

# รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย พ-ท(ด) 28.56

ความผันแปรของเสียงร้องและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปาดจีวสกุล *Chiromantis* ใน  
ประเทศไทยเพื่อการประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์ประชากร

โดย

อ.ดร. อัญชลี เอาผล

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## Abstract

Among Indochinese *Chiromantis* species, the validity of *Chiromantis hansenae* has been questioned by some who consider it a junior synonym of *C. vittatus*. Three lines of evidence to elucidate the taxonomic status and phylogenetic relationships of four congeneric species of *Chiromantis* frogs from Thailand were employed. Results of molecular, morphological, and bioacoustic data analyses support four evolutionarily distinct and monophyletic clades: *C. doriae*, *C. nongkhorensis*, *C. vittatus* and *C. hansenae*. Genetic divergence between *C. vittatus* and *C. hansenae* is >10%, significantly greater than *C. doriae* and *C. nongkhorensis* (4.5%). The results support the taxonomic validity of *C. hansenae* and suggest that there may be more diversity within *C. hansenae* and *C. vittatus* than is currently recognized.

The Southeast Asian tree frog, *Chiromantis hansenae* has been reported to possess a geographic range that is restricted to Thailand and, presumably, Cambodia. The phylogenetic relationships among *C. hansenae* populations were investigated using partial sequences of the mitochondrial 16S rRNA gene. The results reveal two distinct evolutionary lineages within *C. hansenae* populations in Thailand. The genetic divergence among populations between these two clades is considerable, and results support inter-population divergence, and high genetic differentiation (pairwise  $F_{ST} = 0.97$ ), between two localities sampled in western Thailand (TK1 and TK2), separated from each other by 40 kilometers only. The results suggest that landscape features across Thailand may have a profound impact on patterns of diversification in the country, underscoring the urgent need for fine-scale investigations of genetic structure of endemic and “widespread” species.

**Key words:** Advertisement call, *Chiromantis*, Morphometrics, mtDNA, Thailand

## บทคัดย่อ

ปาดจิวศรีราชา *Chiromantis hansenae* เป็นหนึ่งในปาดจิวสกุล *Chiromantis* ที่มีการแพร่กระจายในเขตอินโดจีนและมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าอาจเป็น junior synonym กับปาดจิวพม่า *C. vittatus* ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสถานภาพทางอนุกรมวิธานของปาดจิวสกุล *Chiromantis* ที่พบในประเทศไทยโดยใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา เสียงร้องและข้อมูลซีวโมเลกุล ผลการศึกษาจากข้อมูลซีวโมเลกุลพบว่า *C. doriae*, *C. nongkhorensis*, *C. vittatus* และ *C. hansenae* มีความสัมพันธ์แบบ monophyletic และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *C. hansenae* และ *C. vittatus* >10%ซึ่งมีความแตกต่างมากกว่าระหว่าง *C. doriae* และ *C. nongkhorensis* คือมีค่า 4.5% ดังนั้นความแตกต่างทางพันธุกรรม สัณฐานวิทยาและเสียงร้องแสดงให้เห็นว่าสถานภาพทางอนุกรมวิธานของปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* ไม่ใช่ synonym ของ *C. vittatus* และยังคงใช้ชื่อปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* ต่อไป

ปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* มีรายงานการแพร่กระจายเฉพาะในประเทศไทยแต่อาจมีแพร่กระจายไปถึงกัมพูชา โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างปาดจิวศรีราชาเพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในประเทศไทยจากข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ผลจากการศึกษาพบว่าประชากรปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* ในประเทศไทยแบ่งออกเป็นสองสายวิวัฒนาการและยังพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในภาคตะวันตกคือ TK1 และ TK2 มีค่าค่อนข้างสูง ( $F_{st} = 0.97$ ) ทั้งที่มีระยะทางห่างกันเพียง 40 กิโลเมตร ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากลักษณะทางธรณีวิทยาของประเทศไทยที่เป็นปัจจัยจำกัดการแลกเปลี่ยนยีนระหว่างประชากรซึ่งควรมีการศึกษาต่อไปโดยเฉพาะการศึกษาในชนิดพันธุ์สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้าง

**คำสำคัญ:** เสียงร้อง, *Chiromantis*, มอร์โฟเมตริกส์, mtDNA, ประเทศไทย

## บทที่ 1

### บทนำ

ประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงทั้งชนิดพันธุ์ พันธุกรรมและระบบนิเวศทั้งนี้ เนื่องจากตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อนชื้นที่เหมาะสมกับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งมีความหลากหลายในกลุ่มสัตว์โดยเฉพาะสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่เป็นกลุ่มที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมของโลก เนื่องจากลักษณะการดำรงชีวิตที่มีลักษณะจำเพาะทั้งบนบกและในน้ำจนปัจจุบันมีรายงานการลดลงของประชากรจนถึงการสูญพันธุ์ของสัตว์กลุ่มนี้แล้วทั่วโลกโดยมีสาเหตุหลายประการเช่น การถูกทำลายแหล่งที่อยู่อาศัย ความผันแปรของสภาพอากาศในโลก โรคอุบัติใหม่ต่างๆ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับในระหว่างกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกพบว่า Order Anura มีความหลากหลายของชนิด รูปร่างและสีส้มมากกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งในแต่ละวงศ์ (family) มีลักษณะจำเพาะทั้งรูปร่าง พฤติกรรมและถิ่นที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกันเช่น Family Rhacophoridae ที่สมาชิกมีขนาดร่างกายตั้งแต่ขนาดค่อนข้างใหญ่จนถึงขนาดเล็กมากและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญเช่น ขาที่ยาวและแผ่นนิ้วเท้าที่ขยายสำหรับช่วยเกาะ ดังนั้นการดำรงชีวิตบนบกส่วนใหญ่จึงอยู่บนต้นไม้ที่ใกล้แหล่งน้ำรวมไปถึงการสืบพันธุ์และวางไข่ ซึ่งประเทศไทยมีสมาชิกในวงศ์นี้จำนวน 35 ชนิด (Frost 2013)

ปาดจิวสกุล *Chiromantis* เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์ Rhacophoridae ซึ่งในประเทศไทยมีรายงานพบ 4 ชนิด ได้แก่ *C. doriae*, *C. hansenae*, *C. nongkhorensis* และ *C. vittatus* (ัญญา จันอาจ 2546; Taylor, 1962; Nabhitabhata and Chan-ard, 2005) และยังเป็นไปได้ที่จะมีการพบชนิดเพิ่มเติมในประเทศไทย เช่น *C. samkosensis* ซึ่งถูกรายงานเป็นชนิดใหม่ในแถบพื้นที่ของเทือกเขา Cardamom ในประเทศกัมพูชาที่ต่อกับเทือกเขาในจังหวัดจันทบุรี อย่างไรก็ตามสถานภาพทางอนุกรมวิธานของปาดจิวสกุล *Chiromantis* ยังมีความสับสนเนื่องลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความคล้ายคลึงกันรวมทั้งมีขนาดร่างกายที่เล็กมากเมื่อเทียบกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าอาจมีชนิดพันธุ์ซ่อนเร้น (cryptic species) รวมอยู่ด้วย นอกจากนี้ Stuart and Emmett (2006) รายงานว่า *C. hansenae* อาจเป็น junior synonym กับ *C. vittatus* ซึ่งทำให้ยังต้องมีการศึกษาทางอนุกรมวิธานเพิ่มเติมโดยการใช้ข้อมูลอื่นๆร่วมด้วย เช่น เสียงร้อง พันธุกรรม ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อเข้าใจถึงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของปาดจิวในสกุล *Chiromantis* ในประเทศไทย โดยใช้ข้อมูลร่วมกันในเรื่องของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความแตกต่างทางโมเลกุลและลักษณะเสียงร้อง

### วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรของเสียงร้องของปาดจีวสกุล *Chiromantis* ในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปาดจีวสกุล *Chiromantis* ในประเทศไทย โดยใช้วิธีมอร์โฟเมตริกส์
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างชนิดของปาดจีวสกุล *Chiromantis* ในประเทศไทย โดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม
4. เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรของปาดจีวศรียา *Chiromantis hansenae* ในประเทศไทย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปาดจิวในสกุล *Chiromantis* Peter, 1854 มีรายงานพบ 15 ชนิด (Frost 2013) และแพร่กระจายกว้างตั้งแต่เขตร้อนของแอฟริกา ทางตอนใต้ของทะเลทรายซาฮารา ไปจนถึงทางตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Frost 2013) ลักษณะการแพร่กระจายดังกล่าวและแพร่กระจายแยกกันระหว่างเขตภูมิอากาศที่แตกต่าง รวมทั้งจากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล ทำให้เกิดคำถามสำคัญเกี่ยวกับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปาดจิวในสกุลนี้ (Wilkinson *et al.* 2002; Frost *et al.* 2006; Li *et al.* 2009; Wiens *et al.* 2009) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานพบปาดจิว 4 ชนิด (Taylor 1962, Chan-ard 2003) ได้แก่ ปาดจิวหลังขีด *Chiromantis doriae* (Boulenger, 1853), ปาดจิวศรียาชา *C. hansenae* (Cochran, 1927), ปาดจิวลายแต้ม *C. nongkhorensis* (Cochran, 1927) และปาดจิวพม่า *C. vittatus* (Boulenger, 1887) พบทั้งในพื้นที่ป่าธรรมชาติและพื้นที่ที่ไม่ใช่ป่าโดยพบตั้งแต่พื้นที่ราบต่ำไปจนถึงพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า 1000 เมตร

ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการแพร่กระจายของปาดจิวในประเทศไทยนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า ปาดจิวหลังขีดมีการแพร่กระจายเป็นหย่อมๆ ในพื้นที่ทางภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปาดจิวลายแต้มมีการแพร่กระจายกว้าง ครอบคลุมพื้นที่ทั้งภาคตะวันตก ภาคกลางและภาคใต้ฝั่งตะวันออก ปาดจิวพม่าพบในภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่) และภาคตะวันตก และปาดจิวศรียาชาพบในภาคตะวันออกเฉียงจนถึงภาคกลาง และมีรายงานพบที่จังหวัดเชียงใหม่ (Taylor 1962; ัญญา จันอาจ 2546); Nabhitabhata and Chan-ard 2005) จากรายงานของัญญา จันอาจ (2546) พบว่าปาดจิวพม่าและปาดจิวศรียาชานั้นมีพื้นที่อาศัยแยกกันในบริเวณภาคเหนือฝั่งตะวันตกและในพื้นที่ภาคตะวันออกอีกด้วย แต่มีรายงานการแพร่กระจายของปาดจิวพม่าในประเทศลาว กัมพูชาและเวียดนาม ทำให้เกิดคำถามว่า ปาดจิวพม่านั้นอาจมีการแพร่กระจายจากด้านตะวันออกไปตะวันตกหรือไม่ (Stuart & Emmett 2006; Grismer *et al.* 2008; Rowley & Srei 2010)

ปาดจิวสกุล *Chiromantis* พบอาศัยในที่ราบที่เป็นหญ้าสูงหรือต้นไม้สูงใกล้แหล่งน้ำโดยมีการสร้างโพมหรือรูเพื่อวางไข่ในช่วงต้นฤดูฝนซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาที่จำกัด นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้สำรวจเบื้องต้นพบพื้นที่ที่เป็น type locality ของ *C. nonhkhorensis* ในจังหวัดชลบุรี (Taylor, 1962) มีการเปลี่ยนแปลงสภาพแหล่งที่อยู่อาศัยไปจนทำให้ประชากรของปาดจิวชนิดนี้มีแนวโน้มลดลง ส่วนพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของปาดจิวมีในช่วงเวลาสั้นๆ ของต้นฤดูฝนและการมีพฤติกรรมการเลี้ยงดูเช่นใน *C. hansenae* จนกว่าตัวอ่อนจากไข่จะฟักเป็นลูกอ๊อด (Sheridan and Ocock, 2008) จึงเป็นสาเหตุส่วนหนึ่งที่ทำให้ปาดจิวเสี่ยงต่อการ

สูญพันธุ์ของประชากรในบางพื้นที่จากการถูกทำลายที่อยู่อาศัยจากกิจกรรมของมนุษย์หากไม่ได้รับการอนุรักษ์ถิ่นที่อยู่อาศัย

จากรายงานการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปาดจิ๋วในสกุล *Chiromantis* ร่วมกับสกุลอื่นๆ ของวงศ์ Rhacophoridae โดย Yu *et al.* (2009) ที่ศึกษาจากยีน 12S rRNA, 16S rRNA, cytochrome-*b* พบว่าสกุล *Chiromantis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Feihyla* และ *Polypedates* แต่ Li *et al.* (2009) ได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของวงศ์ Rhacophoridae โดยใช้นิวเคลียสยีน (ยีน brain-derived neurotrophic factor, proopiomelanocortin, recombination activating gene 1, tyrosinase, rhodopsin) และไมโทคอนเดรียลยีน (ยีน 12S rRNA, 16S rRNA, complete valine t-RNA) พบว่าตำแหน่งของ *C. vittatus* ยังไม่แน่ชัดและปาดจิ๋วสกุล *Chiromantis* ไม่เป็น monophyletic group อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยรวมสมาชิกอื่นๆในสกุล *Chiromantis* อื่นๆในประเทศไทยต่อไป

