรของอึ่งน้ำเต้าทั้งหมด (ยกเว้น MH3-TP และ MH5-TP) ส่วน clade ที่สองประกอบด้วยประชากรของอึ่งข้างดำจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวทั้งหมด (ยกเว้น MF2-KK) แสดงว่าอึ่งทั้งสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group นอกจากนี้ยังพบว่าอึ่งน้ำเต้าบางตัว คือ MF2-KK ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกับอึ่งข้างดำ และในขณะเดียวกัน ก็พบว่าอึ่งข้างดำบางตัว คือ MH3-TP และ MH5-TP จัดอยู่ clade เดียวกันกับอึ่งน้ำเต้าอีกด้วย



รูปที่ 11 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำ (Phylogenetic tree) ที่สร้างโดยวิธี Neighbor-joining โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *M. annectens* และ *M. marmorata* เป็น outgroup โดยตัวย่อแสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 12 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำ (Phylogenetic tree) ที่สร้างโดยวิธี Maximum parsimony โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิ แสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *M. annectens* และ *M. marmorata* เป็น outgroup โดยตัวย่อแสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 13 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอิงน้ำเต้าและอิงข้างดำ (Phylogenetic tree) ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood method โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *M. annectens* และ *M. marmorata* เป็น outgroup โดยตัวย่อแสดงสถานที่เก็บตัวอย่าง แสดงในตารางที่ 1

## สรุปและวิจารณ์ผล

จากการเพิ่มจำนวนยีน COI ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของอึ่งลายเลอะทั้งหมดและตรวจสอบผลผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้แล้วไม่เห็นแถบของผลผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ อาจเป็นเพราะว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของอึ่งลายเลอะมีการขาดเป็นท่อนๆ ซึ่งตำแหน่งที่เกิดการขาดเป็นท่อนอาจเป็นตำแหน่งที่อยู่ในบริเวณของยีน COI ที่ต้องการศึกษาจึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน COI ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้สำเร็จ ในขณะที่จีโนมิกดีเอ็นเอของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน ไม่มีการขาดเป็นท่อน ยีน COI จึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์จึงสามารถเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้สำเร็จ

ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย ได้แก่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, อุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ และ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จำนวนทั้งหมด 21 ตัวอย่าง พบว่ามีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 678 bp มีค่า Genetic distance ระหว่างประชากรอยู่ระหว่าง 0.000-0.202 และมีความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) จำนวน 138 (20.35%) ตำแหน่ง แสดงว่าประชากรของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน COI ค่อนข้างสูง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้กับงานวิจัยของ Meijden และคณะ ในปี 2007 (Meijden et al., 2007) ที่ใช้ยีน COI ในการศึกษา molecular phylogeny ของอึ่งวงศ์ Microhylidae จำนวน 34 สปีชีส์ (รวมทั้งอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ) โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 573 คู่เบส ระหว่างอึ่งทั้ง 34 สปีชีส์ พบว่ามีตำแหน่งที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมถึง 267 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน COI ในอึ่งวงศ์ Microhylidae มีความแปรผันทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งหนึ่งที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมมากถึง 138 ตำแหน่ง ดังนั้นอาจสรุปได้ว่ายีน COI มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของอึ่งทั้งสองชนิด (species-specific marker) ได้ แต่เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ประสบความสำเร็จในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของอึ่งลายเลอะได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่ายีน COI จะเหมาะสมใช้เป็น mtDNA species-specific marker ของอึ่งลายเลอะได้หรือไม่

