รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งบางชนิดในสกุล *Microhyla* ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

Genetic diversity of some species of oriental tiny frogs of the genus *Microhyla* in Khao Khew Open Zoo, Chonburi province as revealed by mitochondrial DNA (COI and 16S rRNA sequences)

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

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ คุณรชตะ มณีอินทร์และคุณนายธงชัย ฐิติภูรี ที่ช่วยเก็บตัวอย่างอึ่งในการศึกษาครั้งนี้, คุณรังสินี สันคมและคุณศรัณย์ ป่านแก้ว ที่ช่วยสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

การผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันเชิงวิวัฒนาการที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรหรือสปีชีส์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ลูกผสม (hybrids) ที่เกิดขึ้นอาจทำให้เกิดการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ระหว่างประชากรหรือสปีชีส์ได้หากลูกผสมดังกล่าวสามารถอยู่รอดและสืบพันธุ์ได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อยู่ในสกุลเดียวกัน มีขนาดลำตัวใกล้เคียงกันและมีการกระจายอยู่ในทุกภาคของประเทศไทย จากการสำรวจเบื้องต้นพบว่าอึ่ง 2 หรือ 3 ชนิด มีการใช้พื้นที่อยู่อาศัยร่วมกัน และที่สำคัญด้วยธรรมชาติของอึ่งที่มีการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COI และประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในธรรมชาติ โดยนำอึ่งน้ำเต้าจำนวน 48 ตัว อึ่งข้างดำจำนวน 43 ตัวและอึ่งลายเลอะจำนวน 9 ตัว ที่เก็บมาจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี มาตรวจหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อเยื่อตับของอึ่งทั้งสามชนิด และเพิ่มปริมาณยีน COI โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งทั้งสามชนิดจำนวน 72 ตัวอย่างให้ผล sequencing ชัดเจนและน่าเชื่อถือ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 677 คู่เบส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DnaSP พบจำนวนแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกันจำนวน 36 แฮพโพลไทป์ ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 189 (27.92%) ตำแหน่ง มีค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.973 ± 0.006 และ 0.10891 ± 0.00525 ตามลำดับ ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดอยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.223 แสดงว่าประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน COI ค่อนข้างสูง ซึ่งเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของอึ่งทั้งสามชนิด นอกจากนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการยังพบว่าอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group การตรวจพบการเกิด gene flow ระหว่างประชากรของอึ่งข้างดำและอึ่งน้ำเต้า และระหว่างประชากรของอึ่งลายเลอะและอึ่งน้ำเต้า แสดงว่าอึ่งทั้งสองชนิดนั้นสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ในธรรมชาติ

คำสำคัญ: การผสมข้ามสายพันธุ์, สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก, ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ, ยีนโฟลว์

Abstract

Hybridization is a mating between genetically different species. It results from incomplete reproductive isolation. Viable and fertile hybrids may lead to gene flow between populations or species. This can be checked using molecular biology techniques. 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. Essentially, the external fertilization of amphibians may increase the risk of hybridization. Therefore, this study aims to investigate genetic diversity among these three *Microhyla* species in order to design species-specific mtDNA marker to identify species, and to detect possible natural hybridization. Forty-eight *M. fissipes*, Forty-three *M. heymonsi* and nine *M. butleri* individuals were collected from Khao Khew Open Zoo, Chonburi province. All of the collected samples were screened and compared in terms of the COI gene base sequences of the mitochondrial DNA extracted from the liver tissue. The results showed that only seventy-two samples had obvious and reliable COI sequences, 677 base pairs. Thirty-six unique haplotypes based on 189 (27.92%) variable sites were detected from the 72 aligned sequences using DnaSP program. The haplotype diversity (hd) and nucleotide diversity (π) were high. On average, hd = 0.973 ± 0.006 and π = 0.10891 ± 0.00525. In addition, the genetic distance between populations ranged from 0.000 to 0.223, indicating high genetic diversity among the three *Microhyla* species. These results revealed that the COI gene is suitable for use as a species-specific mtDNA marker. Moreover, phylogenetic analysis of the mtDNA haplotypes indicated that *M. fissipes*, *M. heymonsi* and *M. butleri* are monophyletic in their evolutionary relationships. Furthermore, the detections of gene flow between the two species may indicate the occurrence of historical natural hybridization between *M. heymonsi* and *M. fissipes*, and between *M. butleri* and *M. fissipes*.

Keywords: hybridization, amphibian, gene flow, mitochondrial DNA

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	11
ผลการศึกษา	17
สรุปและวิจารณ์ผล	38
เอกสารอ้างอิง	40
ประวัตินักวิจัยและคณะ	42

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	14
ตารางที่ 2	แสดงผลการเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนยีน CO ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	17
ตารางที่ 3	แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว.....	34

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของอึ่งน้ำเต้า.....	7
รูปที่ 2	แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของอึ่งข้างดำ.....	8
รูปที่ 3	แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของอึ่งลายเลอะ.....	9
รูปที่ 4	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า จำนวน 8 ตัวจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส.....	18
รูปที่ 5	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า จำนวน 8 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส.....	18
รูปที่ 6	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า จำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส.....	19
รูปที่ 7	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า จำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส.....	19
รูปที่ 8	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า จำนวน 12 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส.....	20
รูปที่ 9	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำ จำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส.....	20
รูปที่ 10	แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำ จำนวน 6 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส.....	21

