รายงานผลการดำเนินงาน
ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยใช้นิวเคลียร์ยีนเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ

ผู้รับผิดชอบโครงการ
อาจารย์ ดร. อัมพร วิเวกแว่ว

รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยใช้นิวเคลียร์ยีนเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ

Genetic variation and genetic assessment of possible natural hybridization among *Microhyla fissipes*, *M. heymonsi* and *M. butleri* in Khao Khew Open Zoo, Chonburi province using nuclear gene as DNA marker

อาจารย์ ดร. อัมพร วิเวกแว่ว
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฏฐ์ คนซื่อ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ คุณรชตะ มณีอินทร์และคุณนายธงชัย ฐิติภูรี ที่ช่วยเก็บตัวอย่างอึ่งในการศึกษาครั้งนี้, คุณรังสินี สันคม ที่ช่วยสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อยู่ในสกุลเดียวกัน มีขนาดตัวใกล้เคียงกันและมีการกระจายอยู่ในทุกภาคของประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้สนใจตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน 28S rRNA และประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยนำอึ่งน้ำเต้าจำนวน 19 ตัว อึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัว และอึ่งลายเลอะจำนวน 6 ตัว มาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีน 28S rRNA ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งทั้งสามชนิดจำนวน 34 ตัวอย่างให้ผล sequencing ชัดเจนและน่าเชื่อถือ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 739 คู่เบส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DnaSP พบจำนวนแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกันจำนวน 3 แฮพโพลไทป์ ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 9 (1.22%) ตำแหน่ง มีค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ไม่สูงมาก โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.620 ± 0.053 และ 0.00558 ± 0.00053 ตามลำดับ ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดอยู่ระหว่าง 0.007 ถึง 0.011 แสดงว่าอึ่งทั้งสามชนิดมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของยีน 28S rRNA แต่ความแตกต่างดังกล่าวค่อนข้างต่ำ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group และไม่พบการเกิด gene flow หรือ introgression ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิด

คำสำคัญ: การแปรผันทางพันธุกรรม, นิวเคลียร์ดีเอ็นเอ, สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก , 28S ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ

Abstract

Ornate chorus frog (*Microhyla fissipes*), dark-sided chorus frog (*M. heymonsi*) and noisy chorus frog (*M. butleri*) are amphibians of the same genus. They are similar in body size, found all over Thailand and share their habitats. This study aims to investigate genetic variation and detect possible natural hybridization among these three microhylid frogs in Khao Khew Open Zoo area, Chonburi province. Nineteen *M. fissipes*, ten *M. heymonsi* and six *M. butleri* individuals were used for DNA extraction, PCR amplification of 28S rRNA gene and DNA sequencing. The results showed that only thirty-four samples had reliable 28S rRNA sequences. By using DnaSP program, we found 9 variable sites (1.22%) from 739 bps of the aligned sequences, resulting in 3 unique haplotypes. Overall diversity indices were 0.620 ± 0.053 and 0.00558 ± 0.00053 for haplotype diversity and nucleotide diversity respectively. The genetic distance between populations ranged from 0.007 to 0.011, indicating low genetic variation among the analyzed populations. Moreover, analysis of phylogenetic relationships revealed that *M. fissipes*, *M. heymonsi* and *M. butleri* are monophyletic with no detections of gene flow between species.

Keywords: genetic variation, nuclear DNA, amphibians, 28S ribosomal RNA

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	5
ผลการศึกษา	11
สรุปและวิจารณ์ผล	26
เอกสารอ้างอิง	28
ประวัตินักวิจัยและคณะ	30

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	8
ตารางที่ 2	แสดงผลการเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนยีน 28S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	11
ตารางที่ 3	แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว.....	22

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 2 ตัว ที่ได้จากการทำ gradient PCR amplification เพื่อหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 28S rRNA ด้วยไพร์เมอร์ 28SV และ 28SJJ.....	12
รูปที่ 2	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า จำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส.....	12
รูปที่ 3	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า จำนวน 9 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส.....	13
รูปที่ 4	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัว และอึ่งลายเลอะจำนวน 6 ตัว จำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส.....	13
รูปที่ 5	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 28S rRNA ความยาว 730 bp จำนวน 39 ตัวอย่าง จากประชากรของอึ่งน้ำเต้า (MFKK) อึ่งข้างดำ (MHKK) และอึ่งลายเลอะ (MBKK) เทียบกับ outgroup ได้แก่ *M. achatina* และ *G. molossus*.....	15
รูปที่ 6	แสดงค่า genetic distance ระหว่างและภายในประชากรของอึ่งน้ำเต้า (MFKK) อึ่งข้างดำ (MHKK) และอึ่งลายเลอะ (MBKK) จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวน 34 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 739 bps.....	21

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 7	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ที่สร้างโดยวิธี Neighbor-Joining โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 730 bps ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *Microhyla achatina* และ *Glyphoglossus molossus* เป็น outgroup.....	24
รูปที่ 8	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 730 bps ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *Microhyla achatina* และ *Glyphoglossus molossus* เป็น outgroup.....	25

การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยใช้นิวเคลียร์ยีนเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ

GENETIC VARIATION AND GENETIC ASSESSMENT OF POSSIBLE NATURAL HYBRIDIZATION AMONG *Microhyla fissipes*, *M. heymosi* AND *M. butleri* IN KHAO KHEW OPEN ZOO, CHONBURI PROVINCE USING NUCLEAR GENE AS DNA MARKER

อัมพร วิเวกแว่ว และ วิเชฏฐ์ คนซื่อ
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

ปัจจุบันได้มีการศึกษาพบว่าสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ ที่มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ (closely related species) มักมีการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete reproductive isolation) (Arnold, 1997, 2006) ดังนั้นเมื่อสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีการกระจายตัวทับซ้อนกัน (overlapping ranges) หรือเข้ามาอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกัน (contact zone or sympatry) จึงมีโอกาสเสี่ยงที่จะเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์หรือ interspecific hybridization ได้ (Futuyma, 1997) ซึ่งการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์นี้อาจนำไปสู่การผลิตลูกผสม (hybrid) ที่มีชีวิตและไม่เป็นหมันได้ ทั้งนี้หากเหตุการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นจริง ลูกผสมเหล่านั้นอาจทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดยีนจากประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งไปยังประชากรของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งได้ หรือที่เรียกว่าการเกิดยีนโฟลว์หรืออินโทเกรสชั่น (gene flow or introgression) นั่นเอง (Mallet, 2005) ซึ่งการเกิด gene flow or introgression นั้นสามารถตรวจสอบได้โดยอาศัยเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biology) ควบคู่ไปกับการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา เช่น การตรวจสอบยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตร่วมกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตจากลักษณะภายนอก ถ้าสิ่งมีชีวิตนั้นเป็น

ลูกผสม สิ่งมีชีวิตนั้นจะมีชนิดของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ไม่สอดคล้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นโดยใช้ลักษณะภายนอก (e.g. Alves et al., 2008; Plötner et al., 2008; Klymus et al., 2010)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนิยมนำมาเป็นโมเดลในการศึกษาเรื่องการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์และการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นสัตว์ที่สามารถพบได้ทุกทวีปทั่วโลก โดยเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากบนา 2 สปีชีส์ คือ *Rana limnocharis* และ *R. cancrivora* สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้และสามารถผลิตลูกผสมที่ไม่เป็นหมันอีกด้วย (Sumida, et al., 2002) การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงสนใจการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งสามชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการในประเทศไทย ได้แก่ อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในพื้นที่บริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีรายงานพบอึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้อาศัยอยู่ร่วมกัน (sympatric area) (Wichase Khonsue, person communication) อนึ่งจากการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวก่อนหน้านี้ โดยทำการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้น ผลการศึกษาพบการเกิด gene flow หรือ introgression ของ mitochondrial DNA จากประชากรของอึ่งข้างดำสู่ประชากรของอึ่งน้ำเต้าในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำสามารถผสมข้ามสายพันธุ์ในธรรมชาติได้ (Wiwegweaw & Khonsue, unpublished data) แต่เนื่องจากการศึกษาดังกล่าวเป็นการศึกษาเบื้องต้นและยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับการเกิด gene flow หรือ introgression ของ nuclear DNA ระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิด ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจตรวจสอบการเกิด gene flow และการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยใช้ nuclear gene เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ ทั้งนี้เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประกอบการวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอต่อไป