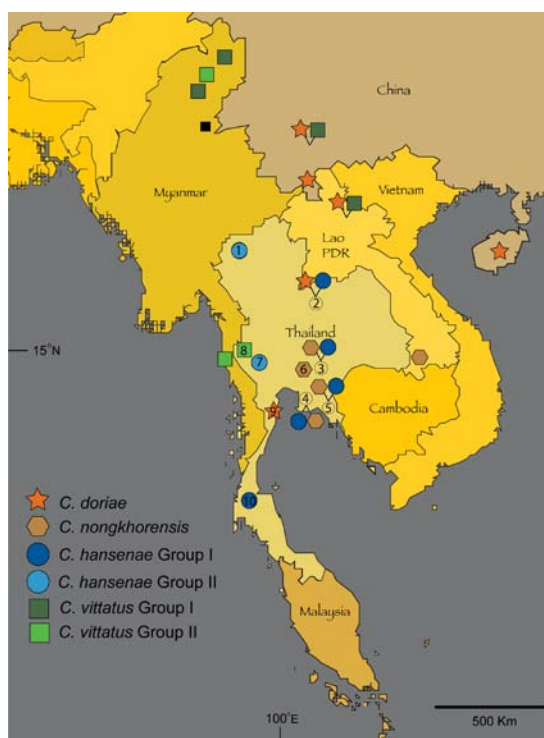
## บทที่ 3

### วิธีวิจัย

#### 3.1 ศึกษาสถานภาพทางอนุกรมวิธานของปลาฉลามปากค้อน *Chiromantis* ในประเทศไทย

##### 3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างปลาฉลามปากค้อน *Chiromantis doriae* (Boulenger, 1853), ปลาฉลามปากค้อน *C. hansenae* (Cochran, 1927), ปลาฉลามปากค้อน *C. nongkhorensis* (Cochran, 1927) และปลาฉลามปากค้อน *C. vittatus* (Boulenger, 1887) จากพื้นที่ 10 แห่งทั่วประเทศไทย (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1) โดยวิธีการ Opportunistic searching และการระบุตำแหน่งโดยฟังจากเสียงร้องของเพศผู้ และทำการเก็บเนื้อเยื่อตับหรือเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในเอทิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 95% โดยเก็บตัวอย่างปลาฉลามปากค้อนเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในฟอร์มาลินที่มีความเข้มข้น 10% จากนั้นเปลี่ยนไปเก็บไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70% ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดจะเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์สัตว์วิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ZMKU; ภาคผนวก 1) และในการศึกษาคั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างปลาฉลามปากค้อนจากประเทศพม่าที่เก็บรักษาไว้ที่ California Academy of Science มาร่วมในการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลด้วย (ภาคผนวก 1)



ภาพที่ 1 แสดงพื้นที่การเก็บตัวอย่าง จำนวน 10 พื้นที่ ดังหมายเลข 1-10 และพื้นที่ของตัวอย่างข้อมูลดีเอ็นเอจาก GenBank

ตารางที่ 1. พื้นที่ที่ของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ชนิด	พื้นที่	หมายเลขตามแผนที่	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด
<i>C. doriae</i>	ประจวบคีรีขันธ์	9	8	20
	เลย	2	12	
<i>C. nongkhorensis</i>	นครราชสีมา	3	22	57
	ชลบุรี	4	9	
	จันทบุรี	5	23	
	นครนายก	6	2	
	ทองผาภูมิ กาญจนบุรี	7	1	
<i>C. vittatus</i> Group II	สังขละบุรี กาญจนบุรี	8	8	8
<i>C. hansenae</i> Group I	นครราชสีมา	3	19	27
	เลย	2	1	
	ชลบุรี	4	4	
	สุราษฎร์ธานี	10	3	
<i>C. hansenae</i> Group II	แม่ฮ่องสอน	1	13	24
	ทองผาภูมิ กาญจนบุรี	7	9	

### 3.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ และการหาลำดับเบส

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ข้อมูลจากดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียในการวิเคราะห์ เนื่องจากมีรายงานการศึกษามาก่อนหน้านี้จำนวนมาก (Delorme 2004, Delorme *et al.* 2004, Faivovich *et al.* 2005, Li *et al.* 2008, Yu *et al.*, 2008, Li *et al.* 2009, Meegaskumbura *et al.* 2010, Kuraishi *et al.* 2011, Li *et al.* 2012) ถึงแม้ว่าการใช้ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ (เช่น Hertwig *et al.* 2004) แต่ก็เป็นที่ชัดเจนแล้วว่าดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียนั้นสามารถช่วยในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ (Vences *et al.* 2005a, b, Fouquet *et al.* 2007, Vieites *et al.* 2009)

ทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเนื้อเยื่อตับที่เก็บรักษาในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Dneasy kit (QIAGEN, Inc.) และทำการเพิ่มชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้ปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส (94 °C, 45 วินาที; 52 °C, 30 วินาที; 72 °C, 1 นาที) จำนวน 35 รอบ ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดคือ 16Sc และ 16Sd (Moriarty and Cannatella 2004) ซึ่งชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้นั้นจะนำไปทำให้บริสุทธิ์โดย

ใช้ชุด Qiagen PCR purification kit (QIAGEN, Inc.) จากนั้นนำไปหาลำดับเบส โดยลำดับเบสที่ได้จะถูกตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Geneious v. 5.6.3 (Biomatter, Ltd.) และนำข้อมูลลำดับเบสดังกล่าวแล้วไปเก็บไว้ที่ GenBank เพื่อใช้อ้างอิงต่อไป

### 3.1.3 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการครั้งนี้ได้รวมข้อมูลของลำดับเบสของปาดจิวจาก GenBank ได้แก่ *Chiromantis xerampelina* และ *C. rufensens* และข้อมูลลำดับเบสของปาดจิวชนิดเดียวกันจากพื้นที่อื่นๆ ได้แก่ ปาดจิวหลังขีด *C. doriae* ปาดจิวลายแต้ม *C. nongkhorensis* ปาดจิวพม่า *C. vittatus* และปาดจิวศรีราชา *C. hanseane* จากประเทศลาว จีน และเวียดนาม ส่วนกลุ่มของ outgroup ได้แก่ *Feihyla palpebralis*, ปาดตีนเหลือง *Rhacophorus bipunctatus*, ปาดเขียว *R. kio*, *Polypedates cruciger*, ปาดบ้าน *P. leucomystax*, *P. megacephalus* และ *Buergeria buergeri* เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ภาคผนวก 1) และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม MUSCLE (Edgar 2004) และโปรแกรม Se-AL Carbon version 2.0a11 (Rambaut 2002) คำนวณค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Uncorrected pair-wise distance) โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011) วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ Maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม RAxML-HPC Blackbox version 7.3.2 (Stamatakis 2006, Miller *et al.* 2010) และแบบ Bayesian inference โดยใช้โปรแกรม MrBayes version 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003)

### 3.1.4 การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา

วัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างปาดจิวที่เป็นตัวเต็มวัยด้วยเวอร์เนียร์เนยคาลิเปอร์แบบดิจิตอล Mitutoyo และกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ Olympus SZ40 ตามเอกสารอ้างอิงโดย Grismer *et al.* (2007) ดังนี้

- ความยาวจากปลายจมูกถึงช่องเปิดทวาร: Snout-Vent length (SVL)
- ความยาวหัว: Head length (HL)
- ความกว้างหัว: Head width (HW)
- ความกว้างของเปลือกตาบน: Width of upper eyelid (ELW)
- ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางตา: Eye diameter (ED)
- ระยะห่างระหว่างรูเปิดจมูก: Internarial distance (IND)
- ระยะห่างระหว่างตา: Interorbital distance (IOD)
- ความยาวจมูก: Snout length (SNL)
- ระยะจากช่องเปิดจมูกถึงตา: Distance from the nostril to the eye (DNE)
- ความกว้างของแผ่นหู: Tympanum diameter (TD)

- ความยาวรยางค์หน้า: Forelimb length (FLL)
- ความยาวเท้าหน้า Hand length (HLT)
- ความยาวกระดูกต้นขาหลัง: Thigh length (THL)
- ความยาวกระดูกหน้าแข้ง: Tibia length (TIL)
- ความยาวเท้าหลัง: Foot length (FL)
- ความกว้างแผ่นนิ้วที่ 3 ของตีนหน้า: Width of the disk of the third finger (3FDW)
- ความกว้างแผ่นนิ้วที่ 4 ของตีนหลัง: Width of the disk of the fourth toe (4TDW)

การระบุเพศพิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและอวัยวะสืบพันธุ์ภายใน โดยลักษณะของตัวเต็มวัยนั้นในเพศผู้จะมีอวัยวะที่เจริญพัฒนาและมีขนาดใหญ่ ส่วนเพศเมียมีการเจริญพัฒนาของท่อไข่และไข่ โดยจะศึกษามอร์โฟเมตริกส์เฉพาะในเพศผู้เต็มวัยเท่านั้น

### 3.1.5 การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยสถิติ

ทำการทดสอบความเป็นการกระจายแบบปกติของข้อมูลโดยใช้ Shapiro-Wilk's W-test ถ้าหากข้อมูลไม่เป็นการกระจายแบบปกติให้ทำการแปลงข้อมูลเป็นค่า log ก่อนนำไปวิเคราะห์ จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติแบบหลายตัวแปร ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความยาวจากปลายจมูกถึงช่องเปิดทวาร และสัดส่วนในแต่ละลักษณะต่อความยาวจากปลายจมูกถึงช่องเปิดทวารที่แสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์สำหรับปาดจิวแต่ละชนิด เปรียบเทียบข้อมูลความยาวจากปลายจมูกถึงช่องเปิดทวารของปาดจิวมาและปาดจิวศรีราชาโดยใช้การทดสอบแบบ Kruskal-Wallis test (Zar 1984)

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างกลุ่มปาดจิวโดยใช้ principal component analysis (PCA) วิเคราะห์ความน่าจะเป็นของความถูกต้องในการจัดจำแนกตัวอย่างโดยใช้ discriminant function analysis (DFA) ตามรูปแบบของ stepwise discriminant model นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะ เช่น รูปแบบของลายหลังและลักษณะของแผ่นหูนั้นมีการบันทึกข้อมูล แต่ไม่ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นด้วยโปรแกรม Stata (Release 12, StataCorp, College Station, TX, USA) และ XLStat-Pro (Addinsoft 2013)

### 3.1.6 การบันทึกเสียงร้อง

บันทึกเสียงร้องของปาดจิวในสกุล *Chiromantis* แต่ละชนิดในภาคสนามอย่างน้อยตัวละ 5 นาที โดยใช้ไมโครโฟน Røde NTG-2 แบบ shotgun microphone (44.1 kHz sampling rate and 24-bit encoding) ที่ต่อกับขาตั้งและเครื่องบันทึกเสียง R09 Edirol Recorder โดยวางห่างจากตัวปาดจิวประมาณ 30-50 เซนติเมตร พร้อมบันทึกอุณหภูมิของอากาศขณะที่บันทึกเสียง

### 3.1.7 การวิเคราะห์เสียงร้อง

วิเคราะห์ audiospectrograms และ oscillograms โดยใช้โปรแกรม Raven 1.4 Software (Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, NY, USA) คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเสียงร้องในปาดจิวแต่ละชนิด ความหลากหลายของลักษณะเสียงร้องในกลุ่มของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ศึกษาตามเอกสารอ้างอิงของ Cocroft and Ryan (1995) และ Meegaskumbura and Manamendra-Arachchi (2005) ลักษณะเสียงร้องที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 10 ลักษณะ ดังนี้

- ระยะเวลาของเสียงร้อง: Call duration (ms)
- จำนวนโน้ตต่อการร้องหนึ่งครั้ง: Notes/call
- ระยะเวลาของโน้ต: Note duration (ms)
- ระยะเวลาระหว่างโน้ต: Inter-note duration (ms)
- ความถี่ของโน้ต: Note rate (Note/s)
- จำนวนของพัลส์ต่อการร้องหนึ่งครั้ง: Number of pulse per call
- ระยะเวลาของพัลส์: Pulse length (ms)
- ระยะเวลาระหว่างพัลส์: Inter-pulse duration (ms)
- ความถี่ของพัลส์: Pulse rate per call (pulse/s)
- ความถี่เด่น: Dominant frequency (Hz)

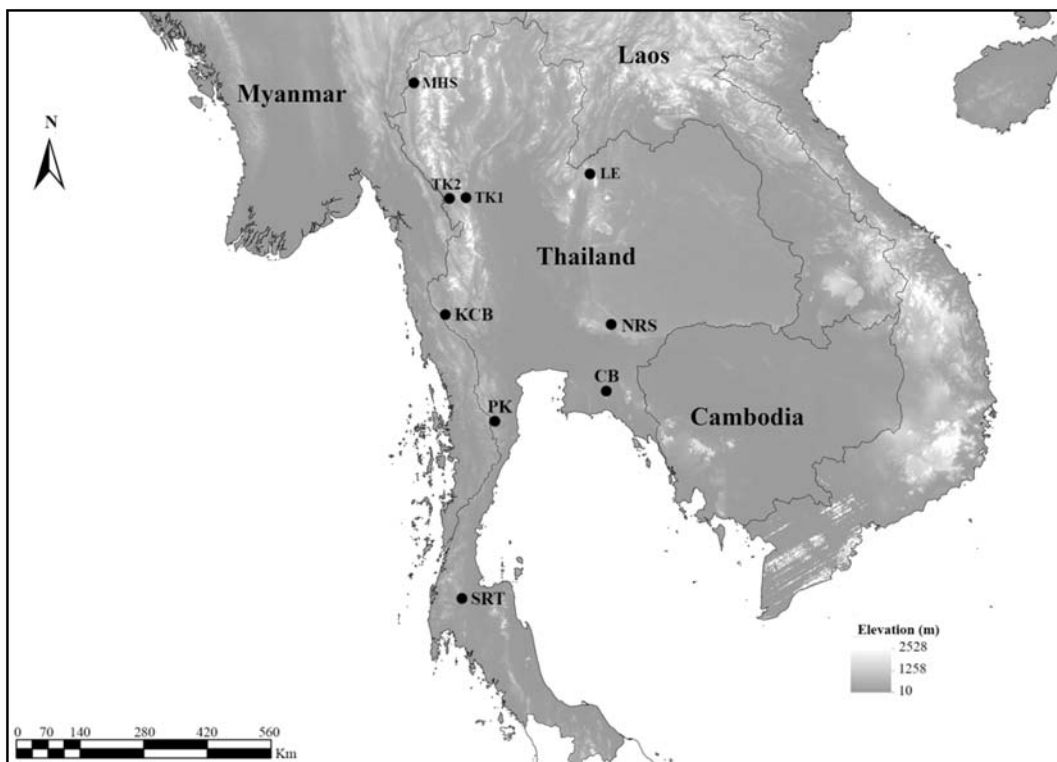
## 3.2 ศึกษาโครงสร้างประชากรของปาดจิวศรีราชา *Chiromantis hansenae* ในประเทศไทย