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำ จำนวน 6 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส..... 21

รูปที่ 12 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำ จำนวน 7 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส..... 22

รูปที่ 13 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำ จำนวน 7 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส..... 22

รูปที่ 14 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งลายเลอะ จำนวน 9 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส..... 23

รูปที่ 15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 677 bp จำนวน 74 ตัวอย่าง จากประชากรของอึ่งน้ำเต้า (MFKK) อึ่งข้างดำ (MHKK) และอึ่งลายเลอะ (MBKK) เทียบกับ outgroup ได้แก่ *M. annectens* และ *M. marmorata* โดยเครื่องหมาย (.) แสดงตำแหน่งของเบสที่เหมือนกัน..... 24

รูปที่ 16 แสดงค่า Genetic distance ภายในประชากรของอึ่งน้ำเต้า จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวน 39 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 677 bps..... 31

รูปที่ 17 แสดงค่า genetic distance ภายในประชากรของอึ่งข้างดำ จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวน 24 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 677 bps..... 32

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 18	แสดงค่า Genetic distance ภายในประชากรของอึ่งลายเลอะ จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 677 bps.....	33
รูปที่ 19	แสดงแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood method โดยวิเคราะห์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 677 bps ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิ แสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *M. annectens* และ *M. marmorata*.....	36

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งบางชนิดในสกุล *Microhyla* ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

GENETIC DIVERSITY OF SOME SPECIES OF ORIENTAL TINY FROGS OF THE GENUS *Microhyla* IN KHAO KHEW OPEN ZOO, CHONBURI PROVINCE AS REVEALED BY MITOCHONDRIAL DNA (COI AND 16S rRNA SEQUENCES)

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

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ได้ดำเนินโครงการมาเพื่อปกปักรักษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตของประเทศไทย เพื่ออนุรักษ์ไว้เป็นสมบัติของชาติต่อไปในอนาคต พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ และพื้นที่ที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่เป็นป่าธรรมชาติรวมทั้งเกาะแก่งของทะเลไทย ด้วยความหลากหลายของพื้นที่และตำแหน่งที่ตั้งต่างๆ ก่อให้เกิดที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่าจำนวนมาก รวมทั้งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในปัจจุบันมีชุมชนขนาดเล็กเข้าไปตั้งถิ่นฐานอยู่อย่างถาวรในพื้นที่และพื้นที่ใกล้เคียงบางส่วนและส่วนหนึ่งดำรงชีวิตจากการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรในพื้นที่โดยได้ทำการบุกรุกทำลายป่าและแหล่งน้ำธรรมชาติไปแล้วบางส่วนเพื่อทำการเกษตรและยังล่าสัตว์ป่ากินเป็นอาหารด้วย โดยเฉพาะในบริเวณพื้นที่ที่เป็นเขตติดต่อระหว่างป่ากับหมู่บ้าน/พื้นที่กิจกรรมของมนุษย์

การศึกษาสำรวจชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรของสัตว์ป่าในพื้นที่เหล่านี้ โดยเฉพาะสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาในรายละเอียด โดยเฉพาะการศึกษาทางด้านพันธุกรรม อนึ่งในช่วงทศวรรษที่ผ่านมานักชีววิทยาในหลายๆ ประเทศได้ให้ความสนใจศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปรากฏการณ์การผสมข้ามสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ (natural hybridization) ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางสาย

วิวัฒนาการ (closely related species) กันอย่างกว้างขวางโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลควบคู่ไปกับการศึกษาทางด้านสัณฐานภายนอก (Arnold, 1997, 2006; Mallet, 2005) ซึ่งจากการศึกษาวิจัยดังกล่าวนักชีววิทยาหลายท่านพบว่าสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ เมื่อมีการแพร่กระจายตัวมาอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกัน (contact zone) หรือทับซ้อนกัน (overlap area) มีความเสี่ยงสูงที่จะผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์กันระหว่างสปีชีส์ที่ต่างกันแต่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการ ในบางกรณี การผสมข้ามสายพันธุ์เกิดขึ้นอย่างประสบความสำเร็จและนำไปสู่การผลิตลูกผสม (hybrid) ที่มีชีวิตและไม่เป็นหมันได้ จากเหตุการณ์ดังกล่าว โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามาประยุกต์ ทำให้นักชีววิทยาสามารถตรวจหาร่องรอยทางพันธุกรรมของการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์กันในอดีตได้ โดยตรวจสอบดูว่ามีการถ่ายทอดยีน (ไม่ว่าจะเป็นไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอหรือนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ) จากสิ่งมีชีวิตสปีชีส์หนึ่งไปยังสิ่งมีชีวิตอีกสปีชีส์หนึ่งหรือไม่ ถ้าตรวจพบ ก็แสดงว่าสิ่งมีชีวิตสองสปีชีส์นั้นสามารถผสมข้ามสายพันธุ์ได้ เราเรียกปรากฏการณ์การถ่ายทอดยีนระหว่างสปีชีส์ โดยอาศัยลูกผสมที่เกิดขึ้นเป็นตัวกลางในการถ่ายทอดนี้ว่าการเกิดยีนโฟลว์หรืออินโทรเกรสชั่น (gene flow or introgression) (e.g., Barton & Hewitt, 1985; Mallet, 2005; Plotner et al., 2008).