นอกจากนี้ผลการศึกษาที่ได้ยังพบว่า โดยเฉลี่ย ค่า haplotype diversity (hd) และค่า nucleotide diversity ( $\pi$ ) ของประชากรของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำมีค่าค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ย  $hd = 0.810 \pm 0.080$  และ  $\pi = 0.09202 \pm 0.00887$  และจากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สร้างโดยวิธี Neighbor-joining, Maximum parsimony และ Maximum Likelihood ยังแสดงให้เห็นว่าอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group แยกออกเป็น 2 clade ชัดเจน การที่พบว่าอึ่งน้ำเต้า MF2-KK จัดอยู่ใน clade เดียวกับอึ่งข้างดำ และอึ่งข้างดำ MH3-TP และ MH5-TP จัดอยู่ใน clade เดียวกันกับอึ่งน้ำเต้าก็แสดงว่าเกิด gene flow ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) ระหว่างประชากรของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำ หรืออาจกล่าวได้ว่าอึ่งทั้ง 3 ตัวอย่างที่เก็บมานั้นเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำในอดีต เนื่องจากบริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและบริเวณอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิที่เก็บตัวอย่างมานั้นเป็นบริเวณที่สามารถพบอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำได้ง่าย และเป็นพื้นที่ที่พบว่าอึ่งทั้งสองชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่อึ่งทั้ง 3 ตัวดังกล่าวจะเป็นลูกผสมของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำ โดยการเกิด gene flow ของ mtDNA ที่ตรวจพบได้ในครั้งนี้พบได้ทั้งสองทิศทาง กล่าวคือ (1) mtDNA จากประชากรของอึ่งน้ำเต้า introgress สู่มวลประชากรของอึ่งข้างดำ และ (2) mtDNA จากประชากรของอึ่งข้างดำ introgress สู่มวลประชากรของอึ่งน้ำเต้า

แสดงว่าการเกิดการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำในธรรมชาติในอดีตนั้น สามารถเกิดขึ้นได้ประสบความสำเร็จทั้งสองทิศทาง โดยเพศเมียของอึ่งทั้งสองชนิดน่าจะสามารถให้กำเนิดลูกผสมได้สำเร็จนั่นเอง การตรวจพบ gene flow ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก โดยใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุล และ mtDNA marker ในการตรวจสอบนั้น เคยมีรายงานพบใน The European water frog ระหว่าง *Rana ridibunda* และ *R. lessonae* (Spolsky and Uzzell, 1984) ใน canyon treefrogs ระหว่าง *Hyla arenicolor* และ *H. wrightorum* (Klymus et al., 2010) ใน green pond frogs ระหว่าง *Pelophylax nigromaculatus* และ *P. plancyi* (Liu et al., 2010) เป็นต้น

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำในธรรมชาติ แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวนน้อยเกินไปที่จะทำการสรุปผลให้น่าเชื่อถือได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำในธรรมชาติให้ชัดเจนยิ่งขึ้น จึงควรทำการเก็บตัวอย่างอึ่งทั้งสองชนิดให้มากกว่านี้ และควรเพิ่มจำนวนพื้นที่ที่ศึกษาให้ครอบคลุมมากกว่านี้ โดยควรทำการเก็บตัวอย่างทั้งจากพื้นที่ที่พบอึ่งเพียงชนิดเดียว (allopatry) และพื้นที่ที่พบอึ่งทั้งสองชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน (sympatry) และควรทำการศึกษานิวเคลียร์ดีเอ็นเอควบคู่กันไปด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- Alves, P. C., Melo-Ferreira J., Freitas H., & Boursot, P. 2008. The ubiquitous mountain hare mitochondria: multiple introgressive hybridization in hares, genus *Lepus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 363: 2831–2839.
- Arnold, M. L. 1997. *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, UK.
- Arnold, M. L. 2006. *Evolution through genetic exchange*. Oxford University Press, NY.
- Bachtrog, D., Thornton, K., Clark, A. & Andolfatto, P. 2006. Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. *Evolution*. 60: 292–302.
- Barton, N. H. & Hewitt G. M., 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 16: 113-148.
- Bozikova, E., Munclinger, P., Teeter, K. C., Tucker, P. K., Macholan, M. & Pialek, J. 2005. Mitochondrial DNA in the hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*: a comparison of two transects. *Biological Journal of the Linnean Society*. 84: 363-378.
- Coyne, J. A. & Orr, H. A. 2004. *Speciation*. Sinauer, MA.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, R., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 5: 294-299.
- Futuyma, D. 1997. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Massachusetts, USA.
- Huxel, G. R. 1999. Rapid displacement of native species by invasive species: effect of hybridization. *Biological Conservation*. 89: 143-152.
- Klymus, K. E., Humfeld, S. C., Marshall, V. T., Cannatella, D. & Gerhardt, H. C. 2010. Molecular patterns of differentiation in canyon treefrogs (*Hyla arenicolor*): evidence for introgressive hybridization with the Arizona treefrog (*H. wrightorum*) and correlations with advertisement call differences. *Journal of Evolutionary Biology*. 23: 1425–1435.
- Kubota, K & Sota, T. 1998. Hybridization and speciation in the carabid beetles of the subgenus *Ohomopterus* (Coleoptera, Carabidae, genus *Carabus*). *Population Ecology*. 40: 213-222.
- Levitan, D. R. 2002. The relationship between conspecific fertilization success and reproductive isolation among three congeneric sea urchins. *Evolution*. 56: 1599-1609.
- Liu, K., Wang, F., Chen, W., Tu, L., Min, M., Bi, K. and Fu, J. 2010. Rampant historical mitochondrial genome introgression between two species of green pond frogs, *Pelophylax nigromaculatus* and *P. plancyi*. *BMC Evolutionary Biology*. 10.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*. 20: 229-237.