### 3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

คณะผู้วิจัยทำการสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างปาดจิวศรีราชา (*Chiromantis hansenae*) และปาดจิวพม่า (*C. vittatus*) โดยอ้างอิงจากรายงานการแพร่กระจายของปาดจิวทั้ง 2 ชนิดตามการรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (ธัญญา จันอาจ, 2546; Taylor, 1962; Nabhitabhata *et al.*, 2000; Nabhitabhata and Chan-ard, 2005) และในพื้นที่อื่นๆตามลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัย ในช่วงระหว่างปี 2554—2556 จากพื้นที่ 9 แห่งในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน (MHS) จังหวัดตากกลุ่มที่ 1 (TK1) จังหวัดตากกลุ่มที่ 2 (TK2) จังหวัดกาญจนบุรี (KCB) จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (PK) จังหวัดเลย (LE) จังหวัดนครราชสีมา (NRS) จังหวัดชลบุรีและจันทบุรี (CB) และจังหวัดสุราษฎร์ธานี (SRT) (ภาพที่ 2)

ทำการเก็บตัวอย่างปาดจิวทั้ง 2 ชนิดในช่วงเวลา 19:00–24:00 น. โดยวิธีการการเดินสำรวจแบบพบเห็นตัว (visual encounter survey) และการระบุตำแหน่งจากการฟังเสียงร้องของเพศผู้ ทำการเก็บเนื้อเยื่อ

ตับหรือเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% เก็บตัวอย่างปาดจิวในฟอร์มลินความเข้มข้น 10% จากนั้นเปลี่ยนนำไปเก็บไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% ตัวอย่างทั้งหมดจะเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์สัตววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ZMKU)



ภาพที่ 2 แผนที่ประเทศไทยแสดงตำแหน่งพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างประชากรปาดจิวศรีราชา ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน (MHS); จังหวัดตากกลุ่ม 1 (TK1); จังหวัดตากกลุ่ม 2 (TK2); จังหวัดเลย (LE); จังหวัดกาญจนบุรี (KCB); จังหวัดนครราชสีมา (NRS); จังหวัดชลบุรีและจันทบุรี (CB); จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (PK) และจังหวัดสุราษฎร์ธานี (SRT)

### 3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ และการหาลำดับเบส

ทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเนื้อเยื่อตับหรือกล้ามเนื้อ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Dneasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Inc.) และทำการเพิ่มชิ้นส่วนของยีนในไมโทคอนเดรียส่วน 16S rRNA โดยใช้ปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส (94 °C, 45 วินาที; 52 °C, 30 วินาที; 72 °C, 1 นาที) จำนวน 35 รอบ ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ 16Sc และ 16Sd (Moriarty and Cannatella 2004) ปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้นั้นจะนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (QIAGEN, Inc.) จากนั้นนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI

3730 automatic sequencer นำข้อมูลลำดับเบสที่แก้ไขแล้วไปเก็บไว้ที่ GenBank (Accession numbers: 16S; KJ546807—KJ546839; POMC; KJ546672—KJ546806)

### 3.2.3 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ลำดับเบสที่ได้จะถูกตรวจโดยใช้โปรแกรม Geneious v. 5.6.3 (Biomatter, Ltd.) และทำการหา รูปแบบของการแทนที่ลำดับเบสในแต่ละยีนภายใต้เกณฑ์ของ Akaike information criterion (AIC) โดยใช้โปรแกรม jModelTest v2.1.4 (Darriba *et al.* 2012) ทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Bayesian Inference (BI) ด้วยโปรแกรม MrBayes v3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) สำหรับ ยีน 16S rRNA ทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม PhyML 3.0 (Guindon and Gascuel 2003) โดยใช้รูปแบบการแทนที่ลำดับเบสแบบเดียวกับการ วิเคราะห์ Bayesian

### 3.2.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร

ทำการหาค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ ( $h$ ; Nei 1987) ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ ( $\pi$ ; Nei and Tajima, 1981) จำนวนของแฮพโลไทป์ ( $N_h$ ) และจำนวนของแฮพโลไทป์จำเพาะ ( $N_u$ ) โดยใช้โปรแกรม DnaSp v5.10.01 (Librado and Rozas 2009) ทำการหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างประชากร (%  $p$ -distances) โดยใช้โปรแกรม MEGA v5.2 (Tamura *et al.* 2011) จากนั้นทำการหา ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม  $F_{ST}$  และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (AMOVAs) โดยใช้โปรแกรม Arlequin v3.5.1.3 (Excoffier *et al.* 2005)

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 สถานภาพทางอนุกรมวิธานของปาดจิวสกุล *Chiromantis* ในประเทศไทย

#### 4.1.1 การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ Maximum likelihood และ Bayesian inference พบว่าปาดจิวที่พบในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 Clade (ภาพที่ 4)

- Clade A ประกอบด้วย *Feihyla palpebralis*, ปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 1 จากเมืองปูเตา (รัฐคะฉิ่น ประเทศพม่า) ปาดจิวพม่า *C. vittatus* จากประเทศลาวและจีน ปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 2 จากสังขละบุรี (ประเทศไทย), เมืองมิตจินา (รัฐคะฉิ่น ประเทศพม่า) และเมืองทวาย (เขตตะนาวศรี ประเทศพม่า) ปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 จากประเทศไทย

- Clade B ประกอบด้วย ปาดจิวลายแต้ม *C. nongkhornesis* จากประเทศไทย เวียดนาม และลาว, ปาดจิวหลังขีด *C. doriae* จากประเทศไทย จีนและลาว, *C. xerampelina* และ *C. rufescens* จากแอฟริกา

ผลการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลยังแสดงถึงความสัมพันธ์แบบ sister relationship ระหว่างปาดจิวพม่าและปาดจิวศรีราชา และระหว่างปาดจิวหลังขีดและปาดจิวลายแต้ม สำหรับ *Feihyla palpebralis* นั้นเป็น sister taxon กับ Clade ของปาดจิวพม่า *C. vittatus* และปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* ในการวิเคราะห์ด้วย maximum likelihood พบว่าปาดจิวสกุล *Chiromantis* จากแอฟริกา (*C. xerampelina* และ *C. rufescens*) นั้นมีความใกล้ชิดกับ Clade ปาดจิวหลังขีด *C. doriae* และปาดจิวลายแต้ม *C. nongkhorensis* มากกว่าปาดจิวพม่า *C. vittatus* และปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่ม Rhacophorus ได้แก่ ปาดตีนเหลือง *R. bipunctatus* และปาดเขียว *R. kio* และกลุ่ม Polypedates ได้แก่ *P. cruciger* ปาดบ้านและ *P. megacephalus* นั้นเป็น monophyly แต่ความสัมพันธ์ระหว่าง 2 กลุ่มนี้กับกลุ่มอื่นๆ รวมทั้งกลุ่มของปาดจิวใน Clade A และ B นั้นยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนเนื่องจากยังขาดข้อมูลสนับสนุน

ความสัมพันธ์ภายในประชากรของปาดจิวชนิดเดียวกันนั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างน้อย โดยภายในประชากรของปาดจิวลายแต้ม *C. nongkhorensis* มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.6%, ภายในประชากรปาดจิวหลังขีด *C. doriae* เท่ากับ 1.9% ปาดจิวพม่า *C. vittatus* กลุ่มที่ 1 เท่ากับ 3.4 % ปาดจิวพม่า *C. vittatus* กลุ่มที่ 2 เท่ากับ 0.7% ปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* กลุ่มที่ 1 เท่ากับ 1.2% ปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* กลุ่มที่ 2 มีค่า 1.2 % แต่ในระหว่างประชากรปาดจิวแต่ละชนิดมีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก คือมีค่า 8.5 – 18.4% โดยระหว่างประชากรของปาดจิวลายแต้มและปาดจิวหลังขีด มี

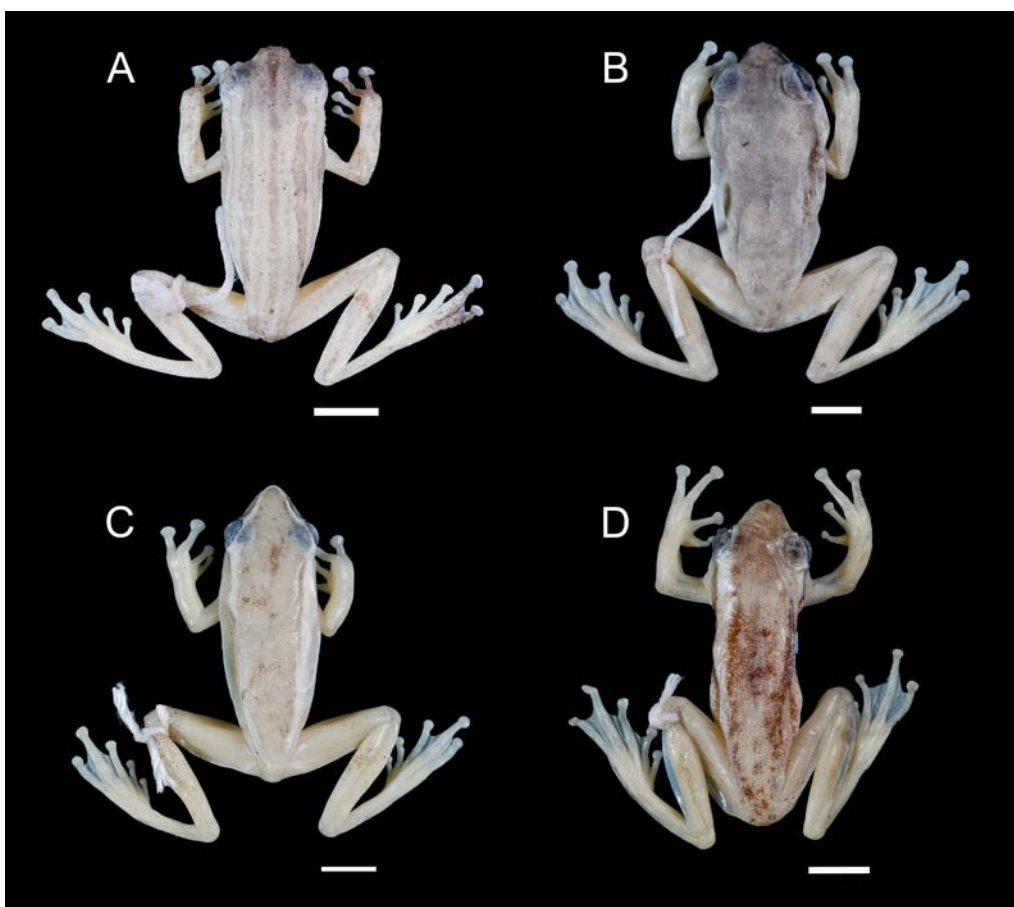
ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 4.5% ระหว่างประชากรปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 8.5% และประชากรปาดจิวศรีราชากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 เท่ากับ 4.7% (ตารางที่ 2)

#### 4.1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

กลุ่มของปาดจิวที่ใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้น อ้างอิงตามผลการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มของปาดจิวหลังซิด (*C. doriae*) ปาดจิวลายแต้ม (*C. nongkhorensis*) ปาดจิวพม่า (*C. vittatus*) กลุ่มที่ 2 และปาดจิวศรีราชา (*C. hansenae*) กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 จากรายงานของ Wilkinson *et al.* (2003) นั้นพบว่าในบางตัวอย่างของปาดจิวศรีราชากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 และปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 2 นั้น ลักษณะขอบของแผ่นหูไม่ชัดเจน ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและช่วงของความผันแปรทางสัณฐานวิทยา ผลการวิเคราะห์จาก Mann-Whitney U test ของสัดส่วนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 2 และปาดจิวศรีราชากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ลักษณะของความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางตา ความยาวรยางค์หน้า ความยาวเท้าหน้า ความยาวเท้าหลัง ความกว้างแผ่นนิ้วที่ 3 ของเท้าหน้า และ ความกว้างแผ่นนิ้วที่ 4 ขอเท้าหลัง ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% และพบว่าปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 2 มีขนาดลำตัวหรือความยาวจากปลายจมูกถึงช่องเปิดทวารมากกว่าปาดจิวศรีราชากลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 1 ตามลำดับ โดยวิเคราะห์จาก Kruskal-Wallis test ที่ค่าความเชื่อมั่น 95%

การวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปรแบบ PCA และ DFA เพื่อทดสอบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มปาดจิวพม่าและปาดจิวศรีราชาพบว่า ค่าสถิติ PCA แยกทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันด้วย 3 แกน (PC1 – PC3) ที่ค่าความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา 72.95% แกน PC1 มีค่าความแปรผัน 58.04% ส่วน PC2 เท่ากับ 8.60% และ PC3 เท่ากับ 6.32% โดยแกน PC1 แสดงลักษณะของความยาวจากปลายจมูกถึงช่องเปิดทวาร ความยาวเท้าหน้า และความยาวกระดูกหน้าแข้ง แกน PC2 แสดงลักษณะความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางตา ความกว้างของเปลือกตาบน และแกน PC3 แสดงลักษณะระยะห่างระหว่างตา และความยาวหัว การวิเคราะห์สถิติ DFA พบว่าฟังก์ชัน 1 มีค่าความผันแปร 90.1% ในขณะที่ฟังก์ชัน 2 มีค่าความผันแปร 9.9% แผนภาพ Canonical discriminant plot (ภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่าฟังก์ชัน 1 สามารถจำแนกปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 1 (สังขละบุรี) ออกจากปาดจิวศรีราชากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ได้อย่างชัดเจน

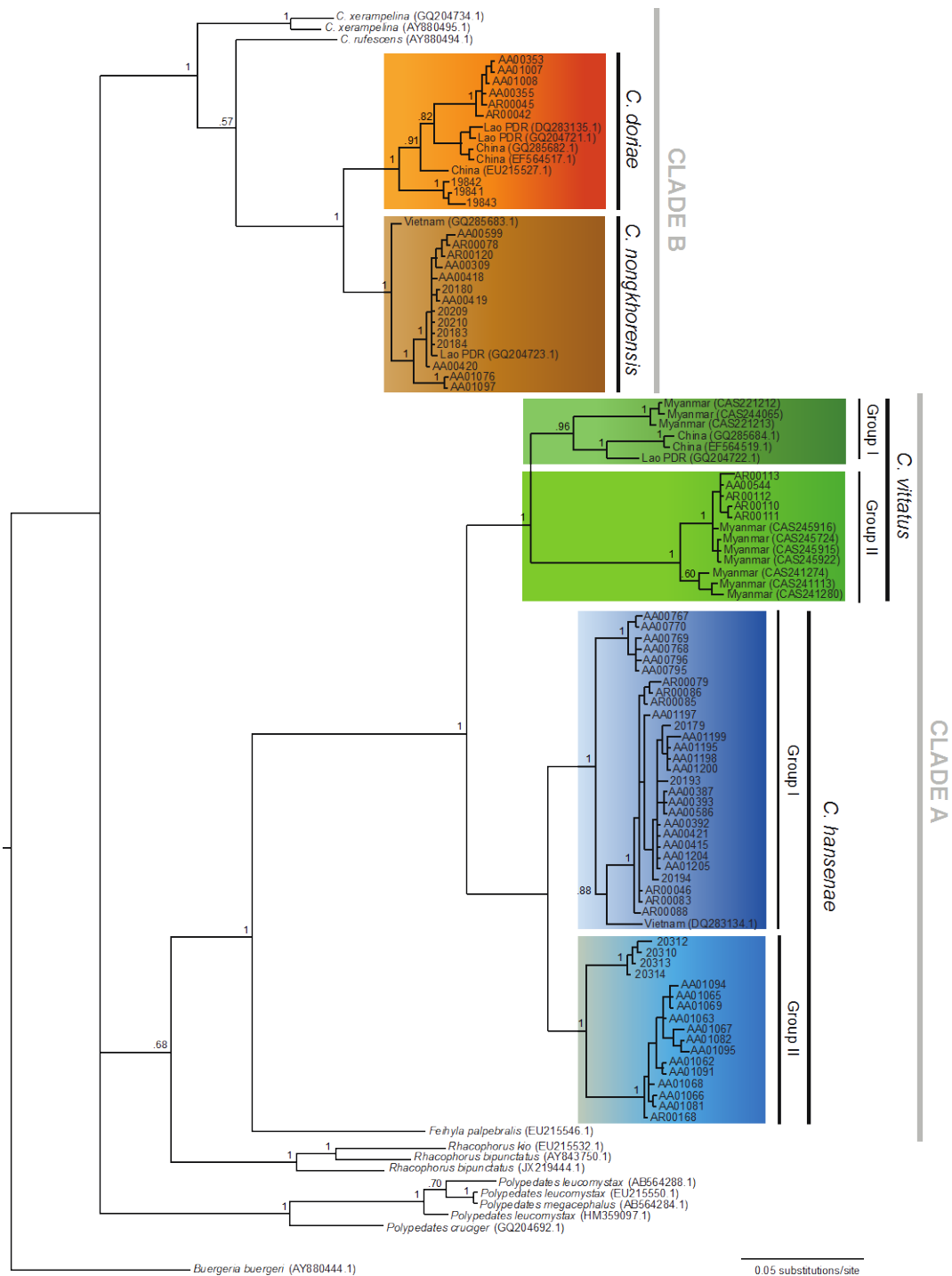
นอกจากนี้การวิเคราะห์ค่าทางสถิติแล้ว การศึกษาครั้งนี้ยังจัดรูปแบบลายหลังของปาดจิวสกุล *Chitomantis* จำนวน 136 ตัวออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 3) ได้แก่ กลุ่มที่มีแถบลายหลังหลายเส้น ส่วนมากเป็นเส้นยาวที่มีความต่อเนื่องกัน ซึ่งพบในปาดจิวหลังซิด (ภาพที่ 3A) กลุ่มที่ไม่มีเส้นลายหลัง แต่อาจพบเป็นแต้มจุดบนหลัง พบในปาดจิวลายแต้ม (ภาพที่ 3B) และกลุ่มที่มีเส้นลายหลังค่อนมาทางด้านข้างลำตัว ได้แก่ ปาดจิวศรีราชาและปาดจิวพม่า (ภาพที่ 3C และ 3D)



ภาพที่ 3. ตัวอย่างที่เก็บรักษาใน 70 % EtOH. (A) *Chiromantis doriae* (AR00043; เลย); (B) *C. nongkhorensis* (AR00078; นครราชสีมา); (C) *C. hansenae* กลุ่มที่ 1 (AA00421; ชลบุรี); (D) *C. vittatus* กลุ่มที่ 2 I (AR00110; สังขละบุรี กาญจนบุรี). สเกล = 5 มิลลิเมตร.

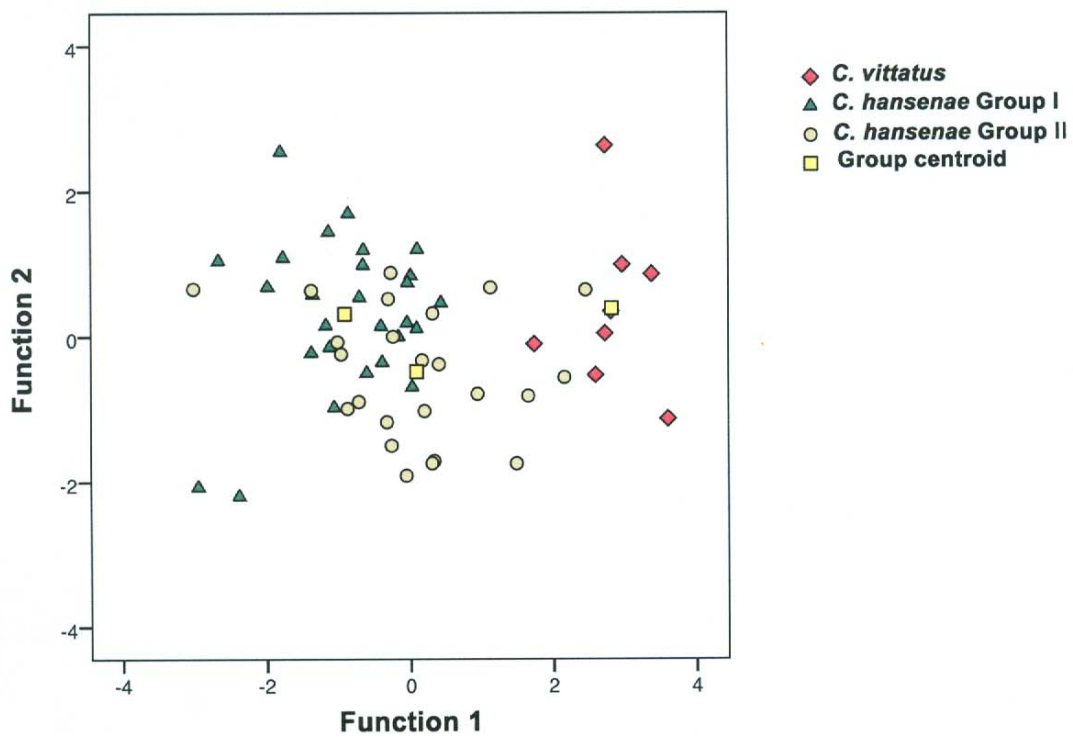
#### 4.1.3 เสียงร้อง

การวิเคราะห์เสียงร้องพบว่าลักษณะของเสียงร้องมีความแตกต่างกันระหว่างปาดจิวในสกุล *Chiromantis* แต่ละชนิด (ตารางที่ 4) เสียงร้องของปาดจิวหลังขีดประกอบด้วย 3-6 พัลส์ต่อการร้อง 1 ครั้ง ปาดจิวลายแต้มประกอบด้วย 2-4 พัลส์ต่อการร้อง 1 ครั้ง และปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 2 (สังขละบุรี) ประกอบด้วย 4-10 พัลส์ต่อการร้อง 1 ครั้ง ในขณะที่เสียงร้องของปาดจิวศรียาชากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 1 พัลส์ต่อการร้อง 1 ครั้ง นอกจากนี้ยังพบว่าเสียงร้องของปาดจิวศรียาชากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีความถี่เด่นมากกว่าในปาดจิวหลังขีด ปาดจิวลายแต้มและปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 2 (สังขละบุรี) ค่าเฉลี่ยความถี่ของพัลส์ของปาดจิวหลังขีดมีค่า  $16.69 \pm 1.24$  พัลส์ต่อวินาที ปาดจิวลายแต้ม  $3.66 \pm 0.55$  พัลส์ต่อวินาที และปาดจิวพม่ากลุ่มที่ 2 (สังขละบุรี) มีค่า  $11.62 \pm 0.46$  พัลส์ต่อวินาที



ภาพที่ 4. Bayesian Inference phylogram ของยีน16S rRNA และแสดงค่า Bayesian posterior probability support values.

ภาพที่ 5. Discriminant function analysis ของการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. vittatus*-*hansena* group.



ตารางที่ 2. ค่า uncorrected mean pairwise distances ของยีน 16S rRNA

GROUP ID	#	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>C. doriae</i>	1	0.019							
<i>C. nongkhorensis</i>	2	0.045	0.007						
<i>C. vittatus</i> Group I	3	0.161	0.149	0.034					
<i>C. vittatus</i> Group II	4	0.163	0.149	0.085	0.007				
<i>C. hansenae</i> Group I	5	0.174	0.159	0.088	0.106	0.012			
<i>C. hansenae</i> Group II	6	0.184	0.169	0.087	0.115	0.047	0.012		
Non-Thai <i>Chiromantis</i>	7	0.096	0.100	0.161	0.173	0.176	0.177	0.063	
Outgroups	8	0.144	0.135	0.180	0.173	0.186	0.188	0.149	0.119

ตารางที่ 3. ค่าที่ได้จากการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และช่วง (range) (มิลลิเมตร)

	<i>C. doriae</i> (n=20)	<i>C. nongkhorensis</i> (n=57)	<i>C. vittatus</i> Group II (n=8)	<i>C. hansenae</i> Group I (n=27)	<i>C. hansenae</i> Group II (n=24)
SVL	24.55±1.45 (21.85–26.55)	28.53±1.36 (25.69–31.14)	24.76±0.43 (24.04–25.24)	21.33±0.70 (19.17–22.86)	22.38±1.31 (20.43–25.57)
HL/SVL	33.72±2.01 (30.64–39.01)	31.72±1.31 (28.38–35.33)	32.68±1.74 (30.51–35.13)	34.18±1.16 (32.23–36.24)	32.73±1.18 (30.34–35.54)
HW/SVL	31.82±1.15 (30.13–33.92)	31.24±1.18 (28.39–35.68)	29.64±1.20 (27.54–31.31)	29.85±0.85 (27.77–31.73)	29.96±0.96 (26.45–30.75)
ELW/SVL	9.49±0.86 (8.04–11.42)	9.47±0.85 (7.75–11.31)	7.57±0.68 (6.44–8.48)	7.68±1.43 (4.97–9.77)	7.33±1.28 (4.92–10.57)
ED/SVL	12.28±0.89 (10.66–13.38)	12.21±0.83 (10.68–14.37)	10.59±0.54 (9.74–11.45)	11.85±0.83 (9.10–13.15)	11.44±1.10 (9.70–14.51)
IND/SVL	9.99±0.57 (8.81–11.12)	9.46±1.49 (7.94–11.84)	10.09±0.49 (9.39–10.89)	10.22±0.68 (9.20–12.03)	10.13±0.68 (7.89–11.41)
IOD/SVL	20.09±1.07 (18.19–22.19)	19.71±1.49 (11.35–22.15)	19.87±1.05 (18.52–21.63)	20.57±1.05 (18.73–22.82)	18.91±1.32 (16.28–21.64)
SNL/SVL	15.54±0.83 (13.87–16.85)	13.77±0.93 (11.84–16.23)	15.70±0.80 (14.81–17.08)	16.17±0.82 (14.26–17.55)	15.67±0.79 (14.19–17.06)
DNE/SVL	8.03±0.56 (7.19–9.18)	7.61±0.59 (6.25–9.15)	8.40±0.53 (7.73–9.37)	8.24±0.69 (6.89–9.87)	8.23±0.65 (7.30–10.38)
TD/SVL	6.78±0.54 (5.78–8.31)	7.12±0.55 (5.94–8.32)	*	*	*
FLL/SVL	44.85±2.26 (40.38–49.02)	45.11±2.01 (41.40–50.33)	45.94±2.26 (42.68–48.77)	42.85±1.75 (38.41–45.58)	44.62±2.73 (40.40–53.57)
HLT/SVL	28.38±0.75 (27.09–29.65)	28.50±1.32 (26.92–32.74)	30.78±1.96 (27.91–34.19)	27.61±1.51 (24.45–31.68)	28.32±2.08 (20.49–31.43)
THL/SVL	50.19±1.99 (45.58–54.27)	49.52±2.48 (42.01–55.34)	48.98±4.87 (38.00–53.19)	48.85±2.05 (45.85–53.53)	48.73±2.22 (43.02–53.00)
TIL/SVL	51.91±1.41 (49.34–54.78)	50.80±1.97 (46.42–54.89)	48.87±3.46 (43.50–53.88)	48.24±2.24 (44.58–52.34)	49.14±1.83 (44.15–53.10)
FL/SVL	41.25±1.60 (38.89–44.29)	41.49±2.19 (37.41–47.10)	44.49±2.12 (40.73–47.53)	41.65±2.40 (37.93–47.96)	42.55±2.03 (38.13–47.91)
3FDW/SVL	5.20±0.46 (4.39–6.14)	5.14±0.58 (3.80–6.08)	5.11±0.28 (4.67–5.50)	4.67±0.46 (3.45–5.64)	4.86±0.58 (3.05–5.96)
4TDW/SVL	4.24±0.43 (4.24–5.72)	4.67±0.53 (3.50–5.73)	4.76±0.31 (4.42–5.26)	4.25±0.56 (3.00–5.25)	4.28±0.45 (3.26–4.98)