ทั้งนี้สาเหตุที่ต้องใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามาตรวจสอบความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมพันธุ์ข้ามกันหรือการเกิด introgression นั้นก็เนื่องจากลูกผสม (interspecific hybrid) หรือลูกผสมแบคคลอส (backcross hybrid) ไม่ว่าจะเป็นรุ่นที่หนึ่ง สอง สาม หรือรุ่นต่อๆ มานั้น มักจะมีลักษณะทางสัณฐานภายนอกที่ก้ำกึ่ง (intermediate) ระหว่างสปีชีส์พ่อและสปีชีส์แม่ หรือมีแนวโน้มคล้ายคลึงกับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่สปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่งมาก ทำให้การจำแนกหรือระบุสปีชีส์ของตัวอย่างๆ นั้นว่าเป็นสปีชีส์พ่อ, สปีชีส์แม่, ลูกผสม หรือลูกผสมแบคคลอส นั้นทำได้ยากและขาดความน่าเชื่อถือ ดังนั้น เพื่อเพิ่มความถูกต้องและน่าเชื่อถือในระบุชนิดหรือลูกผสมประเภทต่างๆ จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลทั้งจากลักษณะสัณฐานภายนอกและข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลควบคู่กันไป ซึ่งการใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล ส่วนใหญ่จะใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอหรือ mtDNA หรือจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซน์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ ซึ่งจากการศึกษาด้วยวิธีการดังกล่าว ทำให้ผู้ศึกษาวิจัยสามารถตรวจพบการเกิด introgression ของ mtDNA ในสัตว์หลายชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการ เช่น ในปลา (e.g. Wilson & Bernatchez, 1998) ในแมลงหวี่ (e.g. Bachtrog et al., 2006), กระต่ายป่า (e.g. Alves et al., 2008; Plötner et al., 2008), ในหนู (Bozikova et al., 2005) เป็นต้น

การตรวจพบการเกิด introgression ย่อมส่งผลกระทบต่อการการศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอย่างมาก กล่าวคือ ทำให้เกิดความสับสนและคลุมเคลือในการระบุและจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา รวมทั้งทำให้เกิดความสับสนในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอีกด้วย ประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง แต่การศึกษาเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการ

เกิดการผสมข้ามสายพันธุ์หรือการเกิด introgression ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในธรรมชาตินั้นพบว่ายังมีน้อยมากหรือแทบไม่มี ทั้งที่มีการใช้ประโยชน์จากสัตว์กลุ่มนี้อย่างแพร่หลายทั้งเชิงเศรษฐกิจและการบริโภค ทั้งภายในประเทศไทยและระหว่างประเทศ ดังนั้นจึงเป็นการเร่งด่วนที่ควรมีการศึกษาในสัตว์กลุ่มนี้เพื่อการจัดการทรัพยากรอย่างเหมาะสมรวมไปถึงการประยุกต์ในเชิงอนุรักษ์

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) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อยู่ในสกุลเดียวกันเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกัน มีขนาดลำตัวเล็ก ไม่แตกต่างกันมาก ในประเทศไทยสามารถพบการกระจายตัวของอึ่งทั้งสามชนิดได้ในทุกภาคของประเทศไทย อึ่งทั้งสามชนิดนี้มีลักษณะถิ่นอาศัยเฉพาะคล้ายๆ กัน คือใต้ใบไม้ กองหิน กองหญ้า และวัสดุอื่นๆ บนพื้นดิน มีการกระจายตัวทับซ้อนกันในหลายพื้นที่ในประเทศไทย และที่สำคัญอึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีการปฏิสนธิแบบภายนอก (external fertilization) ซึ่งเป็นกระบวนการที่สามารถเพิ่มโอกาสให้สเปิร์มของอึ่งชนิดหนึ่งเข้าผสมกับไข่ของอึ่งอีกชนิดหนึ่งได้ง่ายกว่าการมีการปฏิสนธิภายใน (internal fertilization) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ที่อึ่งสองหรือสามชนิดนี้จะผสมต่างสายพันธุ์กันได้ ดังนั้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมพันธุ์ข้ามกันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดนี้ จึงควรตรวจสอบดูว่ามียีนโฟลว์จากอึ่งชนิดหนึ่งไปยังอึ่งอีกชนิดหนึ่งหรือไม่ โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลในการตรวจสอบ

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันสถานภาพด้านความรู้ที่เกี่ยวกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของประเทศไทยในภาพรวมยังคงจัดอยู่ในขั้นแรกเนื่องจากข้อมูลต่างๆ ที่ทำการศึกษาตั้งแต่อดีตจนปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการสำรวจเพื่อวิเคราะห์ชนิดและศึกษาชีวประวัติบางประการที่สามารถทำได้ขณะสำรวจและจากตัวอย่างที่เก็บมาเท่านั้น (กำธร ธีรคุปต์, 2543) แต่ความรู้ทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ทั้งภายในและระหว่างประชากร (หรือสปีชีส์) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในสภาพธรรมชาติในแต่ละพื้นที่หรือเฉพาะแหล่งนั้นมีการศึกษาน้อยมากหรือในบางกรณีแทบไม่มีการศึกษาเลย

การผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตสองชนิดที่มีความใกล้ชิดกันเชิงวิวัฒนาการที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรหรือสปีชีส์ที่แตกต่างกัน โดยการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์นั้นมีผลมาจากกระบวนการการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete reproductive isolation) (Futuyma, 1997) ในบางกรณีการผสมข้ามสายพันธุ์อาจนำไปสู่การผลิตลูกผสม (hybrid) โดยลูกผสมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะมีลักษณะสัณฐานภายนอกก้ำกึ่ง (intermediate) ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิด ทั้งนี้ถ้าลูกผสมที่เกิดขึ้นนั้นสามารถอยู่รอดและสืบพันธุ์ได้ ลูกผสมเหล่านั้นอาจทำให้เกิดการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ระหว่างสปีชีส์ทั้งสองได้ (Arnold, 1997, 2006; Mallet, 2005) โดยการผสมพันธุ์แบบ backcross กับสปีชีส์พ่อ

หรือสปีชีส์แม่ การที่ลูกผสมมีการผสมพันธุ์แบบ backcross กับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่จะทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนกับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่มากขึ้น จนในที่สุดเกิดเป็นลูกผสมที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่จนแยกไม่ออก ในกรณีนี้ จึงมีการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biology) มาใช้ในการตรวจสอบร่วมกับข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา เช่น การตรวจสอบยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตร่วมกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตจากลักษณะภายนอก ซึ่งหากสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นลูกผสม สิ่งมีชีวิตนั้นจะมีชนิดของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ไม่สอดคล้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นโดยใช้ลักษณะภายนอก การผสมข้ามสายพันธุ์ตามธรรมชาตินั้นเชื่อว่าจะเกิดขึ้นได้ยาก เนื่องจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีกลไกการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ไม่สามารถผสมพันธุ์กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ได้ แต่ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่ามีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ เช่น การผสมข้ามสายพันธุ์ในปลา (e.g. Wilson & Bernatchez, 1998) ในแมลงหวี่ (e.g. Bachtrog et al., 2006), ในกระต่ายป่า (e.g. Alves et al., 2008; Plötner et al., 2008), ในหนู (Bozikova et al., 2005) เป็นต้น

การใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์และการเกิด introgression ของ mtDNA ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินนั้น ปัจจุบันพบว่ายังมีไม่มากนัก จากรายงานพบการเกิด introgression ของ mtDNA ใน The European water frog ระหว่าง *Rana ridibunda และ and R. lessonae* (Spolsky and Uzzell, 1984) ใน canyon treefrogs ระหว่าง *Hyla arenicolor* และ *H. wrightorum* (Klymus et al., 2010) ใน green pond frogs ระหว่าง *Pelophylax nigromaculatus* และ *P. plancyi* (Liu et al., 2010) เป็นต้น ซึ่งการเกิด introgression ดังกล่าวย่อมส่งผลกระทบต่อการศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอย่างมาก กล่าวคือ ทำให้เกิดความสับสนและคลุมเคลือในการระบุและจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา รวมทั้งทำให้เกิดความสับสนในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการอีกด้วย ดังนั้นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีการกระจายตัวทับซ้อนกันในบางหรือทุกพื้นที่อาศัย จึงถือเป็นสิ่งจำเป็นเร่งด่วนที่ต้องศึกษาเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประกอบการศึกษาอนุกรมวิธานเพื่อให้การระบุสปีชีส์มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น และเพื่อการจัดการทรัพยากรอย่างเหมาะสมรวมไปถึงการประยุกต์ในเชิงอนุรักษ์สายพันธุ์หรือพันธุ์กรรมดั้งเดิมต่อไป

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) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน จัดอยู่ในสกุลเดียวกัน คือ *Microhyla* อึ่งน้ำเต้ามีความยาวประมาณ 28 มิลลิเมตร กลางหลังมีลายคล้ายรูปน้ำเต้าสีน้ำตาลเข้ม ข้างหัวและลำตัวมีแถบสีดำด้าน (ภาพที่ 1) อึ่งข้างดำ มีความยาวประมาณ 20-22 มิลลิเมตร กลางหลังมีเส้นแคบสีจาง พาดมาตามแนวสันหลัง 1 เส้น ระหว่างเส้นอาจมีจุดประกบ ข้างละจุด (ภาพที่ 2) และอึ่งลายเลอะ มีความยาวประมาณ 22-26 มิลลิเมตร กลางหลังมีลวดลายสมมาตรกัน ขอบของลายหยักเป็นคลื่นสีจางลงมาถึงสีข้างและเป็นลายพาดมาที่ขา (ภาพที่ 3)