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีรายงานพบว่าสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ ที่มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ (closely related species) มักมีการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete reproductive isolation) (Arnold, 1997, 2006) ดังนั้นเมื่อสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีการกระจายตัวทับซ้อนกัน (overlapping ranges) หรือเข้ามาอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกัน (contact zone or sympatry) จึงมีโอกาสเสี่ยงที่จะเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์หรือ interspecific hybridization ได้ (Futuyma, 1997) ในบางกรณีการผสมข้ามสายพันธุ์อาจนำไปสู่การผลิตลูกผสม (hybrid) โดยลูกผสมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะมีลักษณะสัณฐานภายนอกก้ำกึ่ง (intermediate) ระหว่างสิ่งมีชีวิตสองชนิดที่ผสมข้ามสายพันธุ์กัน ทั้งนี้ถ้าลูกผสมที่เกิดขึ้นสามารถมีชีวิตอยู่รอด

และสืบพันธุ์ได้ ลูกผสมเหล่านั้นอาจทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดยีนจากประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งไปยังประชากรของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งได้โดยการผสมพันธุ์แบบ backcross กับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่ (gene flow or introgression) (e.g., Barton & Hewitt, 1985; Mallet, 2005; Plotner et al., 2008) ซึ่งการเกิด gene flow or introgression สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular biology) ปัจจุบันมีรายงานพบการผสมข้ามสายพันธุ์และ introgression ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ในปลา (e.g. Wilson & Bernatchez, 1998), ในกระต่ายป่า (e.g. Alves et al., 2008; Plötner et al., 2008), ในหนู (Bozikova et al., 2005) และในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Spolsky & Uzzell, 1984; Sumida, et al., 2002)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนิยมนำมาเป็นโมเดลในการศึกษาเรื่องการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์และการเกิดการผสมข้ามสายพันธ์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นสัตว์ที่สามารถพบได้ทุกทวีปทั่วโลก โดยเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย อึ่งน้ำเต้า (Ornate chorus frog; *Microhyla fissipes* Boulenger, 1884) อึ่งข้างดำ (Dark-sided chorus frog; *M. heymonsi* Vogt, 1911) และอึ่งลายเลอะ (Noisy chorus frog; *M. butleri* Boulenger, 1900) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ จัดอยู่ในสกุลเดียวกัน คือ *Microhyla* อึ่งน้ำเต้า มีความยาวประมาณ 28 มิลลิเมตร กลางหลังมีลายคล้ายรูปน้ำเต้าสีน้ำตาลเข้ม ข้างหัวและลำตัวมีแถบสีดำด้าน อึ่งข้างดำ มีความยาวประมาณ 20-22 มิลลิเมตร กลางหลังมีเส้นแคบสีจาง พาดมาตามแนวสันหลัง 1 เส้น ระหว่างเส้นอาจมีจุดประกบ ข้างละจุด และอึ่งลายเลอะ มีความยาวประมาณ 22-26 มิลลิเมตร กลางหลังมีลวดลายสมมาตรกัน ขอบของลายหยักเป็นคลื่นสีจางลงมาถึงสีข้างและเป็นลายพาดมาที่ขา (ธัญญา, 2546; วิเชฏฐ์และคณะ 2546) จากข้อมูลดังกล่าวจะพบว่าอึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้มีขนาดลำตัวไม่แตกต่างกัน มีลักษณะสัณฐานภายนอกคล้ายคลึงกัน และสามารถพบอึ่งทั้งสามชนิดได้ทุกภาคของประเทศไทย (Matsui, et al., 2011; ธัญญา, 2546; วิเชฏฐ์และคณะ 2546) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบอึ่งทั้งสามชนิดอาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกัน (sympatric area) เช่น ในบริเวณอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี พบอึ่งทั้งสามชนิดอยู่ในบริเวณเดียวกันจำนวนมากโดยเฉพาะในฤดูฝน (วิเชฏฐ์และคณะ 2546) และที่สำคัญการที่อึ่งทั้งสามชนิดมีการปฏิสนธิแบบภายนอก (external fertilization) ทำให้โอกาสที่จะเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์กันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดเป็นไปได้สูงกว่าการปฏิสนธิแบบภายใน (internal fertilization) เพราะการปฏิสนธิแบบภายนอกเป็นการเพิ่มโอกาสให้สเปิร์มของอึ่งชนิดหนึ่งเข้าผสมกับไข่ของอึ่งอีกชนิดหนึ่งได้ง่าย (Huxel, 1999) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจึงเกิดคำถามขึ้นว่าอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันในธรรมชาติได้หรือไม่ จากการศึกษาเบื้องต้น ในปี พ.ศ. 2555 โดยการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ โดยใช้ยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบการเกิด gene flow หรือ introgression ระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดที่เก็บมาจากพื้นที่บริเวณอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยทั้งสองพื้นที่จัดเป็น sympatric area ที่

สามารถพบอึ่งทั้งสามชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน ผลการศึกษาพบการเกิด gene flow หรือ introgression ของ mitochondrial DNA จากประชากรของอึ่งข้างดำสู่ประชากรของอึ่งน้ำเต้าในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำสามารถผสมข้ามพันธุ์ในธรรมชาติได้ (Wiwegweaw & Khonsue, unpublished data) แต่เนื่องจากการศึกษาดังกล่าวเป็นการศึกษาเบื้องต้นและยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับการเกิด gene flow หรือ introgression ของ nuclear DNA ระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิด ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจตรวจสอบการเกิด gene flow และการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยใช้ nuclear gene เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ ทั้งนี้เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประกอบการวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ทั้งภายในและระหว่างประชากร ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิด ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยใช้ยีนจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ

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

- FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech corp., Taiwan)
- MilliQ
- 10 µM 28SV primer (forward primer)
- 10 µM 28SJJ primer (reverse primer)
- 100 bp + 1.5 kb DNA ladder (SibEnzyme)
- Loading Dye (SibEnzyme)
- Agarose (Promega corporation, USA)
- SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen™)
- Sterile water
- Absolute ethanol (Merck, Germany)

เอนไซม์

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

3.2 สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

เก็บตัวอย่างอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี จำนวนชนิดละประมาณ 10-40 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่เก็บมาได้จะถูกเก็บรักษาตัวอย่างไว้ใน 95% เอธานอล เพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3.3 ขั้นตอนการทดลอง

ประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลักๆ ได้แก่

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

3.3.2 การเพิ่มจำนวนยีน 28S rRNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ (DNA amplification)

3.3.3 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

3.3.4 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

3.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple sequence alignment and genetic analyses)

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตับของอึ่งทั้งสามชนิดโดยใช้ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit ตาม protocol: DNA Extraction from tissue ดังขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) ใช้กรรไกรตัดเนื้อเยื่อตับของอึ่งแต่ละชนิด ขนาดประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2) เติม FATG1 Buffer 200 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ 11 mg/ml Proteinase K ปริมาณ 9 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เท็ก (Vortex Mixer) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ระหว่างการบ่มให้ นำไปวอร์เท็กใน 30 นาทีแรก
3) เติม FATG2 Buffer 200 ไมโครลิตร นำไปวอร์เท็กเพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4) เติม 100% Ethanol 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวอร์เท็ก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5) ประกอบมินิคอลัมน์ (Mini column) ลงในหลอดคอลเลคชั่น (Collection tube) จากนั้นนำตัวอย่างเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายใสปริมาณ 540 ไมโครลิตร ลงในมินิคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอในสารละลายจับตัวกับเมมเบรนในหลอดมินิคอลัมน์
6) ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำออกจากหลอดคอลเลคชั่น แล้วนำมินิคอลัมน์สวมลงในหลอดคอลเลคชั่นดังเดิม จากนั้นเติม W1 Buffer 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น
7) ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำออกจากหลอดคอลเลคชั่น แล้วเติม WASH Buffer 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
8) เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ของเหลวทั้งหมดตกลงในหลอดคอลเลคชั่น
9) นำเฉพาะมินิคอลัมน์สวมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรงกลางของมินิคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้มินิคอลัมน์ดูดซับ Elution Buffer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์
10) ทำการเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.2. การเพิ่มจำนวนยีน 28S rRNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ (DNA amplification)