ตารางที่ 4. ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และช่วงของลักษณะเสียงของปาดจิวสกุล *Chiromantis*

Species	<i>C. doriae</i>	<i>C. nongkhorensis</i>	<i>C. vittatus</i> Group II	<i>C. hansenae</i> Group I	<i>C. hansenae</i> Group II
n <sub>individual</sub>	4	4	4	5	3
n <sub>call</sub>	20	20	20	20	19
Call duration (ms)	215.47 ± 57.73 (113.57–332.10)	497.81 ± 239.29 (0.24313–0.91046)	582.16 ± 210.41 (278.64–850.58)	26.89 ± 3.85 (18.19–32.91)	99.94 ± 14.98 (66.00–118.71)
Notes/call	1	2.7 ± 0.80 (2–4)	7.00 ± 2.37 (4–10)	1	1
Note duration (ms)	215.47 ± 57.73 (113.57–332.10)	14.53 ± 5.48 (5.23–24.31)	40.25 ± 2.91 (30.00–40.00)	26.89 ± 3.85 (18.19–32.91)	99.94 ± 14.98 (66.00–118.71)
Inter-note duration (ms)	–	282.80 ± 55.61 (208.58–402.28)	44.18 ± 6.44 (30.00–60.00)	–	–
Note rate (s)	–	3.66 ± 0.55 (2.7–4.5)	11.62 ± 0.46 (10.46–12.56)	–	–
Pulses/call	4.00 ± 0.89 (3–6)	unpulsed	unpulsed	indistinct pulsed	indistinct pulsed
Pulse length (ms)	8.78 ± 2.70 (3.52–14.53)	–	–	–	–
Inter-pulse duration (ms)	50.9 ± 6.73 (44.22–67.89)	–	–	–	–
Pulse rate/call (s)	16.69 ± 1.24 (14.07–19.32)	–	–	–	–
Dominant frequency (Hz)	4289.4 ± 200.7 (3962.1–4478.9)	3948.1 ± 196.9 (3617.6–4306.6)	3944.9 ± 184.5 (3617.6–4134.4)	5185.2 ± 157.1 (4995.7–5340.2)	5240.5 ± 265.11 (4478.9–5512.5)
Temperature (°C)	20.5–22.0	22.0–26.5	24.0–24.5	20.5–24.0	25.3–26.8

## 4.2 โครงสร้างประชากรของปาดจิวศรีราชา *Chiromantis hansenae* ในประเทศไทย

### 4.2.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาดจิวศรีราชา *C. hansenae*

การวิเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนไมโทคอนเดรียส่วน 16S rRNA จำนวน 880 คู่เบส พบว่ามีตำแหน่งที่มีเบสแตกต่างกันอย่างน้อย 2 ชนิด (variable site) จำนวน 106 ตำแหน่ง และตำแหน่งของเบสที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 ชนิดนั้นสามารถพบได้อย่างน้อย 2 ชุดลำดับเบส (parsimony informative site) จำนวน 99 ตำแหน่ง ประกอบด้วย 57 แสพโทไลไทป์ และมีแสพโทไลไทป์จำเพาะ 54 แสพโทไลไทป์ ค่าเฉลี่ยความหลากหลายของแสพโทไลไทป์เท่ากับ  $0.975 \pm 0.004$  โดยมีค่าต่ำสุดคือ  $0.667 \pm 0.314$  ในประชากรจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และสูงสุดคือ  $1.000 \pm 0.500$  จากจังหวัดเลยและ  $1.000 \pm 0.177$  จากจังหวัดตาก กลุ่มที่ 2 ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์รวมเท่ากับ  $0.03561 \pm 0.00101$  โดยมีค่าต่ำสุดคือ  $0.00078 \pm 0.00037$  จากประชากรจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และค่าสูงสุดคือ  $0.00796 \pm 0.00192$  จากจังหวัดตากกลุ่มที่ 2

### 4.2.2 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของประชากรปาดจิวศรีราชา *C. hansenae*

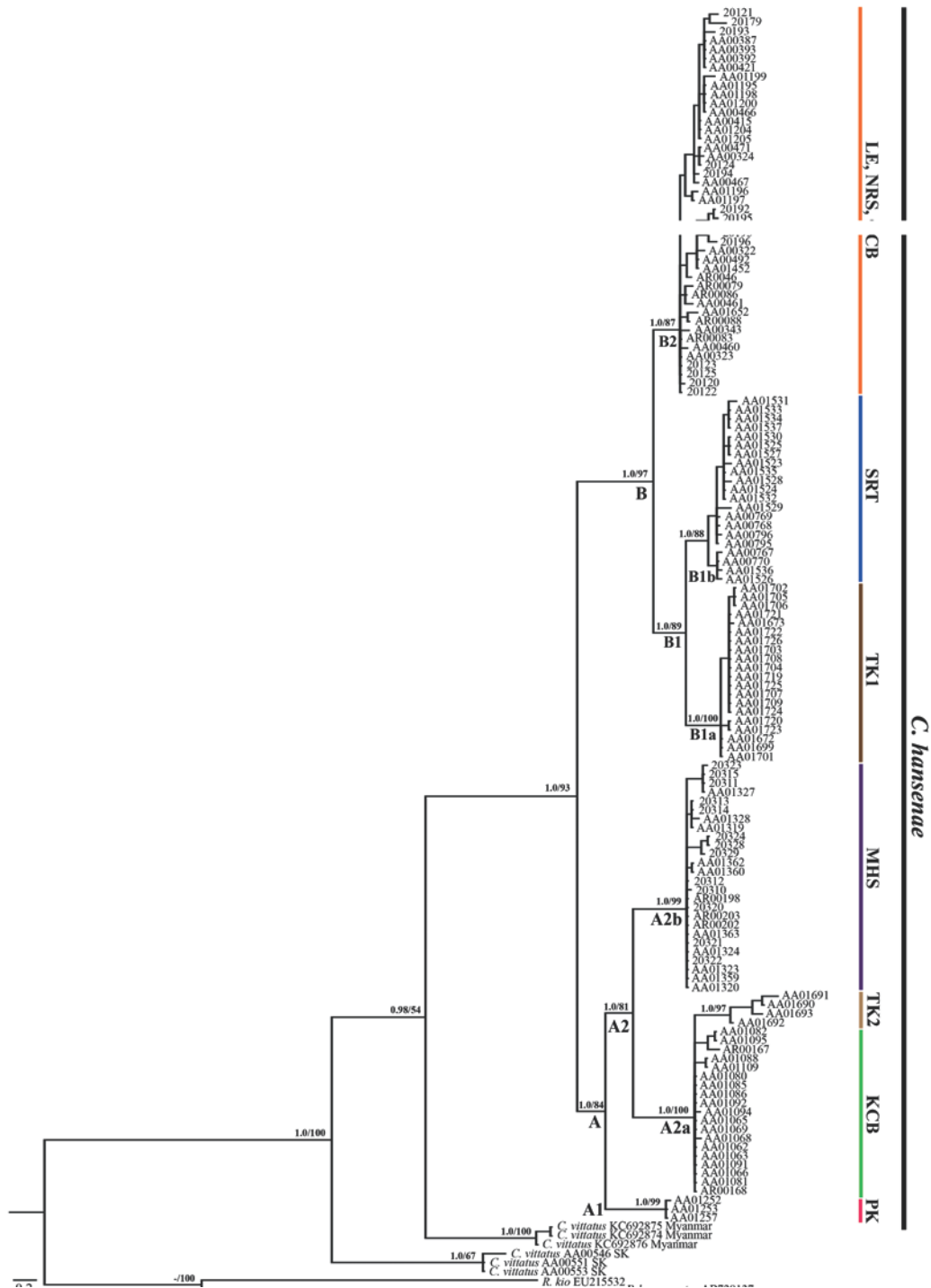
รูปแบบสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของประชากรปาดจิวศรีราชาในประเทศไทยจากข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S นั้นพบว่า ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรนั้นเป็นแบบ monophyletic group และมีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันกับปาดจิวพม่า (ภาพที่ 6) นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรปาดจิวศรีราชาในประเทศไทยนั้นมีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่แบ่งออกเป็น 2 clade โดยใน clade A (ซึ่งมีค่าความน่าจะเป็นในการวิเคราะห์แบบ BI (posterior probability) = 1.0 แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ประกอบด้วยตัวอย่างปาดจิวศรีราชาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (A1) จังหวัดกาญจนบุรีและตากกลุ่มที่ 2 (A2a) และจังหวัดแม่ฮ่องสอน (A2b) ซึ่งประชากรเหล่านี้มีการแพร่กระจายในพื้นที่ภาคเหนือฝั่งตะวันตก และภาคตะวันตกของประเทศไทย และใน clade B (ซึ่งมีค่าความน่าจะเป็นในการวิเคราะห์แบบ BI (posterior probability) = 1.0 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ประกอบด้วยตัวอย่างปาดจิวศรีราชาจากจังหวัดตากกลุ่มที่ 1 (B1a) ตัวอย่างจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี (B1b) และตัวอย่างจากจังหวัดเลย นครราชสีมาและชลบุรี (B2) ซึ่งใน clade นี้เป็นประชากรที่มีการแพร่กระจายในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย (ภาพที่ 6)

จากการศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ของแสพโทไลไทป์ของประชากรปาดจิวศรีราชาในประเทศไทยโดยใช้ข้อมูลจากยีน 16S นั้นพบว่า ประชากรมีความสัมพันธ์ของแสพโทไลไทป์ที่แบ่งเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 7) ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลของยีน 16S โดยในแสพโทไลไทป์กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแสพโทไลไทป์ของประชากรจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดตากกลุ่มที่ 2 จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ภาพที่ 7) และแสพโทไลไทป์กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแสพโทไลไทป์ของประชากรจากจังหวัดเลย จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดชลบุรี จังหวัดตากกลุ่มที่ 1 และจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยพบว่า ประชากรมีลักษณะแสพโทไลไทป์ที่จำเพาะในแต่ละพื้นที่ และมีการแสดงลักษณะของแสพโทไลไทป์ร่วมกันใน