จากข้อมูลดังกล่าวจะพบว่าอึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้มีขนาดลำตัวไม่แตกต่างกัน มีลักษณะสัณฐานภายนอกคล้ายคลึงกัน และสามารถพบอึ่งทั้งสามชนิดได้ทุกภาคของประเทศไทย (Matsui, et al., 2011; Meijden, et al., 2007; ธัญญา, 2546) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบอึ่งทั้งสามชนิดอาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกัน (Sympatric area) เช่น ในบริเวณอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี พบอึ่งทั้งสามชนิดอยู่ในบริเวณเดียวกันจำนวนมากโดยเฉพาะในฤดูฝน (วิเชฏฐ์และคณะ 2546) และที่สำคัญการที่อึ่งทั้งสามชนิดมีการปฏิสนธิแบบภายนอก (external fertilization) ทำให้โอกาสที่จะเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์กันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดเป็นไปได้สูงกว่าการปฏิสนธิแบบภายใน (internal fertilization) เพราะการปฏิสนธิแบบภายนอกเป็นการเพิ่มโอกาสให้สเปิร์มของอึ่งชนิดหนึ่งเข้าผสมกับไข่ของอึ่งอีกชนิดหนึ่งได้ง่าย (Huxel, 1999; Wells, 1977) จากข้อมูลดังกล่าวประกอบกับมีการสำรวจพบอึ่งที่มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างอึ่งทั้งสามชนิด (intermediate) และมีการศึกษาพบว่ากบนา 2 สปีชีส์ คือ *Rana limnocharis* และ *R. cancrivora* สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ (Sumida, et al., 2002) จึงเกิดสมมติฐานขึ้นว่าอึ่งทั้งสามชนิดสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันในธรรมชาติได้หรือไม่ ซึ่งในการทดสอบสมมติฐานนี้ เราสามารถใช้วิธีการตรวจสอบได้ทั้งทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และทางพันธุกรรม (Genetics) แต่เนื่องจากการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดของอึ่ง โดยเฉพาะอึ่งที่มีลักษณะ intermediate ซึ่งยากต่อการจำแนกชนิดของอึ่ง ดังนั้นในการตรวจสอบสมมติฐานในครั้งนี้ จึงนำวิธีการตรวจสอบทางพันธุกรรมเข้ามาช่วย โดยจะทำการตรวจสอบการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน COI ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิด แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเริ่มต้นและยังไม่มีการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ดังนั้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์กันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดจึงต้องเริ่มจากการศึกษาแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งทั้ง 3 ชนิด เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่ออึ่งแต่ละชนิด (Species specific mitochondrial DNA markers) ก่อนเพื่อใช้ในการตรวจสอบการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน COI ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดต่อไปในอนาคต

ข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

อึ่งน้ำเต้า
Ornate Chorus Frog
Microhyla fissipes Boulenger, 1884

ลักษณะ ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงรูทวารร่วมประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร หัวแหลม ลำตัวป้อมทรงสามเหลี่ยม ผิวหนังเรียบ กลางหลังมีลายคล้ายรูปน้ำเต้าสีน้ำตาลเข้ม ด้านข้างของหัวและลำตัวสีน้ำตาลเข้ม ช่องจมูกภายในขนาดเล็ก ไม่มีฟันที่เพดานปาก กระดูก premaxilla และ maxilla ลิ้นกลม ปลายลิ้นไม่มีรอยหยัก เพศผู้มีถุงเสียงภายนอก รูจมูกอยู่ด้านบนเกือบปลายสุดหัว อัตราส่วนระยะห่างประมาณ 1:3 เท่า ปลายปากมีลักษณะโค้งนูนเป็นสัน เยื่อบุช่องหูมองไม่เห็นจากภายนอก ท้องสีน้ำตาลอ่อน เพศผู้มีคอและอกสีดำ นิ้วมือและขาหน้าท่อนล่างมีลายพาดขวางช่วงละ 3-4 แถบ ขาหลังสีเดียวกับลำตัว เมื่อพับขาหลังเข้ามาจะเห็นลายพาดขวางต่อเนื่องกัน 3-4 แถบ เท้าหน้าไม่มีพังผืด ปลายนิ้วเท้าหน้าไม่ขยายออก (รูปที่ 1) (ธัญญา, 2546; วิเชฏฐ์และคณะ 2546)

การแพร่กระจาย มีการกระจายกว้างขวาง ตั้งแต่อินเดียตอนเหนือ แถบเทือกเขาหิมาลัย ทั่วอินเดีย ศรีลังกา จีน ฮ่องกง ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ พม่า เกาะไต้หวัน ตลอดประเทศอินโดจีนลงไปถึงคาบสมุทรมลายู ในประเทศไทยพบทุกภาคของประเทศ

ที่อยู่อาศัย ซ่อนตัวใต้ใบไม้ ขอนไม้ และวัสดุที่กองอยู่บนพื้นป่า ทั่วไปพบในปริมาณประชากรสูงที่สุดในกลุ่มอึ่งขนาดเล็กทั้งหมด โดยเฉพาะในฤดูฝนช่วงเดือนกรกฎาคม พบในปริมาณมากบริเวณป่าดิบแล้ง รอบๆ แอ่งน้ำที่เป็นแหล่งเติบโตของลูกอ๊อด ตั้งแต่ปลายเดือนมีนาคมจนถึงเดือนมิถุนายน ลูกอึ่งขนาดเล็กมักหากินรอบๆ แอ่งที่เติบโตมาจากที่เป็นลูกอ๊อด

อุปนิสัย หลบซ่อนตัวในเวลากลางวันบริเวณที่มีความชุ่มชื้นและออกหากินเวลากลางคืน นิสัยการกระโดดหนีเวลาถูกตามจับว่องไวและกระโดดไปได้ไกล แต่มักหมอบนิ่งอยู่กับที่หลังจากกระโดดไปแล้ว อาศัยการพรางตัวหลบเลี่ยงการสังเกตของศัตรูมากกว่าจะพลิกตัวมุดเข้าใต้ใบไม้ที่อยู่ใกล้ที่สุด ผสมพันธุ์และวางไข่ในแอ่งน้ำขังชั่วคราวที่กระจายอยู่ในป่าเต็งรังและในป่าดิบแล้งระหว่างฤดูฝน