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) มีชื่อเต็มว่าเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอให้มีปริมาณมากมายหลายเท่า ในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอเดิม โดยใช้เครื่อง PCR machine หรือ Thermal cycler เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยา โดยในการศึกษาครั้งนี้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณยีน 28S rRNA (28S ribosomal RNA) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ไปจับกับบริเวณดังกล่าว โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 28SV และ 28SJJ (de Sá et al., 2012) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อ primer (Forward/Reverse)	ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (5’ - 3’)	ความยาว (bp)	TM (°C)
28SV	AAGGTAGCCAAATGCCTCATC	21	59.4
28SJJ	AGTAGGGTAAAACTAACCT	19	50.9

จากนั้นทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อไปตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

เตรียมส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยจะใช้ปริมาณสารต่างๆ ในแต่ละหลอดดังนี้

Total DNA template	5.0	µl
10 µM 28SV	2.5	µl
10 µM 28SJJ	2.5	µl
MilliQ water	15.0	µl
EmeraldAmp® Max PCR Master Mix	25.0	µl
Total volume	50.0	µl

สังเคราะห์ยีนเป้าหมายโดยใช้เครื่อง DNA Thermal Cycler PCR โดยกำหนดโปรแกรมให้มีสภาวะพีซีอาร์ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	Initial denaturation	94°C	4 นาที
ขั้นตอนที่ 2	Denaturation	94°C	1 นาที
	Annealing	60°C	1 นาที
	Extension	72°C	1 นาที

ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยทั้งสิ้น 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 Final extension 72°C 10 นาที

นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycler และเดินเครื่อง

3.3.3 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียม 0.7% agarose gel โดย ชั่งผง agarose หนัก 0.35 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติม 1X TBE buffer 50 ml เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที เติม SYBR® Safe DNA gel stain 2 µl เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้หายร้อนแล้วเท agarose gel solution ลงใน tray และใส่ comb ลงไป ตั้งทิ้งไว้ให้ agarose gel แข็งตัวประมาณ 30 นาที แล้วดึง comb ออก จากนั้นนำถาดเจลไปวางลงใน 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 และถ่ายภาพเจลด้วยกล้องดิจิตอล

3.3.4 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

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

3.3.5 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 ของอึ่งทั้งสามชนิดภายในประชากรเดียวกันและระหว่างประชากร โดยใช้โปรแกรม Mega version 5.05 (www.megasoftware.net) (Tamura et al, 2011) ใช้โปรแกรม DnaSP5 (www.ub.edu/dnasp) (Rozas et al, 2003) สำหรับคำนวณค่า Haplotype Diversity และ Nucleotide Diversity วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยอาศัยวิธี Neighbor-Joining และ Maximum Likelihood method โดยคำนวน bootstrap percentage 1,000 ครั้ง เพื่อสนับสนุน tree ที่ได้ ด้วยโปรแกรม Mega

version 6.06 โดยใช้ *Microhyla achatina* (Genbank accession number KC179909) และ *Glyphoglossus molossus* (KC179884) เป็น outgroup ของการศึกษา นอกจากนี้ยังได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของอึ่งน้ำเต้า (KC179913) อึ่งข้างดำ (KC179912) และ อึ่งลายเลอะ (KC179911) ที่ได้จากการ Blast เทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GenBank มาใช้ร่วมในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอีกด้วย

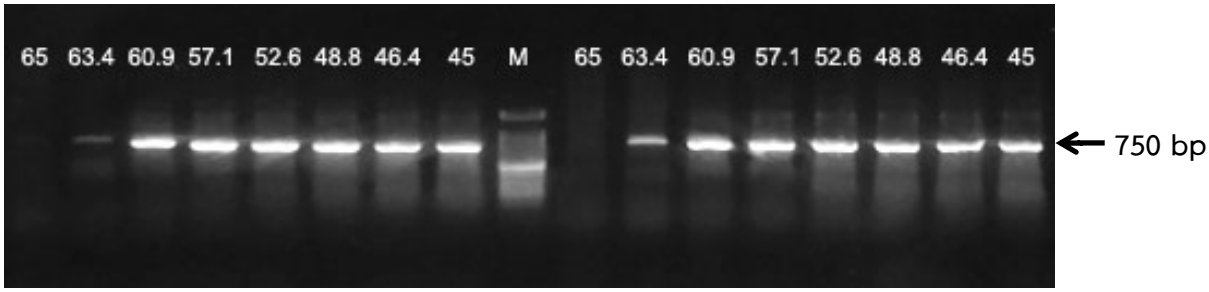
ผลการศึกษา

1. ผลการเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณยีน 28S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรีที่ได้เก็บตัวอย่างมาแล้วสำหรับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Wiwegweaw & Khonsue, 2014 unpublished data) มาใช้ในการศึกษาวิจัย โดยการวิจัยครั้งนี้ได้สุ่มตัวอย่าง (จากตัวอย่างทั้งหมด) อึ่งน้ำเต้าจำนวน 19 ตัว อึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัว และอึ่งลายเลอะจำนวน 6 ตัว มาทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีน 28S ribosomal RNA ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ 28SV และ 28SJJ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และตรวจสอบขนาด PCR product ที่ได้โดย 0.7% agarose gel electrophoresis ผลการศึกษาพบว่าจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด มีเพียง 34 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ผล PCR product ที่ต้องการ (ตารางที่ 2) โดย PCR product ที่ต้องการมีขนาดประมาณ 750 คู่เบส (รูปที่ 1-4)

ตารางที่ 2 แสดงผลการเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนยีน 28S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

	อึ่งน้ำเต้า	อึ่งข้างดำ	อึ่งลายเลอะ	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	19	10	6	35
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เป็นแถบสีเข้มชัดเจน	18	10	6	34
จำนวนตัวอย่างที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ชัดเจนและน่าเชื่อถือ	18	10	6	34

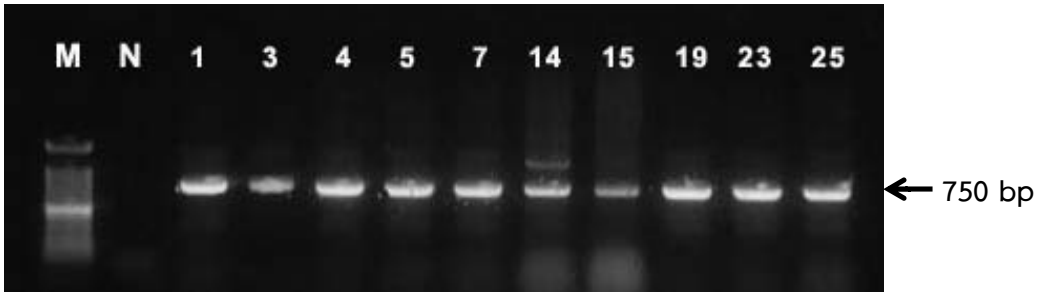


รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 2 ตัว ที่ได้จากการทำ gradient PCR amplification เพื่อหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 28S rRNA ด้วยไพร์เมอร์ 28SV และ 28SJJ ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส

Lane 1-8 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า (MFKK21) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR โดยใช้ annealing temperature ระหว่าง 65-45˚C

Lane 9-16 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า (MFKK23) ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR โดยใช้ annealing temperature ระหว่าง 65-45˚C

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

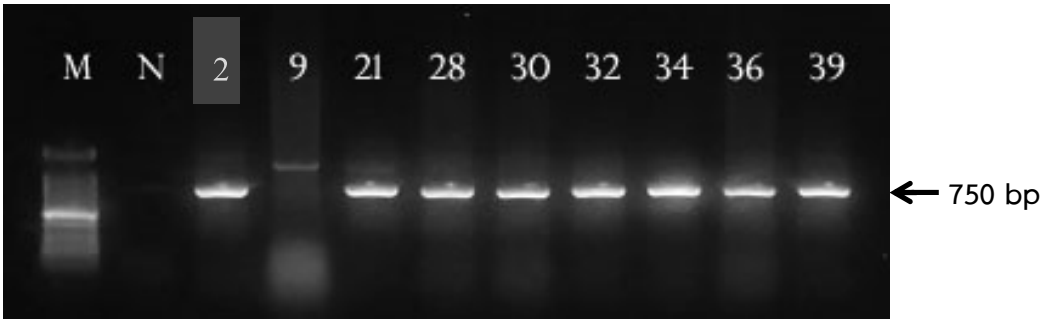


รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส

Lane 1-10 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 10 ตัว (ตัวอย่างที่ MFKK1, 3, 4, 5, 7, 14, 15, 19, 23 และ 25 ตามลำดับ)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control