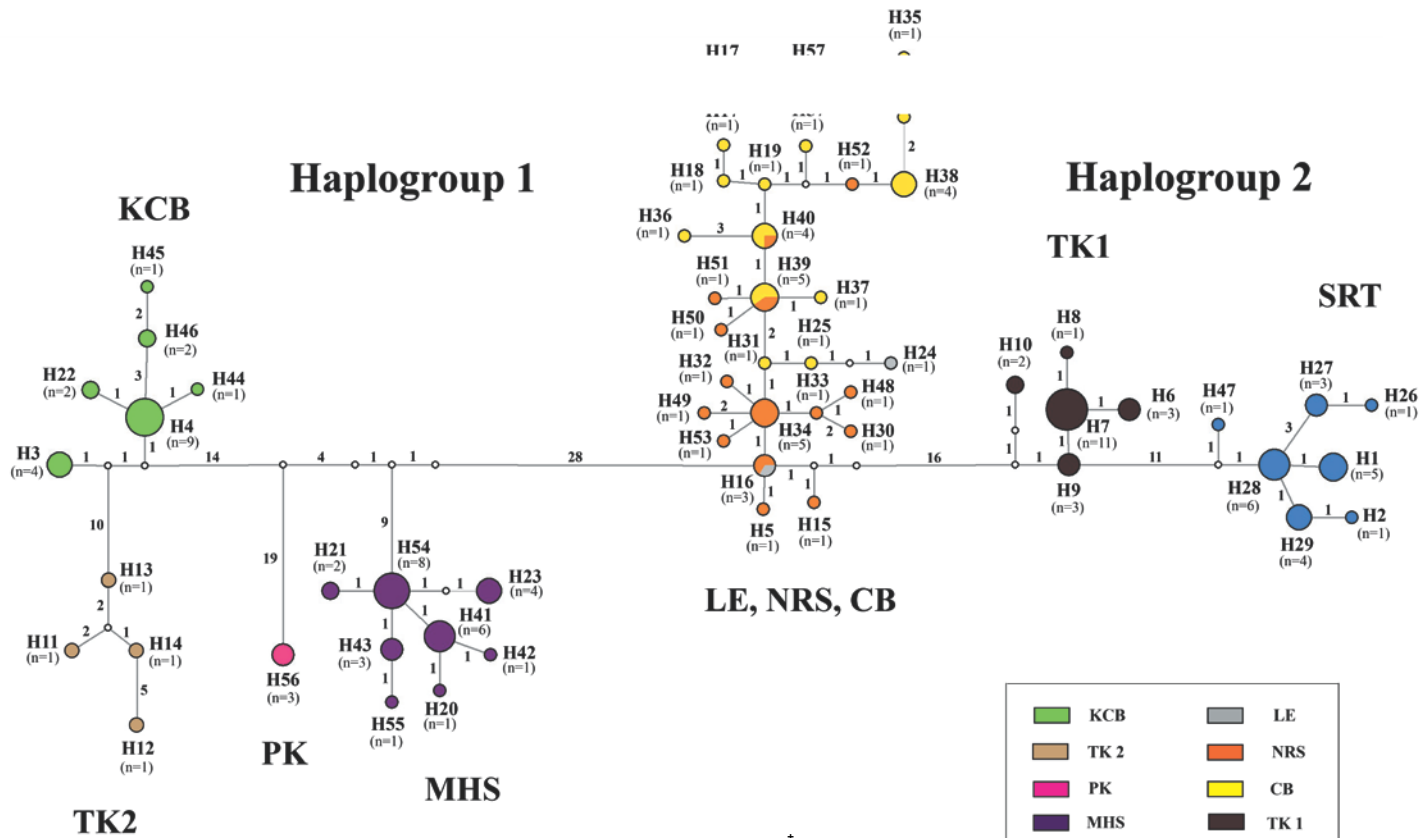
แต่ละพื้นที่น้อยมาก ได้แก่ แสพโพลไทป์ที่ 16 มีลักษณะของแสพโพลไทป์ร่วมกันระหว่างจังหวัดเลยและจังหวัดนครราชสีมา แสพโพลไทป์ที่ 39 และ แสพโพลไทป์ที่ 40 มีลักษณะของแสพโพลไทป์ร่วมกันระหว่างจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดชลบุรี

#### 4.2.3 โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปาดจีวศรีราชา *C. hansenae*

ตารางที่ 6 แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปาดจีวศรีราชานั้นพบว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรปาดจีวเปรียบเทียบกับระหว่างพื้นที่นั้นมีค่าสูงมาก โดยประชากรภายใน clade A นั้นมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0—5.0 % ซึ่งมากกว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายใน clade B ที่มีค่าเท่ากับ 0.0—3.4 % และพบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมมีค่าสูงสุดในประชากรระหว่าง clade คือเท่ากับ 4.4—6.3 % นอกจากนี้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปาดจีวศรีราชาพบว่า มีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมสูงสุดในประชากรระหว่าง clade (49.25%) รองลงมาคือระหว่างประชากรภายใน clade เดียวกัน (45.81%) สำหรับค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม  $F_{ST}$  พบว่าประชากรปาดจีวศรีราชานั้นมีค่า  $F_{ST}$  ที่สูงมาก ยกเว้นประชากรจากจังหวัดเลย จังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดชลบุรีที่มีค่า  $F_{ST}$  ค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 7)



ภาพที่ 6 แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของประชากรปาดจีศรีราชาแบบ Bayesian analyses โดยใช้ข้อมูลของยีนในโตคอนเดรียส่วน 16S ค่าความน่าจะเป็น Bayesian posterior probability และ Maximum bootstrap support นั้นแสดงเหนือกิ่งของภาพ



ภาพที่ 7 แสดงสัมพันธ์ระหว่างแฮพโลไทป์ (Median joining networks) ของประชากรปาดจิวศรีราชาในประเทศไทย โดยวงกลมแสดงรูปแบบของแฮพโลไทป์ ขนาดของวงกลมแสดงจำนวนตัวของปาดจิวศรีราชาที่มีลักษณะของแฮพโลไทป์นั้นๆ วงกลมสีขาวแสดง median vector และตัวเลขบนแขนของภาพแสดงจำนวนของเบสที่ต่างกัน

**ตารางที่ 5** แสดงจำนวนตัวอย่างของประชากรปาดจิวศรีราชา (N) จำนวนของแฮพโลไทป์ ( $N_h$ ) จำนวนของแฮพโลไทป์จำเพาะ ( $N_u$ ) ความหลากหลายของแฮพโลไทป์ ( $h$ ) และความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ ( $\pi$ ) โดยใช้ข้อมูลจากยีนไมโทคอนเดรียส่วน 16S rRNA

Localities	N	$N_h$	$N_u$	Haplotype distribution	Haplotype diversity ( $h \pm SD$ )	Nucleotide diversity ( $\pi \pm SD$ )
LE	2	2	1	H24, H16	1.000 $\pm$ 0.500	0.00704 $\pm$ 0.00352
NRS	21	15	12	H5, H15, H16, H30, H32, H33, H34,H39, H40, H48,H49, H50, H51, H52, H53	0.943 $\pm$ 0.039	0.00538 $\pm$ 0.00066
CB	19	12	10	H17, H18, H19, H25, H31, H35, H36, H37, H38, H39, H40, H57	0.930 $\pm$ 0.038	0.00492 $\pm$ 0.00083
TK1	20	5	5	H6, H7, H8, H9, H10	0.674 $\pm$ 0.098	0.00180 $\pm$ 0.00042
SRT	21	7	7	H1, H2, H26, H27, H28, H29, H47	0.952 $\pm$ 0.028	0.00352 $\pm$ 0.00048
MHS	26	8	8	H20, H21, H23, H41, H42, H43, H54,H55	0.871 $\pm$ 0.044	0.00351 $\pm$ 0.00057
KCB	19	6	6	H3, H4, H22, H44, H45, H46	0.743 $\pm$ 0.085	0.00293 $\pm$ 0.00063
TK2	4	4	4	H11, H12, H13, H14	1.000 $\pm$ 0.177	0.00796 $\pm$ 0.00192
PK	3	1	1	H56	0.667 $\pm$ 0.314	0.00078 $\pm$ 0.00037
ALL	135	57	54		0.975 $\pm$ 0.004	0.03561 $\pm$ 0.00101

**ตารางที่ 6** แสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (%) โดยใช้ข้อมูลจากยีนไมโทคอนเดรียส่วน 16S rRNA ของประชากรปลาต๋องศรีราชาในประเทศไทย ค่าในวงเล็บแสดงค่าเฉลี่ยความแตกต่างทางพันธุกรรม

	LE	NRS	CB	TK1	SRT	MHS	KCB	TK2	PK
LE	0.4 (0.4)								
NRS	0.0–0.7 (0.5)	0.1–0.9 (0.6)							
CB	0.2–1.1 (0.7)	0.0–1.2 (0.6)	0.0–0.9 (0.3)						
TK1	2.4–2.7 (2.5)	2.3–2.9 (2.5)	2.3–3.2 (2.7)	0.0–0.5 (0.1)					
SRT	2.6–2.9 (2.7)	2.6–3.2 (2.8)	2.6–3.4 (2.9)	1.5–2.0 (1.7)	0.0–0.7 (0.3)				
MHS	4.5–5.0 (4.7)	4.6–5.5 (5.0)	4.8–5.9 (5.2)	5.4–5.9 (5.6)	4.8–5.4 (5.0)	0.0–0.5 (0.2)			
KCB	5.1–5.7 (5.4)	4.9–5.9 (5.5)	5.0–5.7 (5.4)	5.6–6.3 (5.9)	5.2–6.0 (5.5)	3.5–4.4 (3.8)	0.0–0.7 (0.2)		
TK2	5.7–6.0 (5.9)	5.7–6.3 (5.9)	5.5–6.1 (5.8)	5.9–6.1 (6.0)	5.9–6.2 (6.0)	3.8–4.5 (4.2)	1.3–2.1 (1.8)	0.4–1.0 (0.6)	
PK	4.4–4.5 (4.5)	4.4–5.1 (4.7)	4.6–5.2 (4.9)	5.4–5.5 (5.5)	4.8–5.6 (5.5)	4.0–4.3 (4.1)	4.1–4.5 (4.2)	4.8–5.0 (4.9)	0.0 (0.0)

ตารางที่ 7 แสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม  $F_{ST}$  ระหว่างประชากรปลาจิวศรราชาในประเทศไทยโดยใช้ข้อมูลของยีนในไมโทคอนเดรียส่วน 16S rRNA ค่าตัวเลขที่เป็นตัวหนาแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

	LE	NRS	CB	TK1	SRT	MHS	KCB	TK2	PK
LE	–								
NRS	0.00955	–							
CB	<b>0.50014</b>	<b>0.31539</b>	–						
TK1	<b>0.93872</b>	<b>0.89767</b>	<b>0.91498</b>	–					
SRT	<b>0.90261</b>	<b>0.88699</b>	<b>0.90063</b>	<b>0.88216</b>	–				
MHS	<b>0.9576</b>	<b>0.94353</b>	<b>0.95309</b>	<b>0.97</b>	<b>0.9558</b>	–			
KCB	0.95304	<b>0.9418</b>	<b>0.94796</b>	<b>0.96779</b>	<b>0.95437</b>	<b>0.94316</b>	–		
TK2	0.90918	<b>0.9312</b>	<b>0.9378</b>	<b>0.96617</b>	<b>0.94905</b>	<b>0.9427</b>	<b>0.82583</b>	–	
PK	0.97248	<b>0.92706</b>	<b>0.94308</b>	<b>0.97706</b>	<b>0.95767</b>	<b>0.95767</b>	<b>0.92838</b>	<b>0.94877</b>	–

## บทที่ 5

### วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

#### 5.1 สถานภาพทางอนุกรมวิธานของปาดจิวสกุล *Chiromantis* ในประเทศไทย

ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของปาดจิวในสกุล *Chiromantis* นั้นยังไม่สามารถใช้จำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะชนิดที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาค้ำค้ำกันเช่น ปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* และปาดจิวพม่า *C. vittatus* โดยนักวิจัยหลายท่านคาดว่าปาดจิวศรีราชานั้นเป็น junior synonym กับปาดจิวพม่า (Wilkinson *et al.* 2003, Stuart and Emmett 2006, Chan *et al.* 2011) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าในประเทศไทยมีปาดจิวในสกุล *Chiromantis* อย่างน้อย 4 ชนิด ได้แก่ ปาดจิวลายแต้ม ปาดจิวหลังขีด ปาดจิวศรีราชาและปาดจิวพม่า โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลทางชีวโมเลกุล ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน และเสียงร้องที่สนับสนุนว่าปาดจิวศรีราชานั้นเป็นคนละชนิดกับปาดจิวพม่า

ข้อมูลทางชีวโมเลกุลสนับสนุนว่าปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* และปาดจิวพม่า *C. vittatus* นั้นแบ่งแยกออกเป็น 2 สายวิวัฒนาการ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษารูปแบบของเสียงร้อง (จำนวนพัลส์ต่อเสียงร้อง 1 ครั้งและความถี่เด่นของเสียง) ในปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มี 1 พัลส์ต่อเสียงร้อง 1 ครั้ง (4995.7-5340 เฮิรตซ์ และ 4478.9-5512.5 เฮิรตซ์) ในขณะที่ปาดจิวพม่า *C. vittatus* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยหลายพัลส์ต่อเสียงร้อง 1 ครั้ง (3617.6-4306.6 เฮิรตซ์) การวิเคราะห์หม้อโพร์เมทริกซ์แสดงให้เห็นว่าปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* ทั้ง 2 กลุ่มนั้นแยกออกจากปาดจิวพม่า *C. vittatus* กลุ่มที่ 2 ได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก โดยพบว่าความยาวรยางค์หน้า ความยาวเท้าหน้าเท้าหลัง สามารถใช้จำแนกปาดจิวพม่าออกจากปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* ได้ (เฉพาะที่มีขนาดใหญ่และมีรูปร่างใกล้เคียงกัน) Taylor (1962) กล่าวว่าภายหลังจากตรวจสอบปาดจิวศรีราชาและปาดจิวพม่าแล้ว ยังไม่สามารถที่จะจำแนกปาดจิวทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่ขนาดตัวจะใช้จำแนกชนิดได้ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ช่วยยืนยันว่าปาดจิวพม่ามีขนาดตัว (ความยาวจากปลายจมูกถึงช่องเปิดทวาร) ใหญ่กว่าปาดจิวศรีราชา ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* นั้นไม่ใช่ junior synonym ของปาดจิวพม่า *C. vittatus*

อย่างไรก็ตามสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปาดจิวศรีราชา *C. hansenae* และปาดจิวพม่า *C. vittatus* ยังต้องทำการศึกษาต่อไปเนื่องจากผลการศึกษานี้พบว่าทั้งปาดจิวศรีราชาและปาดจิวพม่านั้นมีสายวิวัฒนาการที่แยกจากกันออกเป็น 2 กลุ่มในแต่ละชนิด สำหรับปาดจิวศรีราชานั้นมี type locality อยู่ที่ บ้านหนองค้อ จังหวัดชลบุรี ภาคตะวันออกของไทย (Cochrane, 1927) ส่วนปาดจิวพม่ามี type locality อยู่ที่รัฐคะฉิ่น ภาคเหนือฝั่งตะวันออกของประเทศพม่า (Boulenger, 1887) อย่างไรก็ตามแม้ว่าการศึกษานี้จะไม่มีตัวอย่างปาดจิวพม่าจาก type locality แต่ได้ใช้ตัวอย่างปาดจิวพม่าที่ได้จากพิพิธภัณฑ์จากพื้นที่ 2