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

รูปที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของอึ่งน้ำเต้า

อึ่งข้างดำ

Dark side chorus frog

Microhyla heymonsi Vogt, 1911

<u>ลักษณะ</u> ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงรูทวารประมาณ 2-3 เซนติเมตร หัวแหลม ลำตัวป้อมทรง สามเหลี่ยม ผิวหนังเรียบสีน้ำตาลกลางหลังมีลายจางๆ คล้ายรูปน้ำเต้า อาจมีเส้นสีครีมเล็กๆพาดตามยาวหรือไม่ก็ได้ กลางหลังมีจุดสีดำ 1 จุด ด้านข้างของหัวและลำตัวถึงซอกขาหลังมีสีดำ ช่องจมูกภายในขนาดเล็ก ไม่มีฟันที่เพดานปาก กระดูก premaxilla และ maxilla ลิ้นเรียวยาว ปลายลิ้นไม่มีรอยหยัก เพศผู้มีถุงเสียงภายนอก รูจมูกอยู่ด้านบนเกือบปลายสุดหัว อัตราส่วนระยะห่างประมาณ 1:3 เท่า ปลายปากมีลักษณะโค้งนูนเป็นสัน เยื่อบุช่องหูมองไม่เห็นจากภายนอก ท้องสีครีม รอบก้นมีสีน้ำตาลเข้ม เพศผู้มีคอและอกสีดำ นิ้วมือและขาหน้าท่อนล่างมีลายพาดขวาง ขาหลังสีเดียวกับลำตัว เมื่อพับขาหลังเข้ามาจะเห็นลายพาดขวางต่อเนื่องกัน 2-3 แถบ เท้าหน้าไม่มีพังผืด ปลายนิ้วเท้าหน้าไม่ขยายออก (รูปที่ 2) (ธัญญา, 2546; วิเชฎฐ์และคณะ 2546)

<u>การแพร่กระจาย</u> ไต้หวัน จีน อินเดีย พม่า ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ ในประเทศไทยพบทุกภาคของประเทศ

ที่อยู่อาศัย ซุกซ่อนตัวใต้ใบไม้แห้ง กองหิน กองหญ้า และวัสดุอื่นๆ บนพื้นดิน มักอยู่ไม่ไกลจากแหล่งขยายพันธุ์ซึ่งเป็นแอ่งน้ำขัง พบในปริมาณมากบริเวณป่าดิบแล้ง รอบๆ แอ่งน้ำที่เป็นแหล่งเติบโตของลูกอ๊อด ตั้งแต่เดือนสิงหาคมจนถึงเดือนกันยายน ซึ่งเป็นหลายฤดูฝน ลูกอึ่งขนาดเล็กมักหากินรอบๆ แอ่งที่เติบโตมาจากที่เป็นลูกอ๊อด

อุปนิสัย หลบซ่อนตัวในเวลากลางวันบริเวณที่มีความชุ่มชื้นและออกหากินเวลากลางคืน เมื่อถูกรบกวนจะกระโดดหนีเป็นระยะทางไกล เวลาตกลงสู่พื้นดินจะรีบพลิกตัวหลบเข้าใต้ใบไม้หรือวัสดุอื่นๆ ทันที ไม่หมอบนิ่งอยู่กับที่เหมือนอึ่งชนิดอื่นๆ จึงจับตัวมาศึกษาได้ยาก ผสมพันธุ์และวางไข่ในแอ่งน้ำขังชั่วคราวที่กระจายอยู่ในป่าเต็งรังและในป่าดิบแล้งระหว่างฤดูฝน รวมทั้งในอ่างเก็บน้ำ และถังน้ำที่ตั้งไว้ในพื้นที่ป่า

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

รูปที่ 2 แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกอึ่งข้างดำ

อึ่งลายเลอะ
Noisy chorus frog
Microhyla butleri Boulenger, 1900

ลักษณะ มีขนาดตัวเล็ก ขนาดวัดจากปลายปากถึงก้นประมาณ 30 มิลลิเมตร ลำตัวเรียว หัวแหลม ผิวหนังลำตัวเรียบ แต่ทางส่วนต้นของด้านหลังมีตุ่มแบนกระจายอยู่บ้างด้านหลังสีเทาหรือสีน้ำตาลเทาหรือสีน้ำตาลแดง ส่วน

ปลายสุดของหัวเป็นสีจางและมีทางสีครีมจากด้านท้ายตัวลงไปที่ต้นขาหน้า บน หลังมีลวดลายสีเข้มขอบขาวหรือขอบสีแดงรูปร่างคล้ายน้ำเต้า ด้านข้างลำตัวสีจางและมีจุดสีแดงกระจายเพศผู้มีคางเป็นจุดประสีเทาเข้มและซีดจางจนเกือบขาวในเพศเมีย ขาหน้าและขาหลังเรียวยาว เมื่อพับขาหลังแนบกับลำตัวไปทางด้านหน้า ข้อเท้าอยู่ในตำแหน่งใกล้ส่วนปลายของปาก นิ้วเท้าหน้าไม่มีแผ่นหนังระหว่างนิ้ว นิ้วเท้าหลังมีแผ่นหนังประมาณ 1/3 ของความยาวนิ้ว ส่วนปลายของนิ้ว ทุกนิ้วขยายออกเป็นตุ่มและมีรอยหยักทางด้านหน้าของตุ่ม กับมีร่องยาวอยู่ทางด้านบนของตุ่ม ตุ่มของนิ้วเท้าหลังใหญ่กว่าของนิ้วเท้าหน้า ลูกอ๊อดมีขนาดตัวเล็กและโปร่งแสงแต่มีจุดประสีดำทั่วลำตัว ส่วนหน้าของหัวป้าน แผ่นครีบหางสีแดง ส่วนปลายของหางเรียวเล็กเป็นเส้น ปากอยู่ปลายสุดของส่วนหัว ไม่มีตุ่มฟันและจงอยปาก (รูปที่ 3) (ธัญญา, 2546; วิเชฏฐ์และคณะ 2546)