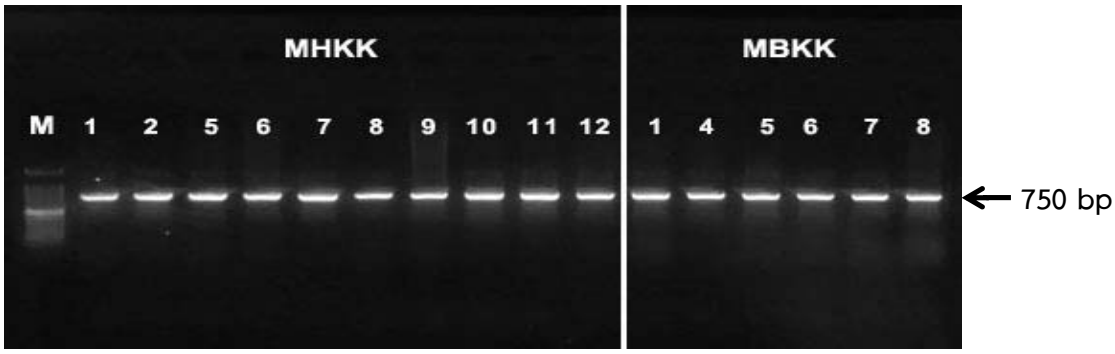


รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 9 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส

Lane 1-9 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 9 ตัว (ตัวอย่างที่ MFKK2, 9, 21, 28, 30, 32, 34, 36 และ 39 ตามลำดับ)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัวและอึ่งลายเลอะจำนวน 6 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส

Lane 1-10 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัว (ตัวอย่างที่ MHKK1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ)

Lane 11-16 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งลายเลอะจำนวน 6 ตัว (ตัวอย่างที่ MBKK1, 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

2. ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ

จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 28S rRNA ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรีจำนวน 34 ตัวอย่าง พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 18 ตัวอย่าง อึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัวอย่าง และอึ่งลายเลอะจำนวน 6 ตัวอย่างให้ผล sequencing ชัดเจนและไม่เกิดการซ้อนทับกันของลำดับเบส (ตารางที่ 2) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 739 คู่เบส มีเบสที่มีเปอร์เซ็นต์ G+C เฉลี่ยเท่ากับ 0.564 ซึ่งมี nucleotide composition เป็น: T(21.3%), C(26.2%), A(22.2%) และ G(30.3%)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DnaSP พบจำนวน haplotype ที่แตกต่างกันจำนวน 3 haplotype ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 9 (1.22%) ตำแหน่ง (รูปที่ 5; ตารางที่ 3) มี parsimony informative sites จำนวน 9 ตำแหน่ง นอกจากนี้ในการหาค่า genetic distance โดยวิธี Kimura two parameter พบว่าระหว่างประชากรของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ มีค่า genetic distance อยู่ระหว่าง 0.007 ถึง 0.011 (รูปที่ 6) โดยค่า genetic distance ภายในประชากรของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ มีค่าเท่ากับศูนย์ เนื่องจากไม่พบความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน 28S rRNA ภายในประชากรของอึ่งแต่ละชนิด (ตารางที่ 3)