แห่งของรัฐคะฉิ่นที่มีพิกัดทางภูมิศาสตร์ใกล้เคียงกับ type locality (ภาพที่ 1) ร่วมกับข้อมูลทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างจากทางภาคใต้ของประเทศพม่า (ภาพที่ 1)

Taylor (1962) กล่าวว่าการแพร่กระจายของปาดจีวศรีราชา (เดิมคือ *Philautus hansenae*) ในประเทศไทยนั้นพบในจังหวัดจันทบุรีและชลบุรี (ภาคตะวันออกเฉียงใต้) จังหวัดเลย (ภาคเหนือตอนกลาง) และจังหวัดเชียงใหม่ (ภาคเหนือฝั่งตะวันตก) โดยตีพิมพ์ข้อมูลจากตัวอย่างปาดจีวพม่า 6 ตัว (เดิมคือ *P. vittatus*) แต่ระบุตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างเพียงที่เดียวคือจากจังหวัดเชียงใหม่ ต่อมา Chan-ard (2003) แยกประชากรของปาดจีวศรีราชาว่ามีการแพร่กระจายในบริเวณตะวันออกเฉียงใต้ ส่วนปาดจีวพม่ามีการแพร่กระจายในบริเวณตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศไทย

หากใช้รูปแบบการแพร่กระจายตามเอกสารอ้างอิงจาก Chan-ard (2003) พบว่าตัวอย่างที่เก็บได้จากตำแหน่งที่ 1, 7 และ 8 (ภาพที่ 2) คือปาดจีวพม่า *C. vittatus* แต่ข้อมูลทางชีวโมเลกุลจะพบว่าประชากรปาดจีวศรีราชา *C. hansenae* นั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 นั้นมีการแพร่กระจายในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกและพื้นที่ส่วนมากของประเทศไทย ส่วนกลุ่มที่ 2 นั้นจำกัดการแพร่กระจายเฉพาะในพื้นที่ป่าทางภาคตะวันตกของประเทศไทย นอกจากนี้การวิเคราะห์ข้อมูลเสียงร้อง ชีวโมเลกุลและลักษณะทางสัณฐานวิทยายังจำแนกปาดจีวศรีราชากลุ่มที่ 2 ว่าเป็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากปาดจีวศรีราชากลุ่มที่ 1 จนอาจแยกออกเป็นปาดจีวชนิดใหม่ได้ ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาดจีวศรีราชากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีค่า 4.7% ซึ่งใกล้เคียงกับความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาดจีวหลังซิดและปาดจีวลายแต้มที่มีค่า 4.5% และจากข้อมูลทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างปาดจีวศรีราชาจากพื้นที่ 1 และ 7 พบว่าเป็นปาดจีวศรีราชากลุ่มที่ 2 ไม่ใช่ปาดจีวพม่า

การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างปาดจีวพม่าแสดงให้เห็นว่ามีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่แยกออกเป็น 2 สาย จากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ ปาดจีวพม่ากลุ่มที่ 1 มีการแพร่กระจายบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย ตอนใต้ของเทศจีน และตอนเหนือของประเทศไทย ในบางพื้นที่ของประเทศจีนและลาวพบว่าปาดจีวพม่ากลุ่มที่ 1 มีพื้นที่อาศัยทับซ้อนกับปาดจีวหลังซิด ส่วนปาดจีวพม่ากลุ่มที่ 2 นั้นมีการแพร่กระจายในพื้นที่ภาคเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย และพื้นที่ 8 (สังขละบุรี) ของประเทศไทยสำหรับปาดจีวพม่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ในพื้นที่ของรัฐคะฉิ่น ทางภาคเหนือของประเทศไทยนั้นมีพื้นที่อาศัยทับซ้อนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรปาดจีวพม่าจาก สังขละบุรีมีเสียงร้องและลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากปาดจีวสกุล *Chiromantis* ทุกชนิดที่พบในประเทศไทย

การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับงานการศึกษากลุ่มกบในประเทศไทย เช่น McLeod *et al.* (2012) ที่พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชนิดพันธุ์ซ่อนเร้นเหล่านี้สามารถจำแนกความแตกต่างจากชนิดพันธุ์

อื่นๆได้เมื่อใช้ข้อมูลหลายด้านร่วมกัน ดังนั้นผลจากการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนสถานภาพทางอนุกรมวิธานของ ปาดจีวศิริราชา *C. hansenae* ที่พบในประเทศไทยและข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางชีวโมเลกุลยังแสดงความสัมพันธ์ระหว่างประชากรของปาดจีวพม่าในจากประเทศพม่าและไทยที่พบความหลากหลายทาง พันธุกรรมภายในประชากรปาดจีวพม่า *C. vittatus* และยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป

## 5.2 โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรปาดจีวศิริราชา *C. hansenae*

จากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปาดจีวศิริราชาในประเทศไทยโดยใช้ข้อมูลจากยีน 16S พบว่าประชากรมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ monophyletic group และมีสายสัมพันธ์ทาง วิวัฒนาการใกล้ชิดกับปาดจีวโดยประชากรปาดจีวศิริราชาที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แบ่งออกเป็น 2 clade โดยใน clade A ประกอบด้วยประชากรจากภาคเหนือฝั่งตะวันตกและภาคตะวันตกของประเทศไทย และใน clade B ประกอบด้วยประชากรจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้ของ ประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรนั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สูงมาก โดยใน clade A มีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่มากกว่าใน clade B แสดงว่าประชากรมีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมระหว่าง กันน้อย ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความสามารถในการแพร่กระจายของชนิดสัตว์ หรือปัจจัยปิดกั้นทางภูมิศาสตร์ ที่มีผลต่อการแพร่กระจายและการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างประชากร

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นมีการแพร่กระจายได้ในพื้นที่ที่ไม่ไกลมากนัก คืออาจน้อยกว่า 0.5 กิโลเมตร (Zug, 1993) นอกจากนี้จากการรายงานของ Smith and Green (2005) ระบุว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นมีความสามารถในการแพร่กระจายที่ต่ำ โดยกว่า 44% นั้นมีการเคลื่อนที่ไป ได้ประมาณ 400 เมตร การมีความสามารถในการแพร่กระจายต่ำนั้นไม่เพียงแต่ทำให้ความแตกต่างทาง พันธุกรรมระหว่างประชากรเพิ่มมากขึ้นแล้ว (เช่น Garcia-Paris *et al.* 2000; Cabe *et al.* 2007; Martinez-Solano *et al.*, 2007) แต่ลักษณะทางภูมิศาสตร์ เช่น เทือกเขา อาจเป็นปัจจัยที่ปิดกั้นการ แลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้อีกด้วย (Hagemann and Pröhl 2007; Zhang *et al.* 2010) โดยพบว่าลักษณะภูมิศาสตร์ของประเทศไทย บริเวณภาคเหนือฝั่งตะวันตกและภาค ตะวันตกมีลักษณะภูมิประเทศเป็นเทือกเขาสูงวางตัวในแนวเหนือ-ใต้ ได้แก่ เทือกเขาถนนธงชัย และเทือกเขา ตะนาวศรีซึ่งกั้นเขตแดนไทยพม่า ซึ่งเทือกเขาในฝั่งพม่า นั้นจะมีความสูงประมาณ 1,000 เมตรจากระดับน้ำทะเลซึ่งสูงกว่าในฝั่งของประเทศไทยที่มีความสูงประมาณ 800 เมตรจากระดับน้ำทะเล (Gupta, 2005) ในขณะที่พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออกนั้นเป็นพื้นที่ที่มีความสูงน้อยกว่า ประกอบด้วยที่ราบสูงและเทือกเขาที่ไม่ติดต่อกัน (Inger, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ที่ ระบุว่า ปาดจีวศิริราชานั้นมีพื้นที่อาศัยในเขตที่ราบลุ่ม (Sheridan and Ocock 2008) มีระดับความสูงไม่เกิน 900 เมตรจากระดับน้ำทะเล (Stuart *et al.* 2004)

สำหรับประชากรปาดจิวศรีราชาในจังหวัดสุราษฎร์ธานีซึ่งอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยนั้น เมื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่ามีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับประชากรจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออก แม้ว่าจังหวัดสุราษฎร์ธานีจะตั้งอยู่ห่างไปประมาณ 500 กิโลเมตรและถูกแบ่งแยกด้วยพื้นน้ำทะเลบริเวณอ่าวไทยที่ลึกประมาณ 100 เมตร แต่จากการศึกษาประวัติทางธรณีวิทยาพบว่าพื้นที่ทั้ง 2 แห่งนี้ในอดีตเคยเชื่อมต่อเป็นพื้นดินเดียวกัน ทำให้มีโอกาที่จะเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมระหว่างกัน แต่ต่อมาในช่วงการละลายของธารน้ำแข็งทำให้ระดับน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้น เกิดเป็นบริเวณอ่าวไทยในปัจจุบัน ทำให้พื้นที่ทั้ง 2 แห่งนี้ถูกตัดขาดจากกัน (Hall 1998; Voris 2000; Sathiamurthy and Voris 2006) ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาความผันแปรของอัลโลไซม์ในกบอ่องเล็ก *Rana nigrovittata* (Matsui *et al.* 2001) และผลการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Pansook *et al.* 2012) ในประเทศไทย

ในประชากรปาดจิวศรีราชาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดสุราษฎร์ธานี มีระยะทางห่างกันประมาณ 400 กิโลเมตร และตั้งอยู่บนพื้นที่คาบสมุทรไทย-มาเลเซีย แต่จากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่ามีความสัมพันธ์ที่แบ่งเป็นคนละ clade กัน เนื่องจากพื้นที่ทั้ง 2 แห่งนี้ตั้งอยู่ระหว่างคอคอดกระ โดยจังหวัดประจวบคีรีขันธ์อยู่บริเวณเหนือคอคอดกระ ในขณะที่จังหวัดสุราษฎร์ธานีนั้นอยู่บริเวณด้านใต้ของคอคอดกระ ซึ่งคอคอดกระนั้นมีอิทธิพลต่อการแพร่กระจายของกลุ่มสิ่งมีชีวิต โดยเป็นพื้นที่ที่มีการจำกัดการแพร่กระจายของชนิดพันธุ์ทั้งพืชและสัตว์ (Inger and Voris, 2001; Hughes *et al.*, 2003; Woodruff and Turner, 2009)

นอกจากนี้การศึกษาค้างนี้ยังมีข้อมูลที่น่าสนใจในประชากรจากจังหวัดตาก ซึ่งประชากรมีความแตกต่างกันออกเป็น 2 กลุ่ม ทั้งๆที่พื้นที่เก็บตัวอย่างนั้นห่างกันเพียง 45 กิโลเมตร จากผลการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าประชากรจากจังหวัดตากกลุ่มที่ 1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับประชากรจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย ในขณะที่ประชากรจากจังหวัดตากกลุ่มที่ 2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับประชากรจากภาคเหนือฝั่งตะวันตกและภาคตะวันตกของประเทศไทย โดยพบวาระหว่างประชากร 2 กลุ่มนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงคือมีค่าเท่ากับ 5.9—6.1 % และเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนในภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแฮพโลไทป์ (ภาพที่ 7) สำหรับประชากรจากจังหวัดตากกลุ่มที่ 1 นั้น ทำการเก็บตัวอย่างจากอำเภอสามเงาและอำเภอเมือง ที่มีระดับความสูงจากน้ำทะเล 106 เมตรและ 209 เมตร ตามลำดับ ในประชากรจากจังหวัดตากกลุ่มที่ 2 ทำการเก็บตัวอย่างจากอำเภอแม่สอดซึ่งมีระดับความสูงจากน้ำทะเล 315 เมตร นอกจากนี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรทั้ง 2 แห่งนี้อาจเนื่องมาจากการถูกแยกกันด้วยส่วนของเทือกเขานนรงชัยซึ่งมีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,000 เมตร

### 5.3 บทความวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

**Aowphol, A.**, Rujirawan, A., Taksintum, W., Arsirapot, S. and McLeod, D.S. 2013. Re-Evaluating the taxonomic status of *Chiromantis* in Thailand using multiple lines of evidence (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). Zootaxa 3702 (2): 101–123.

(Impact factor (2014) = 0.906; **First author and Corresponding author**)

Yodthong, S., Siler, C.D., Prasankok, P. and **Aowphol, A.** 2014. Phylogenetic patterns of the Southeast Asian tree frog *Chiromantis hansenae* in Thailand. Asian Herpetological Research 5(3): 179-196.