<u>การแพร่กระจาย</u> จีน พม่า ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ ในประเทศไทยพบทุกภาคของประเทศ

<u>ที่อยู่อาศัย</u> อยู่ตามพื้นล่างของป่าบริเวณที่มีความชุ่มชื้น โดยทั่วไปอยู่ตามชั้นใบไม้ผุบนพื้นป่าดิบแล้งและป่ารกๆ ริมลำห้วย ซ่อนอยู่ใต้ขอนไม้และกองใบไม้ผุ

<u>อุปนิสัย</u> หลบซ่อนตัวในเวลากลางวันบริเวณที่มีความชุ่มชื้นและออกหากินเวลากลางคืน ผสมพันธุ์และวางไข่ในอ่างเก็บน้ำ มีเสียงร้องดังกว่าอึ่งชนิดอื่นๆ

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

รูปที่ 3 แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกอึ่งลายเลอะ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COI และยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี
2. เพื่อออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมและมีความจำเพาะต่อชนิดของอึ่งทั้งสามชนิดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI หรือยีน 16sRNA ที่ได้

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

- Favorgen's Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan)
- MilliQ
- 10 µM LCO1490 primer
- 10 µM HCO2198 primer
- 100 bp + 1.5 kb DNA ladder (SibEnzyme)
- Loading Dye (SibEnzyme)
- Agarose (Promega corporation, USA)
- SYBR® Safe DNA gel stain (InvitrogenTM)
- Sterile water
- Absolute Ethanol (Merck, Germany)

เอนไซม์

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

3.2 สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

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 COI 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)

3.3.6 การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอ

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตับของอึ่งทั้งสองชนิดโดยใช้ Favorgen's 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 10 μM 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 COI โดยเทคนิคพีซีอาร์ (DNA amplification)

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) มีชื่อเต็มว่าเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอให้มีปริมาณมากมายหลายเท่า ในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอเดิม โดยใช้เครื่อง PCR machine หรือ Thermal cycler เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยา โดยในการศึกษาครั้งนี้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณยีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ไปจับกับบริเวณดังกล่าว โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ LCO1490 และ HCO2198 (Folmer, 1994) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

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

จากนั้นทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อไปตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

เตรียมส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยจะใช้ปริมาณสารต่างๆ ในแต่ละหลอดดังนี้

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

สังเคราะห์ยีนเป้าหมายโดยใช้เครื่อง DNA Thermal Cycler PCR โดยกำหนดโปรแกรมให้มีสภาวะพีซีอาร์ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	Initial denaturation	94˚C	2 นาที
ขั้นตอนที่ 2	Denaturation	94˚C	30 วินาที
	Annealing	45ºC	1 นาที
	Extension	72ºC	1 นาที 30 วินาที

ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยทั้งสิ้น 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 Final extension 72˚C 3 นาที

นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycler และเดินเครื่อง

3.3.3 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียม 1% agarose gel โดย ชั่งผง agarose หนัก 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติม 1X TBE buffer 50 ml เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที เติม SYBR® Safe DNA gel stain 5 µl เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้หายร้อนแล้วเท agarose gel solution ลงใน tray และใส่ comb ลงไป ตั้งทิ้งไว้ให้ agarose gel แข็งตัวประมาณ 30 นาที แล้วดึง comb ออก 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 Maximum Likelihood method โดยคำนวน bootstrap percentage 1,000 ครั้ง เพื่อสนับสนุน tree ที่ได้ ด้วยโปรแกรม Mega version 6.06 โดยใช้ *M.*

annectens (Genbank accession number AB611944) และ *M. marmorata* (AB611952) เป็น outgroup ของการศึกษา จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์เพื่อหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพื่อทำการออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่ออึ่งแต่ละชนิด

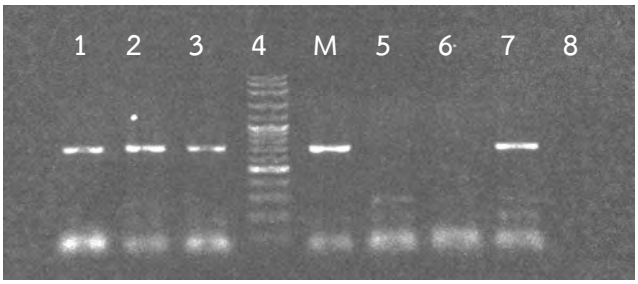
ผลการศึกษา

1. ผลการเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างอึ่งน้ำเต้าจำนวน 48 ตัว อึ่งข้างดำจำนวน 43 และอึ่งลายเลอะจำนวน 9 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จากนั้นได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตับของอึ่งทั้งสามชนิดจำนวนทั้งหมด 100 ตัวอย่าง และนำมาเพิ่มปริมาณยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ LCO1490 และ HCO2198 โดยเทคนิคพีซีอาร์และตรวจสอบขนาด PCR product ที่ได้โดย 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่ามีเพียง XX ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ผล PCR product ที่ต้องการ (ตารางที่ 2) โดย PCR product ที่ต้องการมีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (รูปที่ 4-14)