การคำนวณค่าต่างๆ ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ในแต่ละประชากร ได้แก่ จำนวนตัวอย่าง (n), จำนวน variable site (v), จำนวนของ haplotype (h), haplotype diversity (hd) และ π = nucleotide diversity แสดงไว้ในตารางที่ 3 หากพิจารณาจากทุกประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดจะพบว่า โดยเฉลี่ยค่า haplotype diversity (hd) และค่า nucleotide diversity (π) มีค่าไม่สูงมาก โดยเฉลี่ย hd = 0.620 ± 0.053 และ π = 0.00558 ± 0.00053

```
                    *       20        *       40        *       60        *       80
MBKK1       : TCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATGAACGAGATTCCCACTGTCCCTACCTACTATCTAGCGAAACCACAGCCAA :  80
MBKK4       : ................................................................................ :  80
MBKK5       : ................................................................................ :  80
MBKK6       : ................................................................................ :  80
MBKK7       : ................................................................................ :  80
MBKK8       : ................................................................................ :  80
KC179911    : ................................................................................ :  80
MFKK39      : ................................................................................ :  80
KC179913    : ................................................................................ :  80
MFKK36      : ................................................................................ :  80
MFKK34      : ................................................................................ :  80
MFKK32      : ................................................................................ :  80
MFKK30      : ................................................................................ :  80
MFKK28      : ................................................................................ :  80
MFKK25      : ................................................................................ :  80
MFKK23      : ................................................................................ :  80
MFKK21      : ................................................................................ :  80
MFKK19      : ................................................................................ :  80
MFKK15      : ................................................................................ :  80
MFKK14      : ................................................................................ :  80
MFKK7       : ................................................................................ :  80
MFKK5       : ................................................................................ :  80
MFKK4       : ................................................................................ :  80
MFKK3       : ................................................................................ :  80
MFKK2       : ................................................................................ :  80
MFKK1       : ................................................................................ :  80
MHKK1       : ................................................................................ :  80
MHKK2       : ................................................................................ :  80
MHKK5       : ................................................................................ :  80
MHKK6       : ................................................................................ :  80
MHKK7       : ................................................................................ :  80
MHKK8       : ................................................................................ :  80
MHKK9       : ................................................................................ :  80
MHKK10      : ................................................................................ :  80
MHKK11      : ................................................................................ :  80
MHKK12      : ................................................................................ :  80
KC179912    : ................................................................................ :  80
M. achatina : .......................Y........................................................ :  80
G. molossus : ................................................................................ :  80

                    *       100       *       120       *       140       *       160
MBKK1       : GGGAACGGGCTTGGCGGAATCAGCGGGGAAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGACTCTAGTCTGCAACTGTGAAGAGACATGA : 160
MBKK4       : ................................................................................ : 160
MBKK5       : ................................................................................ : 160
MBKK6       : ................................................................................ : 160
MBKK7       : ................................................................................ : 160
MBKK8       : ................................................................................ : 160
KC179911    : ................................................................................ : 160
MFKK39      : ................................................................................ : 160
KC179913    : ................................................................................ : 160
MFKK36      : ................................................................................ : 160
MFKK34      : ................................................................................ : 160
MFKK32      : ................................................................................ : 160
MFKK30      : ................................................................................ : 160
MFKK28      : ................................................................................ : 160
MFKK25      : ................................................................................ : 160
MFKK23      : ................................................................................ : 160
MFKK21      : ................................................................................ : 160
MFKK19      : ................................................................................ : 160
MFKK15      : ................................................................................ : 160
MFKK14      : ................................................................................ : 160
MFKK7       : ................................................................................ : 160
MFKK5       : ................................................................................ : 160
MFKK4       : ................................................................................ : 160
MFKK3       : ................................................................................ : 160
MFKK2       : ................................................................................ : 160
MFKK1       : ................................................................................ : 160
MHKK1       : ................................................................................ : 160
MHKK2       : ................................................................................ : 160
MHKK5       : ................................................................................ : 160
MHKK6       : ................................................................................ : 160
MHKK7       : ................................................................................ : 160
MHKK8       : ................................................................................ : 160
MHKK9       : ................................................................................ : 160
MHKK10      : ................................................................................ : 160
MHKK11      : ................................................................................ : 160
MHKK12      : ................................................................................ : 160
KC179912    : ................................................................................ : 160
M. achatina : ................................................................................ : 160
G. molossus : ..............A................................................................. : 160
```

```
                    *       180         *       200         *       220         *       240
MBKK1       : GAGGTGTAGGATAAGTGGGAGGCCCTCGCCCGCCACCCCCTCCGCGGGGTCGGGCCCGGGGAGCCGCCGGTGAAATACCA : 240
MBKK4       : ................................................................................ : 240
MBKK5       : ................................................................................ : 240
MBKK6       : ................................................................................ : 240
MBKK7       : ................................................................................ : 240
MBKK8       : ................................................................................ : 240
KC179911    : ..................................T............................................. : 240
MFKK39      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
KC179913    : .........A.......................G..TTT---.....C.............................. : 236
MFKK36      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK34      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK32      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK30      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK28      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK25      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK23      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK21      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK19      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK15      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK14      : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK7       : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK5       : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK4       : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK3       : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK2       : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MFKK1       : .........A.......................G...TT---.....C.............................. : 236
MHKK1       : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
MHKK2       : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
MHKK5       : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
MHKK6       : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
MHKK7       : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
MHKK8       : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
MHKK9       : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
MHKK10      : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
MHKK11      : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
MHKK12      : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
KC179912    : .........A.....................T--T..TT---....-.............................. : 233
M. achatina : ........................C......T--....G-------.---.....A..................... : 231
G. molossus : .........A..............C......T--....G-------.---.....A..................... : 231

                    *       260         *       280         *       300         *       320
MBKK1       : CTACTCTTATCGTTTTTTCACTTACCCGGTGAGGCGGGGGGGCGAGCCCCGAGCGGGCTCTCGCTTCTGGCTCCAAGCGC : 320
MBKK4       : ................................................................................ : 320
MBKK5       : ................................................................................ : 320
MBKK6       : ................................................................................ : 320
MBKK7       : ................................................................................ : 320
MBKK8       : ................................................................................ : 320
KC179911    : ................................................................................ : 320
MFKK39      : ................................................................................ : 316
KC179913    : ................................................................................ : 316
MFKK36      : ................................................................................ : 316
MFKK34      : ................................................................................ : 316
MFKK32      : ................................................................................ : 316
MFKK30      : ................................................................................ : 316
MFKK28      : ................................................................................ : 316
MFKK25      : ................................................................................ : 316
MFKK23      : ................................................................................ : 316
MFKK21      : ................................................................................ : 316
MFKK19      : ................................................................................ : 316
MFKK15      : ................................................................................ : 316
MFKK14      : ................................................................................ : 316
MFKK7       : ................................................................................ : 316
MFKK5       : ................................................................................ : 316
MFKK4       : ................................................................................ : 316
MFKK3       : ................................................................................ : 316
MFKK2       : ................................................................................ : 316
MFKK1       : ................................................................................ : 316
MHKK1       : ................................................................................ : 313
MHKK2       : ................................................................................ : 313
MHKK5       : ................................................................................ : 313
MHKK6       : ................................................................................ : 313
MHKK7       : ................................................................................ : 313
MHKK8       : ................................................................................ : 313
MHKK9       : ................................................................................ : 313
MHKK10      : ................................................................................ : 313
MHKK11      : ................................................................................ : 313
MHKK12      : ................................................................................ : 313
KC179912    : ................................................................................ : 313
M. achatina : ................................................................................ : 311
G. molossus : ................................................................................ : 311
```

```
                    *       340         *       360         *       380         *       400
MBKK1       : CCCGG-CCCCCGCG--CCGGGCGCGACCCGCTCCGGGGACAGTGGCAGGTGGGGAGTTTGACTGGGGCGGTACACCTGTC : 397
MBKK4       : .....-.........--.................................................................. : 397
MBKK5       : .....-.........--.................................................................. : 397
MBKK6       : .....-.........--.................................................................. : 397
MBKK7       : .....-.........--.................................................................. : 397
MBKK8       : .....-.........--.................................................................. : 397
KC179911    : .....-.........--.................................................................. : 397
MFKK39      : .....-.........--.................................................................. : 393
KC179913    : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK36      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK34      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK32      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK30      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK28      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK25      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK23      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK21      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK19      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK15      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK14      : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK7       : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK5       : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK4       : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK3       : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK2       : .....-.........--.................................................................. : 393
MFKK1       : .....-.........--.................................................................. : 393
MHKK1       : .....-.........--.................................................................. : 390
MHKK2       : .....-.........--.................................................................. : 390
MHKK5       : .....-.........--.................................................................. : 390
MHKK6       : .....-.........--.................................................................. : 390
MHKK7       : .....-.........--.................................................................. : 390
MHKK8       : .....-.........--.................................................................. : 390
MHKK9       : .....-.........--.................................................................. : 390
MHKK10      : .....-.........--.................................................................. : 390
MHKK11      : .....-.........--.................................................................. : 390
MHKK12      : .....-.........--.................................................................. : 390
KC179912    : .....-.........--.................................................................. : 390
M. achatina : ..G.--.........--.................................................................. : 387
G. molossus : .....C........GT.G.................................................................. : 391

                    *       420         *       440         *       460         *       480
MBKK1       : AAACCGTAACGCAGGTGTCCTAAGGCGAGCTCAGGGAGGACAGAAACCTCCCGTGGAGCAGAAGGGCAAAAGCTCGCTTG : 477
MBKK4       : .................................................................................. : 477
MBKK5       : .................................................................................. : 477
MBKK6       : .................................................................................. : 477
MBKK7       : .................................................................................. : 477
MBKK8       : .................................................................................. : 477
KC179911    : .................................................................................. : 477
MFKK39      : .................................................................................. : 473
KC179913    : .................................................................................. : 473
MFKK36      : .................................................................................. : 473
MFKK34      : .................................................................................. : 473
MFKK32      : .................................................................................. : 473
MFKK30      : .................................................................................. : 473
MFKK28      : .................................................................................. : 473
MFKK25      : .................................................................................. : 473
MFKK23      : .................................................................................. : 473
MFKK21      : .................................................................................. : 473
MFKK19      : .................................................................................. : 473
MFKK15      : .................................................................................. : 473
MFKK14      : .................................................................................. : 473
MFKK7       : .................................................................................. : 473
MFKK5       : .................................................................................. : 473
MFKK4       : .................................................................................. : 473
MFKK3       : .................................................................................. : 473
MFKK2       : .................................................................................. : 473
MFKK1       : .................................................................................. : 473
MHKK1       : ...............................................................A.................. : 470
MHKK2       : ...............................................................A.................. : 470
MHKK5       : ...............................................................A.................. : 470
MHKK6       : ...............................................................A.................. : 470
MHKK7       : ...............................................................A.................. : 470
MHKK8       : ...............................................................A.................. : 470
MHKK9       : ...............................................................A.................. : 470
MHKK10      : ...............................................................A.................. : 470
MHKK11      : ...............................................................A.................. : 470
MHKK12      : ...............................................................A.................. : 470
KC179912    : ...............................................................A.................. : 470
M. achatina : .................................................................................. : 467
G. molossus : .................................................................................. : 471
```

```
                    *       500         *       520         *       540         *       560
MBKK1       : ATCTTGATTTTCAGTATGAATACAGACCGTGAAAGCGGGGCCTCACGATCCTTCTGACTTTTTGGGTTTTAAGCAGGAGG : 557
MBKK4       : ..................................................................................... : 557
MBKK5       : ..................................................................................... : 557
MBKK6       : ..................................................................................... : 557
MBKK7       : ..................................................................................... : 557
MBKK8       : ..................................................................................... : 557
KC179911    : ..................................................................................... : 557
MFKK39      : ..................................................................................... : 553
KC179913    : ..................................................................................... : 553
MFKK36      : ..................................................................................... : 553
MFKK34      : ..................................................................................... : 553
MFKK32      : ..................................................................................... : 553
MFKK30      : ..................................................................................... : 553
MFKK28      : ..................................................................................... : 553
MFKK25      : ..................................................................................... : 553
MFKK23      : ..................................................................................... : 553
MFKK21      : ..................................................................................... : 553
MFKK19      : ..................................................................................... : 553
MFKK15      : ..................................................................................... : 553
MFKK14      : ..................................................................................... : 553
MFKK7       : ..................................................................................... : 553
MFKK5       : ..................................................................................... : 553
MFKK4       : ..................................................................................... : 553
MFKK3       : ..................................................................................... : 553
MFKK2       : ..................................................................................... : 553
MFKK1       : ..................................................................................... : 553
MHKK1       : ..................................................................................... : 550
MHKK2       : ..................................................................................... : 550
MHKK5       : ..................................................................................... : 550
MHKK6       : ..................................................................................... : 550
MHKK7       : ..................................................................................... : 550
MHKK8       : ..................................................................................... : 550
MHKK9       : ..................................................................................... : 550
MHKK10      : ..................................................................................... : 550
MHKK11      : ..................................................................................... : 550
MHKK12      : ..................................................................................... : 550
KC179912    : ..................................................................................... : 550
M. achatina : ..................................................................................... : 547
G. molossus : ..................................................................................... : 551

                    *       580         *       600         *       620         *       640
MBKK1       : TGTCAGAAAAGTTACCACAGGGATAACTGGCTTGTGGCGGCCAAGCGTTCATAGCGACGTCGCTTTTTGATCCTTCGATG : 637
MBKK4       : ..................................................................................... : 637
MBKK5       : ..................................................................................... : 637
MBKK6       : ..................................................................................... : 637
MBKK7       : ..................................................................................... : 637
MBKK8       : ..................................................................................... : 637
KC179911    : ..................................................................................... : 637
MFKK39      : ..................................................................................... : 633
KC179913    : ..................................................................................... : 633
MFKK36      : ..................................................................................... : 633
MFKK34      : ..................................................................................... : 633
MFKK32      : ..................................................................................... : 633
MFKK30      : ..................................................................................... : 633
MFKK28      : ..................................................................................... : 633
MFKK25      : ..................................................................................... : 633
MFKK23      : ..................................................................................... : 633
MFKK21      : ..................................................................................... : 633
MFKK19      : ..................................................................................... : 633
MFKK15      : ..................................................................................... : 633
MFKK14      : ..................................................................................... : 633
MFKK7       : ..................................................................................... : 633
MFKK5       : ..................................................................................... : 633
MFKK4       : ..................................................................................... : 633
MFKK3       : ..................................................................................... : 633
MFKK2       : ..................................................................................... : 633
MFKK1       : ..................................................................................... : 633
MHKK1       : ..................................................................................... : 630
MHKK2       : ..................................................................................... : 630
MHKK5       : ..................................................................................... : 630
MHKK6       : ..................................................................................... : 630
MHKK7       : ..................................................................................... : 630
MHKK8       : ..................................................................................... : 630
MHKK9       : ..................................................................................... : 630
MHKK10      : ..................................................................................... : 630
MHKK11      : ..................................................................................... : 630
MHKK12      : ..................................................................................... : 630
KC179912    : ..................................................................................... : 630
M. achatina : ..................................................................................... : 627
G. molossus : ..................................................................................... : 631
```

```
                    *       660         *       680         *       700         *       720
MBKK1       : TCGGCTCTTCCTATCATTGTGAAGCAGAATTCACCAAGCGTTGGATTGTTCACCCACTAATAGGGAACGTGAGCTGGGTT : 717
MBKK4       : ..................................................................................... : 717
MBKK5       : ..................................................................................... : 717
MBKK6       : ..................................................................................... : 717
MBKK7       : ..................................................................................... : 717
MBKK8       : ..................................................................................... : 717
KC179911    : ..................................................................................... : 717
MFKK39      : ..................................................................................... : 713
KC179913    : ..................................................................................... : 713
MFKK36      : ..................................................................................... : 713
MFKK34      : ..................................................................................... : 713
MFKK32      : ..................................................................................... : 713
MFKK30      : ..................................................................................... : 713
MFKK28      : ..................................................................................... : 713
MFKK25      : ..................................................................................... : 713
MFKK23      : ..................................................................................... : 713
MFKK21      : ..................................................................................... : 713
MFKK19      : ..................................................................................... : 713
MFKK15      : ..................................................................................... : 713
MFKK14      : ..................................................................................... : 713
MFKK7       : ..................................................................................... : 713
MFKK5       : ..................................................................................... : 713
MFKK4       : ..................................................................................... : 713
MFKK3       : ..................................................................................... : 713
MFKK2       : ..................................................................................... : 713
MFKK1       : ..................................................................................... : 713
MHKK1       : ..................................................................................... : 710
MHKK2       : ..................................................................................... : 710
MHKK5       : ..................................................................................... : 710
MHKK6       : ..................................................................................... : 710
MHKK7       : ..................................................................................... : 710
MHKK8       : ..................................................................................... : 710
MHKK9       : ..................................................................................... : 710
MHKK10      : ..................................................................................... : 710
MHKK11      : ..................................................................................... : 710
MHKK12      : ..................................................................................... : 710
KC179912    : ..................................................................................... : 710
M. achatina : ..................................................................................... : 707
G. molossus : ..................................................................................... : 711

                    *
MBKK1       : TAGACCGTCGTGAGACA : 734
MBKK4       : ................. : 734
MBKK5       : ................. : 734
MBKK6       : ................. : 734
MBKK7       : ................. : 734
MBKK8       : ................. : 734
KC179911    : ................. : 734
MFKK39      : ................. : 730
KC179913    : ................. : 730
MFKK36      : ................. : 730
MFKK34      : ................. : 730
MFKK32      : ................. : 730
MFKK30      : ................. : 730
MFKK28      : ................. : 730
MFKK25      : ................. : 730
MFKK23      : ................. : 730
MFKK21      : ................. : 730
MFKK19      : ................. : 730
MFKK15      : ................. : 730
MFKK14      : ................. : 730
MFKK7       : ................. : 730
MFKK5       : ................. : 730
MFKK4       : ................. : 730
MFKK3       : ................. : 730
MFKK2       : ................. : 730
MFKK1       : ................. : 730
MHKK1       : ................. : 727
MHKK2       : ................. : 727
MHKK5       : ................. : 727
MHKK6       : ................. : 727
MHKK7       : ................. : 727
MHKK8       : ................. : 727
MHKK9       : ................. : 727
MHKK10      : ................. : 727
MHKK11      : ................. : 727
MHKK12      : ................. : 727
KC179912    : ................. : 727
M. achatina : ................. : 724
G. molossus : ................. : 728
```