(Impact factor (2014) = 0.513; **Corresponding author**)

### บรรณานุกรม

- ฉัญญา จั่นอาจ. 2546. คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย. บริษัทด้านสุขภาพการพิมพ์ จำกัด. กรุงเทพฯ ฯ. 175 หน้า.
- Boulenger, G.A. 1887. An account of the batrachians obtained in Burma by M.L. Fea of the Genoa Civic Museum. *Annali del Museo Civico Di Storia Naturale "Giacomo Doria" (Serie 2)*, 5, 418–424.
- Cabe, P.R., R.B. Page, T.J. Hanlon, M.E. Aldrich, L. Connors and D.M. Marsh. 2007. Fine-scale population differentiation and gene flow in a terrestrial salamander (*Plethodon cinereus*) living in a continuous habitat. *Heredity* 98: 53–60.
- Chan, K.O., Grismer, L.L., Shahrul, A.M.S., Quah, E.S.H., Grismer, J.L., Wood P.L.Jr. & Norhayati, A. 2011. Additions to the herpetofauna of Perlis State Park in northern Peninsular Malaysia with the description of a new species of *Chiromantis* Peters 1854 (Anura: Rhacophoridae). *Russian Journal of Herpetology*, 18, 253–259.
- Cochran, D.M. 1927. New Reptiles and batrachians collected by Dr. Hugh M. Smith in Siam. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 40, 179–192.
- Cocroft, R.C. & Ryan, M.J. 1995. Patterns of mating call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behavior*, 49, 283–303.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Delorme, M. (2004) *Phylogeny of Ranidae, Rhacophorinae: Conflicts between molecular and morphological analyses and study of its nature*. Thesis, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France, 334 pp.
- Delorme, M., Dubois, A., Kosuch, J. & Vences, M. 2004. Molecular phylogenetic relationships of *Lankanectes corrugatus* from Sri Lanka: endemism of South Asian frogs and the concept of monophyly in phylogenetic studies. *Alytes*, 22, 53–64.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin version. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatic Online* 1: 47–50.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., Garcia, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. 2005.

- Systematic Review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylinae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294, 1–240.
- Fouquet, A., Vences, M., Salducci, M. & Meyer, A. 2007. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, 567–582.
- Frost, D.R. 2013. *Amphibian Species of the World: an Online Reference Version 5.6*, American Museum of Natural History, New York, USA. Available from: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (9 January 2013).
- Frost, D.R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B, De Sa', R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D. Green, D.M. & Wheeler, W.C. (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297, 1–370.
- Gracia-Paris, M., Good D.A., Parra-Olea G., Wake D.B. 2000. Biodiversity of Costa Rican salamanders: Implications of high levels of genetic differentiation and phylogeographic structure for species formation. *PNAS*. 97: 1640–1647.
- Gerhardt, H.C. (1991) Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behavior*, 42, 615–635.
- Grismer, L.L., Thy, N., Chav, T. & Holden, J. 2007. A new species of *Chiromatis* Peter, 1854 (Anura: Rhacophoridae) from Phnom samkos in the Northwestern Cardamom Mountains, Cambodia. *Herpetologica*, 63, 392–400.
- Grismer, L.L., Thy, N., Thou, C., Wood, P.L.Jr., Oaks, J.R., Holden, J., Grismer, J.L., Szutz, T.R. & Youmans, T.M. 2008. Additional amphibians and reptiles from the Phnom Samkos Wildlife Sanctuary in northwestern Cardamom Mountains, Cambodia, with comments on their taxonomy and the discovery of three new species. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 56, 161–175.
- Guindon, S. and O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.
- Gupta, A. 2005. *The Physical Geography of Southeast Asia*. Oxford University Press, London, England.

- Hagemann, S. and Pröhl H. 2007. Mitochondrial paraphyly in a polymorphic poison frog species (Dendrobatidae: *D. pumilio*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 740–747.
- Hall, R. 1998. The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea, pp. 99–131. In R. Hall and J.D. Holloway, eds. *Biogeography and Geological Evolution of SE Asia*. Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands.
- Hertwig, S., de Sa, R. & Haas, A. 2004. Phylogenetic signal and the utility of 12s and 16s mtDNA in frog phylogeny. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 42, 2–18.
- Hughes, J.B., P.D. Round and D.S. Woodruff. 2003. The Indochinese-Sundaic faunal transition at the Isthmus of Kra: an analysis of resident forest bird species distribution. *Journal of Biogeography*. 30: 569–580.
- Inger, R.F. 1999. Distribution of Amphibians in Southern Asia and Adjacent Islands, pp. 445–482. In W.E. Duellman, ed. *Patterns of Distribution of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, England.
- Inger, R.F., Orlov, N. & Darevsky, I. 1999. Frogs of Vietnam: A Report on New Collections. *Fieldiana, Zoology New Series* 92, 1–46.
- Köhler, J., Scheelke, K., Schick, S., Veith, M. & Lötters, S. 2005. Contribution to the taxonomy of hyperoliid frogs (Amphibia: Anura: Hyperoliidae): advertisement calls of twelve species from East and Central Africa. *African Zoology*, 40, 127–145.
- Kuraishi, N., Matsui, M., Ota, H. & Chen, S.L. 2011. Specific separation of *Polypedates braueri* (Vogt, 1911) from *P. megacephalus* (Hallowell, 1861) (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Zootaxa*, 2744, 53–61.
- Li, J.T., Che, J., Bain, R.H., Zhao, E.M. & Zhang, Y.P. 2008. Molecular phylogeny of Rhacophoridae (Anura): A framework of taxonomic reassignment of species within the genera *Aquixalus*, *Chiromantis*, *Rhacophorus*, and *Philautus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 302–312.
- Li, J.T., Che, J., Murphy, R.W., Zhao, H., Zhao, E.M., Rao, D.Q. & Zhang, Y.P. 2009. New insights to the molecular phylogenetics and generic assessment in the Rhacophoridae (Amphibia: Anura) based on five nuclear and three mitochondrial genes, with comments on the evolution of reproduction. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, 509–522.

- Li, J.T., Li, Y., Murphy, R.W., Rao, D.Q. & Zhang, Y. 2012. Phylogenetic resolution and systematics of the Asian tree frogs, *Rhacophorus* (Rhacophoridae, Amphibia). *Zoologica Scripta*, 41, 557–570.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Martinez-Solano, I., E.L. Jockusch, D.B. Wake. 2007. Extreme population subdivision throughout a continuous range: phylogeography of *Batrachoseps attenuates* (Caudata: Plethodontidae) in western North America. *Molecular Ecology* 16: 4335–4355.
- Matsui, M., K. Nishikawa, W. Khonsue, S. Panha and J. Nabhitabhata. 2001. Allozymic Variation in *Rana nigrovittata* (Amphibia: Anura) within Thailand with special reference to the taxonomic status of *R. mortenseni*. *Natural History Journal of Chulalongkorn University* 1: 15–22.
- McLeod, D.S., Kelly, J.K. & Barley, A. (2012) “Same-Same But Different”: Another new species of the *Limnonectes kuhlii* complex from Thailand (Anura: Dicroglossidae). *Russian Journal of Herpetology*, 19, 261–274.
- Meegaskumbura M. & Manamendra-Arachchi, K. 2005. Description of eight new species of shrub frogs (Ranidae: Rhacophorinae : *Philautus*) from Sri Lanka. *Raffles Bulletin of Zoology*, Supplement 12, 305–338.
- Meegaskumbura M., Meegaskumbura, S., Bowatte, G., Mandmendra-Arachchi, K., Pethiyagoda, R., Hanken, J. & Schneider, C.J. 2010. *Taruga* (Anura:Rhacophoridae), a new genus of foam-nesting tree. *Ceylon Journal of Science (Biological Science)*, 39, 75–94.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *In* Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 November 2010, New Orleans, LA, 1–8.
- Moriarty, E.C. & Cannatella, D.C. 2004. Phylogenetic relationships of North American chorus frogs (*Pseudacris*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, 409–420.
- Nabhitabhata J. & Chan-ard, T. 2005. *Thailand red data: mammals, reptiles and amphibians*. Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning, Bangkok, 158 pp.
- Orlov, N.L., Murphy, R.W., Ananjeva, N.B., Ryabov, S.A. & Ho, T.C. 2002. Herpetofauna of Vietnam, a checklist. Part 1. Amphibia. *Russian Journal of Herpetology* 9, 81–104.

- Pansook, A., W. Khonsue, S. Piyapattanakorn and P. Pariyanonth. 2012. Phylogenetic Relationships among *Holobatrachus rugulosus* in Thailand as Inferred from Mitochondrial DNA Sequence of the Cytochrome-*b* Gene (Amphibian, Anura, Dicroglossidae). *Zoological Science* 29: 54–59.
- Rambaut, A. 2002. Se-al v2.0a11. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal>. (September 2012)
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. 2007. Tracer v1.5. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. (September 2012)
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Rowley, J.J.L. & Srei, N. 2010. *Chiromantis vittatus* (Burmese Bushfrog). Coloration. *Herpetological Review*, 41, 335.
- Ryan, M.J. 2001. *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, 252 pp.
- Sathiamurthy, E. and H.K. Voris. 2006. Map of Holocene sea level transgression and submerged lakes on the Sunda shelf. *Natural History Journal of Chulalongkorn University Supplement 2*: 1–44.
- Sheridan, J.A. & Ocock, J.F. 2008. Parental care in *Chiromantis hansenae* (Anura: Rhacophoridae). *Copeia*, 4, 733–736.
- Smith, M. A. and D.M. Green. 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations?. *Ecography* 28: 110–128.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. *Bioinformatics*, 22, 2688–2690.
- Stuart, B.L. & Emmett, D.A. 2006. A collection of amphibians and reptiles from the Cardomom Mountains, southwestern Cambodia. *Fieldiana, Zoology New Series* 109, 1–27.
- Stuart, B.L., A. Ohler and P.P. van Dijk. 2004. *Chiromantis hansenae*. In: *IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species*. Available Source: <http://www.iucnredlist.org>, December 23, 2013.
- 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 Evolution*, 28, 2731–2739.
- Taylor, E.H. 1962. The amphibian fauna of Thailand. *University of Kansas Science Bulletin*, 43, 267–599.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R. & Vieites, D. 2005a. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: Chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, 360, 1859–1868.
- Vences, M., Thomas, M. & Van der Meijden, A. 2005b. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers Zoology*, 2, 5.
- Vieites, D.R., Wollenberg, K.C., Andreone, F., Köhler, J., Glaw, F., & Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 8267–8272.
- Voris, H.K. 2000. Map of Pleistocene sea levels in Southeast Asia: shorelines, river systems and time durations. *Journal of Biogeography* 27: 1153–1167.
- Wiens, J.J., Sukumaran, J., Pyron, R.A. & Brown, R.M. 2009. Evolutionary and biogeographic origins of high tropical diversity in Old World frogs (Ranidae). *Evolution*, 63, 1217–1231.
- Wilkinson, J.A., Drewes, R.C. & Tatum, O.L. 2002. A molecular phylogenetic analysis of the family Rhacophoridae with an emphasis on Asian and African genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24, 265–273.
- Wilkinson, J.A., Win, H., Thin, T., Lwin, K.S., Shein, A.K. & Tun, H. 2003. A new species of *Chirixalus* (Anura: Rhacophoridae) from western Myanmar (Burma). *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 54, 17–26.
- Woodruff, D.S. and L.M. Turner. 2009. The Indochinese-Sundaic zoogeographic transition: a description and analysis of terrestrial mammal species distributions. *Journal of Biogeography* 36: 803–821.
- Yu, G., Rao, D., Yang, J. & Zhang, M. 2008. Phylogenetic relationships among Rhacophorinae (Rhacophoridae, Anura, Amphibia) with an emphasis on the Chinese species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 153, 733–749.
- Zhang, M.-W., D.-Q. Rao, J.-X. Yang, G.-H. Yu and J.A. Wilkinson. 2010. Molecular phylogeography and population structure of a mid-elevation montane frog

*Leptobracium ailaonicum* in a fragmented habitat of southwest China. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 47–58.

Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. 2nd edition. Prentice Hall, New Jersey, 736 pp.

Zug, G.R. 1993. *Herpetology: An Introduction Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press, California, USA.

ภาคผนวก 1. ข้อมูล 16S rRNA จาก GenBank ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ชนิด	ที่มาของตัวอย่าง	หมายเลขใน GenBank	เอกสารอ้างอิง
<i>C. vittatus</i>	Gia Lai, Vietnam	DQ283134	Li <i>et al.</i> (2009)
<i>C. vittatus</i>	Lao PDR	GQ204722	Meegaskumbura <i>et al.</i> (2010)
<i>C. vittatus</i>	Simao, Yunnan, China	EF564519	Yu <i>et al.</i> (2008)
<i>C. vittatus</i>	Simao, Yunnan, China	GQ285684	Li <i>et al.</i> (2009)
<i>C. xerampelina</i>	Africa	GQ204734	Meegaskumbura <i>et al.</i> (2010)
<i>C. xerampelina</i>	Africa	AY880495	Delorme (2004)
<i>C. rufensens</i>	Africa	AY880494	Delorme (2004)
<i>Feihyla palpebralis</i>	Mt. Dawei, Yunnan, China	EU215546	Li <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhacophorus bipunctatus</i>	Ha Tinh, Vietnam	AY843750	Faivovich <i>et al.</i> (2005)
<i>R. bipunctatus</i>	Chin State, Myanmar	JX219444	Li <i>et al.</i> (2012)
<i>R. kio</i>	Xishuangbanna, Yunnan, China	EU215532	Li <i>et al.</i> (2008)
<i>Polypedates cruciger</i>	Sri Langka	GQ204692	Meegaskumbura <i>et al.</i> (2010)
<i>P. leucomystax</i>	Depok, Java, Indonesia	AB564288	Kuraishi <i>et al.</i> (2011)
<i>P. leucomystax</i>	Huidong, Guangdong, China	EU215550	Li <i>et al.</i> (2008)
<i>P. megacephalus</i>	Hong Kong, China	AB564284	Kuraishi <i>et al.</i> (2011)
<i>Buergeria buergeri</i>	Japan	AY880444	Delorme <i>et al.</i> (2004)

## ภาคผนวก

- (1) แบบรายงานสรุปผลการใช้จ่ายเงินวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. (สวพ-ง-2)
- (2) ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