- Matsui, M., Hamidy, A., Belabut, D. M., Ahmed, N., Panha, S., Sudin, A., Khonsue, W., Oh, H., Yong, H., Jiang, J. & Nishikawa, K. 2011. Systemetic relationships of Oriental tiny frogs of the family Microhylidae (Amphibia, Anura) as revealed by mtDNA genealogy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 61: 167-176.
- Meijden, A., Vences, M., Hoegg, S., Boistel, R., Channing, A. & Meyer, A. 2007. Nuclear gene phylogeny of narrow-mouthed toads (Family: Microhylidae) and a discussion of completing hypotheses concerning their biogeographical origins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44: 1017-1030.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Nei, M. & Tajima, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- Palumbi, S. R. & Metz, E. C. 1991. Strong reproductive isolation between closely related tropical sea urchins (genus *Echinometra*). *Molecular Biology and Evolution*. 8: 227-239.
- Plotner, J., Uzzell, T., Beerli, P., Spolsky, C., Ohst, T., Litvinchuk, S. N., Guex, G. -D., Reyer, H.-U. & Hotz, H. 2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaearctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology*. 21: 668-681.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Spolsky, C. & Uzzell, T. 1984. Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81: 5802-5805.
- Sumida, M., Konda, Y., Kanamori, Y. & Nishioka, M. 2002. Inter- and intraspecific evolutionary relationship of the rice frog *Rana limnocharis* and the allied species *R. cancrivora* inferred from crossing experiments and mitochondrial DNA sequences of the 12S and 16S rRNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 25: 293-305.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment though sequence weight, positive-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleotide Acid Research*. 22: 4673-4680.
- Wells, K. D. 1977. The social behavior of anuran amphibians. *Animal Behavior*. 25: 666-693.
- Wilson, C. C. & Bernatchez, L. 1998. The ghost of hybrids past: fixation of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in an introgressed population of lake trout (*S. namaycush*). *Molecular Ecology*. 7: 127-132.

ฉัญญา จันอาจ. 2546. คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย. 5000. 1. กรุงเทพมหานคร : บริษัทด้านสุทธการพิมพ์ จำกัด.

วิเชษฐ คนชื้อ, อนุสรณ์ ปานสุข, สุทธิณี เหลลาแตว, พัชร ดนัยสวัสดิ์, ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ, ธงชัย จิตติภูรี, รชตะ มณีอินทร์, ผุสดี ปริยานนท์, และ สมชาย เสนศร. 2554. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในหมู่เกาะทะเลไทย. 1000. 1. บริษัท สิริบุตรการพิมพ์ จำกัด.

## ประวัติคณะวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ไทย) ดร. อัมพร วิเวกแวว  
(อังกฤษ) Amporn Wiwegweaw, Ph.D.  
ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์ ดร. ระดับ A-5  
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กทม 10330  
โทรศัพท์ 02-218-7536  
โทรศัพท์มือถือ 087-676-9563  
โทรสาร 02-218-5386  
E-mail: ampornwiwegweaw@yahoo.com

### ประวัติการศึกษา

- 2538-2542 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
2542-2546 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)  
มหาวิทยาลัยมหิดล  
2548-2552 Bioscience and Food Production Science, Shinshu University,  
Nagano, Japan

### สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาชีววิทยาโมเลกุล วิวัฒนาการ และ Molecular Phylogenetics

### ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

- 2554-2555 รูปแบบการกระจายตัวของอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในประเทศไทยและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมพันธุ์ข้ามกันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในธรรมชาติ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย  
2553-2554 Phylogeography of mitochondrial DNA introgression in snails เป็นวิจัยร่วมกับ  
Prof. Dr. Takahiro Asami, Shinshu University, Nagano, Japan

### ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Wiwegweaw, A., Udomkit, A. and Panyim, S. 2004. Molecular structure and organization of crustacean hyperglycemic hormone genes of *Penaeus monodon*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 37 (2):177-184.
2. Seki, K., Wiwegweaw, A. and Asami, T. 2008. Fluorescent pigment distinguishes sibling species of snails. Zoological Science 25 (12): 1212-1219.
3. Wiwegweaw, A., Seki, K., Mori, H. and Asami, T. 2009. Asymmetric reproductive isolation during simultaneous reciprocal mating in pulmonates. Biology Letter 5 (2): 240-243.

4. Wiwegweaw, A., Seki, K., Utsuno, H. and Asami, T. 2009. Fitness consequences of reciprocally asymmetric hybridization between simultaneous hermaphrodites. *Zoological Science* 26(3):191-196.
5. Wiwegweaw, A. and Meckvichai, W. 2011. Genetic variation of captive green peafowl *Pavo muticus* in Thailand based on D-loop sequences. *International Journal of Galliformes Conservation* 2: 38 – 42.

#### งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน

1. รูปแบบการกระจายตัวของอีงน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อีงข้างดำ (*M. heymonsi*) และอีงลายเลอะ (*M. butleri*) ในประเทศไทยและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมพันธุ์ข้ามกันระหว่างอีงทั้งสามชนิดในธรรมชาติ (ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช) สถานภาพงานวิจัย 40%

2. ชื่อ-นามสกุล (ไทย) ดร.วิชชุ์ คนชื่อ  
(อังกฤษ) Wichase Khonsue, Ph.D.
- ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
- หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กทม 10330  
โทรศัพท์ 02-218-5258  
โทรศัพท์มือถือ 081-456-4113  
โทรสาร 02-218-5256  
E-mail: Wichase.k@chula.ac.th

#### ประวัติการศึกษา

- 2533-2536 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2536-2539 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2541-2544 Human and Environmental Studies Kyoto University, Kyoto, Japan

#### สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขานิวเคลียสวิทยาและอนุกรมวิธานสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

#### ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

- 2551-2553 ความหลากหลายของชนิดและการใช้พื้นที่ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณเทือกเขาหินปูน จังหวัดสระบุรีและลพบุรี เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย
- 2553-2554 โครงการวิจัยข้อมูลเบื้องต้นของสัตว์มีกระดูกสันหลัง บริเวณพื้นที่เกาะทะลุ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย
- 2553-2554 โครงการวิจัยการสำรวจเบื้องต้น microhabitat ของค้างคาวคุณกิตติ

#### ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

- Othman, MS, Khonsue, W, Kitana, J, Thirakhupt, K, Robson, MG and Kitana, N. 2011. Reproductive mode of *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae) caught from Mae Sot, Thailand based on its gonadosomatic indices. Asian Herpetological Research 2(1): 41-45. แหล่งทุน National Center of Excellence in Environmental and Hazardous Waste Management และ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Danaisawat, P. A. Pradatsundarasan, and W. Khonsue. 2010. Morphological character of some tadpole from Khao Sip Ha Chan Proposed National Park, 18 Chantaburi Province. Journal of Wildlife in Thailand. 17: 64-103. in Thai แหล่งทุนโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
- Khonsue, W., T. Chaiananporn, and P. Pomchot. 2010. Skeletochronological