รูปที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 28S rRNA ความยาว 730 bp จำนวน 39 ตัวอย่าง จากประชากรของอึ่งน้ำเต้า (MFKK) อึ่งข้างดำ (MHKK) และอึ่งลายเลอะ (MBKK) เทียบกับ outgroup ได้แก่ *M. achatina* และ *G. molossus* โดยเครื่องหมาย (.) แสดงตำแหน่งของเบสที่เหมือนกัน

	MFKK1	MFKK2	MFKK3	MFKK4	MFKK5	MFKK7	MFKK14	MFKK15	MFKK19	MFKK21	MFKK23	MFKK25	MFKK28	MFKK30	MFKK32	MFKK34	MFKK36	MFKK39	MBKK1	MBKK4	MBKK5	MBKK6	MBKK7	MBKK8	MHKK1	MHKK2	MHKK5	MHKK6	MHKK7	MHKK8	MHKK9	MHKK10	MHKK11	MHKK12
MFKK1																																		
MFKK2	0.000																																	
MFKK3	0.000	0.000																																
MFKK4	0.000	0.000	0.000																															
MFKK5	0.000	0.000	0.000	0.000																														
MFKK7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																													
MFKK14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																												
MFKK15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																											
MFKK19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																										
MFKK21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																									
MFKK23	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																								
MFKK25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																							
MFKK28	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																						
MFKK30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																					
MFKK32	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																				
MFKK34	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																			
MFKK36	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																		
MFKK39	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																	
MBKK1	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007																
MBKK4	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000															
MBKK5	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000	0.000														
MBKK6	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000	0.000	0.000													
MBKK7	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000												
MBKK8	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
MHKK1	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010										
MHKK2	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000									
MHKK5	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000								
MHKK6	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000							
MHKK7	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000						
MHKK8	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
MHKK9	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
MHKK10	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
MHKK11	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
MHKK12	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

รูปที่ 6 แสดงค่า genetic distance ระหว่างและภายในประชากรของอึ่งน้ำเต้า (MFKK) อึ่งข้างดำ (MHKK) และอึ่งลายเลอะ (MBKK) จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวน 34 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 739 bps

ตารางที่ 3 แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตัวอักษรย่อที่ใช้ในตาราง: N = จำนวนตัวอย่าง; V = จำนวนของ variable site; h = จำนวนของ haplotype; hd = haplotype diversity และค่าเบียงเบนมาตรฐาน (± S.D) และ π = nucleotide diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (± S.D)

ชนิดของอึ่ง	N	M	h	hd ± S.D.	π ± S.D.
อึ่งน้ำเต้า	18	0	1	0	0
อึ่งข้างดำ	10	0	1	0	0
อึ่งลายเลอะ	6	0	1	0	0
ทุกประชากร	**34**	**9**	**3**	**0.620 ± 0.053**	**0.00558 ± 0.00558**

หมายเหตุ

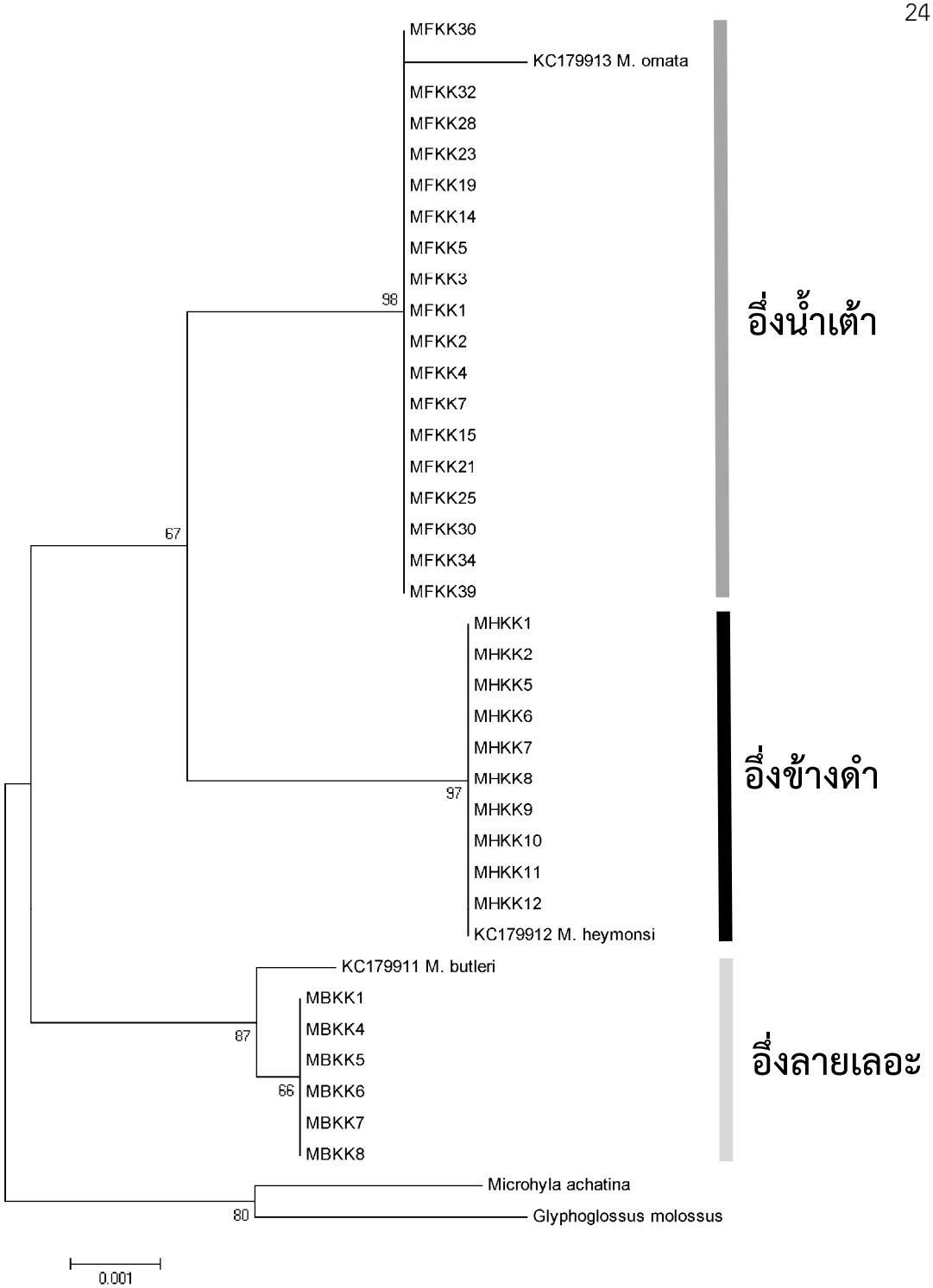
haplotype diversity (hd) หมายถึง จำนวนและความถี่ของ haplotype ที่แตกต่างกันที่พบในตัวอย่าง คำนวณจาก hd = (1 -$\sum$xi 2) n / (n -1) (Nei and Tajima, 1981) เมื่อ xi คือ ความถี่ของ haplotype และ n คือ จำนวนตัวอย่าง

nucleotide diversity (π) หมายถึง ค่าเฉลี่ยของจำนวน nucleotide ที่แตกต่างต่อ 1 ตำแหน่ง เทียบกับ sequence อื่นแบบสุ่ม คำนวณจาก π = n/(n – 1)$\sum$xixjπij (Nei 1987, equation 10.5)

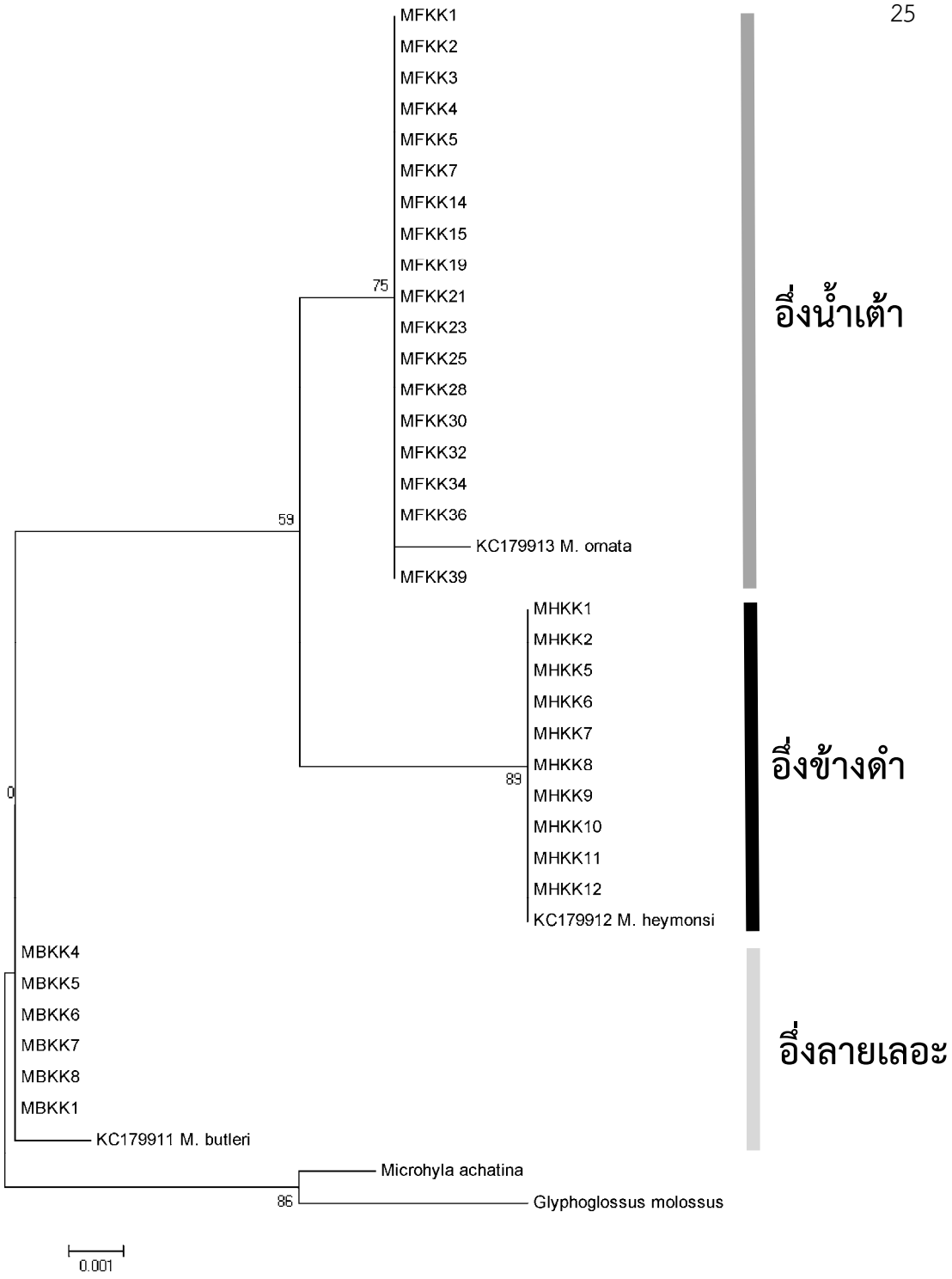
หรือ π = $\sum$xij/nc (Nei 1987, equation 10.6) เมื่อ n คือ จำนวนของ sequence ที่ทำการวิเคราะห์ผล, xi คือ ความถี่ของรูปแบบ ith ใน sequence ของดีเอ็นเอตัวอย่าง และ nc คือ จำนวนของ sequence ทั้งหมดที่ทำการเปรียบเทียบ

3. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-Joining และ Maximum Likelihood ระหว่างอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ จากลำดับเบสที่มีความยาว 730 bps พบว่าทั้ง NJ tree และ ML tree แสดง topology ที่คล้ายคลึงกันและสอดคล้องกัน กล่าวคือ ผลการศึกษาพบว่าประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดแบ่งออกเป็น 3 clade ใหญ่ๆ ด้วยกันตามลักษณะสัณฐานของอึ่งแต่ละชนิด ได้แก่ clade ของอึ่งน้ำเต้า (MFKK) clade ของอึ่งข้างดำ (MHKK) และ clade ของอึ่งลายเลอะ (MBKK) ด้วยค่า bootstrap probability ที่มากกว่า 60% (รูปที่ 7-8) โดย clade ที่หนึ่งประกอบด้วยประชากรของอึ่งน้ำเต้าทั้งหมด (รวมทั้งอึ่งน้ำเต้าที่ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากฐานข้อมูล GenBank; Accession number KC179913) clade ที่สองประกอบด้วยประชากรของอึ่งข้างดำทั้งหมด (รวมทั้งอึ่งข้างดำที่ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากฐานข้อมูล GenBank; KC179912) ส่วน clade ที่สามประกอบด้วยประชากรของอึ่งลายเลอะทั้งหมด (รวมทั้งอึ่งลายเลอะที่ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากฐานข้อมูล GenBank; KC179911)



รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ที่สร้างโดยวิธี Neighbor-Joining โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 730 bps ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *Microhyla achatina* และ *Glyphoglossus molossus* เป็น outgroup



รูปที่ 8 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 730 bps ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *Microhyla achatina* และ *Glyphoglossus molossus* เป็น outgroup

สรุปและวิจารณ์ผล

ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 28S rRNA ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวนทั้งหมด 34 ตัวอย่าง พบว่ามีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 739 คู่เบส มีค่า genetic distance ระหว่างประชากรอยู่ระหว่าง 0.007-0.011 และมีความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) จำนวน 9 (1.22%) ตำแหน่ง แสดงว่าอึ่งทั้งสามชนิดมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน 28S rRNA ค่อนข้างต่ำ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาครั้งนี้กับงานวิจัยของ de Sá และคณะ ในปี 2012 ที่ใช้ยีน 28S rRNA ในการศึกษา molecular phylogeny ของ microhylid frogs ในวงศ์ Microhylidae จำนวน 225 ตัวอย่าง (รวมทั้งอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ) โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 28S rRNA ความยาว 738 คู่เบส ระหว่างอึ่งทั้ง 225 ตัวอย่าง พบว่ามีตำแหน่งที่มีความแปรผันทางพันธุกรรม (number of parsimony informative sites/total sites) เท่ากับ 49/738, 6.6% ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน 28S rRNA ของอึ่งวงศ์ Microhylidae มีความแปรผันทางพันธุกรรมไม่สูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมเพียง 9 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังพบว่ายีน 28S rRNA มีความแปรผันทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับยีนในนิวเคลียร์ดีเอ็นเออื่นๆ เช่น ยีน tyrosinase (313/551, 60%) และยีน BDNF (221/711, 31%) (de Sá et al., 2012) หรือยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ เช่น ยีน 16S rRNA (355/673, 52%) (de Sá et al., 2012) และยีน COI (267/573, 47%) (Meijden et al., 2007) แต่อย่างไรก็ดีผลการศึกษาที่ได้พบว่าอึ่งทั้งสามชนิดมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของยีน 28S rRNA อย่างชัดเจน ดังจะสังเกตได้จากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างโดยวิธี NJ และ ML ที่แสดงให้เห็นว่าอึ่งทั้งสามชนิด แยกออกเป็น 3 clade อย่างชัดเจนสอดคล้องตามลักษณะสัณฐานภายนอก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีน 28S rRNA ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (species-specific mtDNA marker) เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของอึ่งทั้งสามชนิดได้ นอกจากนี้ผลการศึกษาที่ได้ยังพบว่า โดยเฉลี่ย ค่า haplotype diversity (hd) และค่า nucleotide diversity (π) ของประชากรของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ มีค่าไม่สูงมากนัก โดยเฉลี่ย hd = 0.620 ± 0.053 และ π = 0.00558 ± 0.00053

จากการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวก่อนหน้านี้ โดยทำการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้น ผลการศึกษาพบการเกิด gene flow หรือ introgression ของ mitochondrial DNA จากประชากรของอึ่งข้างดำสู่ประชากรของอึ่งน้ำเต้าในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำสามารถผสมข้ามสายพันธุ์ในธรรมชาติได้ (Wiwegweaw & Khonsue, unpublished data) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งใช้ nuclear gene เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ ไม่พบการเกิด gene flow หรือ introgression ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

ระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิด ดังจะสังเกตได้ว่าแต่ละ clade ของอึ่งแต่ละชนิดประกอบด้วยสมาชิกที่มาจากประชากรของอึ่งชนิดเดียวกันเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

Arnold, M. L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, UK.

Arnold, M. L. 2006. Evolution through genetic exchange. Oxford University Press, NY.

Alves, P. C., Melo-Ferreira, J., Freitas, H. and 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.

Barton, N. H. 2001. The role of hybridization in evolution. University of Edinburgh, Edinburgh. UK

de Sá R. O., Streicher, J. W., Sekonyela, R., Forlani, M. C., Loader, S. P., Greenbaum, E., Richards, S. and Haddad, C. F. 2012. Molecular phylogeny of microhylid frogs (Anura: Microhylidae) with emphasis on relationships among New World genera. BMC Evol Biol. 12: 1471-2148.

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. and 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. J. Evol. Biol. 23: 1425–1435.

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.

Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. Trends in Ecology and Evolution. 20: 229-237.

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.

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., Librado, P., Sánchez-Del Barrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2010. DnaSP Version 5.10 HelpContents. Bioinformatics. 25: 1451-1453.

Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution. 4: 406–425.

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.

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.

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.

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.

ธัญญา จั่นอาจ. 2546. คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย. 5000. 1. กรุงเทพมหานคร : บริษัทด่านสุทธากา รพิมพ์ จำกัด.

วิเชฏฐ์ คนซื่อ, อนุสรณ์ ปานสุข, สุทธิณี เหลาแตว, พัชร ดนัยสวัสดิ์, ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ, ธงชัย ฐิติภูรี, รชตะ มณี อินทร์, ผุสตี ปริยานนท์, และ สมชาย เสนศร. 2554. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในหมู่เกาะทะเลไทย. 1000. 1. บริษัท สิรบุตรการพิมพ์ จำกัด.

ประวัติคณะวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ไทย) ดร. อัมพร วิเวกแว่ว

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

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาชีววิทยาโมเลกุล วิวัฒนาการ และ Molecular Phylogenetics

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

2558-2559	การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยใช้นิวเคลียร์ยีนเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ
2557-2558	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งบางชนิดในสกุล *Microhyla* ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

2556-2557 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของสปีชีส์ย่อยของไก่ฟ้าหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไก่ฟ้าหลังเทา (*L. leucomelana*) ในประเทศไทยโดยลำดับดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

2555-2556 ความหลากหลายทางชนิด นิเวศวิทยา การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด ณ ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่านและพื้นที่ อพ.สธ. เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

2554-2555 การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจสอบในพื้นที่ อพ.สธ. เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย

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. 2010. Genetic variation of captive green peafowl in Thailand based on d-loop sequences. 2010. Abstract 5th International Galliformes Symposium. Chiang Mai, Thailand.

6. 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. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในบริเวณพื้นที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย-สระบุรี อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี (ทุน อพ.สธ. ปีงบประมาณ 2559) สถานภาพงานวิจัย 5%
2. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของสปีชีส์ย่อยของไก่ฟ้าหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไก่ฟ้าหลังเทา (*L. leucomelana*) ในประเทศไทยโดยลำดับดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ทุน สกว. ปีงบประมาณ 2556) สถานภาพงานวิจัย 95%

2. ชื่อ-นามสกุล (ไทย) ดร.วิเชฏฐ์ คนซื่อ

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

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขานิเวศวิทยาและอนุกรมวิธานสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

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

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

1. 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

2. 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

3. 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 โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

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 โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

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. แหล่งทุนโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

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, 16th 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. วิเชฏฐ์ คนซื่อ. 2008. 2008 ปีแห่งการอนุรักษ์กบ 2008 ปีแห่งการอนุรักษ์กบ: วิกฤติการสูญพันธุ์และบัญชีแดง. การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 12. 10-13 ตุลาคม 2551 โรงแรมไดมอนด์พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน

1. ความหลากหลายของชนิดและการใช้พื้นที่ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณเทือกเขาหินปูน จังหวัดสระบุรีและลพบุรี แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย(โครงการ BRT R352042) สถานภาพงานวิจัย 90%
2. โครงการวิจัยข้อมูลเบื้องต้นของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง บริเวณพื้นที่เกาะทะลุ แหล่งทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2554 สถานภาพงานวิจัย 80%
3. โครงการวิจัยการสำรวจเบื้องต้น microhabitat ของค้างคาวคุณกิตติ แหล่งทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2554 สถานภาพงานวิจัย 70%