- assessment of age in the Himalayan Crocodile newt, *Tylototriton verrucosus* (Anderson, 1871) from Thailand. *Tropical Natural History* 10 (2): 181-188. แหล่งทุน  
โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยและทุน  
90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. Phochayavanich, R., Voris, H.K., Khonsue, W., Thunhikorn, S. and Thirakhupt, K. 2010. Comparison of stream frog assemblages at three elevations in an evergreenforest, North-Central Thailand. *Zoological Studies* 49(5): 632-639. ทุน 90 ปี  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
  5. Suttinee, Lhaoteaw, Chatchawan Chaisuekul and Wichase Khonsue. 2010. Feeding  
cology og Big-headed frog, *Limnonectes macrongathus* (Boulenger, 1917), in  
naturalforest, Nan Province. 36th Congress on Science and Technology of Thailand  
26-28 October, 2010 . Bangkok, Thailand. P. 1-6. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และ  
ศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
  6. Patchara Danaisawat, Art-ong Pradatsundarasan and Wichase Khonsue. 2009.  
Habitat selection and relationships between annual occurrence of amphibians and  
climatic factors at Khao Sip Ha ChanNational Reserve Forest, Chantaburi province.  
Abstract 13th BRT Annual Conference, Chiang Mai. p. 142. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์  
ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
  7. Pataradawn Pinyopich, Worrapong Kit-anan, Sirirat Rengpipat and Wichase Khonsue. 2009.  
Molecular cloning of antimicrobial peptide genes from the tree frog, *Rhacophorus*  
*feae*. Abstract 13th BRT Annual Conference, Chiang Mai. p. 139. แหล่งทุนโครงการพัฒนา  
องค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
  8. Kan Nitiroj and Wichase Khonsue. 2009. Vertical distribution and diets of the  
Median-striped bullfrog, *Kaloula mediolineata* (Smith, 1917), in San Ngao district,  
Tak Province. Abstract 13th BRT Annual Conference, Chiang Mai. p. 136. แหล่งทุน  
โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
  9. Anusorn Pansook, Wichase Khonsue, Sanit Piyapatanakorn and Putsatee Pariyanont. 2009.  
Genetic diversity of the rice field frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiengmann, 1853),  
in natural habitats in Thailand by mitochondrial DNA (16SrRNA and cytochrome-b  
sequences). Abstract 13th BRT Annual Conference, Chiang Mai. p. 135. แหล่งทุน  
โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
  10. Othman, MS, Khonsue, W, Kitana, J, Thirakhupt, K, Robson, MG and Kitana, N. 2009.  
Hepatic biomarker responses in the frog, *Fejervarya limnocharis*, naturally exposed  
to environmental stress from cadmium contamination. Abstract, 16<sup>th</sup> International  
Congress of Comparative Endocrinology, Hong Kong S.A.R., China (P69). 19 แหล่งทุน

National Center of Excellence in Environmental and Hazardous Waste Management  
และ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. วิเชษฐ วนิช. 2008. 2008 ปีแห่งการอนุรักษ์กับ 2008 ปีแห่งการอนุรักษ์: วิกฤติการสูญพันธุ์และ  
บัญชีแดง. การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 12. 10-13 ตุลาคม 2551 โรงแรมได  
มอนด์พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการ  
จัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

#### งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน

1. ความหลากหลายของชนิดและการใช้พื้นที่ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณเทือกเขาหินปูน  
จังหวัดสระบุรีและลพบุรี แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการ  
ทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย(โครงการ BRT R352042) สถานภาพงานวิจัย 90%
2. โครงการวิจัยข้อมูลเบื้องต้นของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง บริเวณพื้นที่เกาะ  
ทะเล แหล่งทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2554 สถานภาพงานวิจัย 80%
3. โครงการวิจัยการสำรวจเบื้องต้น microhabitat ของค้างคาวคุณกิตติ แหล่งทุนงบประมาณ  
แผ่นดินปี 2554 สถานภาพงานวิจัย 70%