ตารางที่ 2 แสดงผลการเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนยีน CO ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

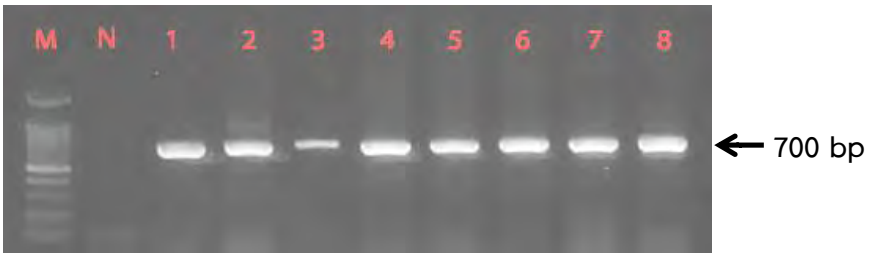
	ชนิดของอึ่ง			
	อึ่งน้ำเต้า	อึ่งข้างดำ	อึ่งลายเลอะ	รวม
จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	48	43	9	100
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เป็นแถบสีเข้มชัดเจน	44	35	9	88
จำนวนตัวอย่างที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ชัดเจนและน่าเชื่อถือ	39	24	9	72



รูปที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 8 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 1-8 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 8 ตัว (ตัวอย่างที่ MFKK1a-8a)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

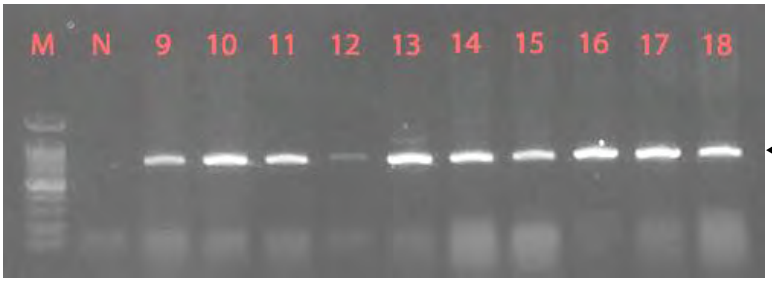


รูปที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 8 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 1-8 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 8 ตัว (ตัวอย่างที่ MFKK1-8)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control

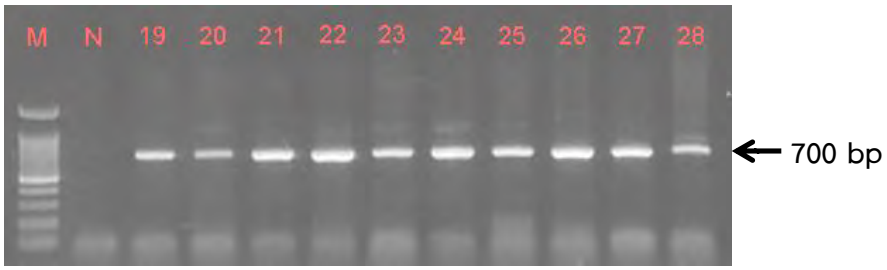


รูปที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 9-18 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 10 ตัว (ตัวอย่างที่ MFKK9-18)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control

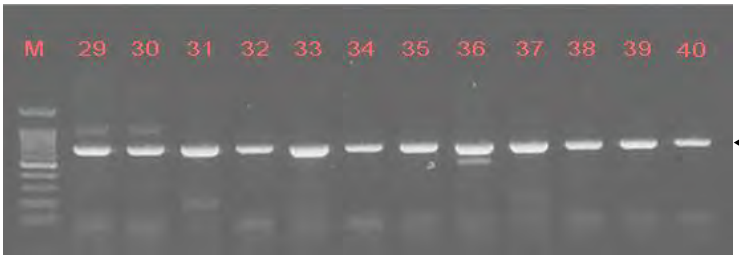


รูปที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 19-28 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 10 ตัว (ตัวอย่างที่ MFKK19-28)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control

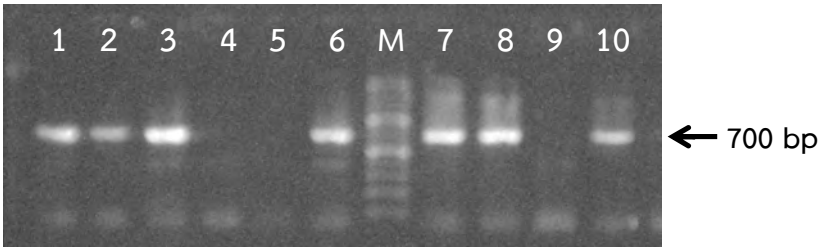


รูปที่ 8 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 12 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 29-40 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 12 ตัว (ตัวอย่างที่ MFKK29-40)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

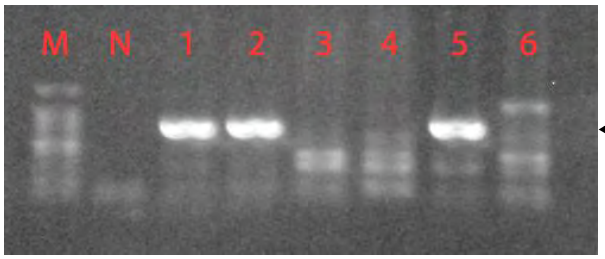
Lane N : Negative control



รูปที่ 9 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 10 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 1-10 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 16 ตัว (ตัวอย่างที่ MHKK1a-10a)

Lane M: : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

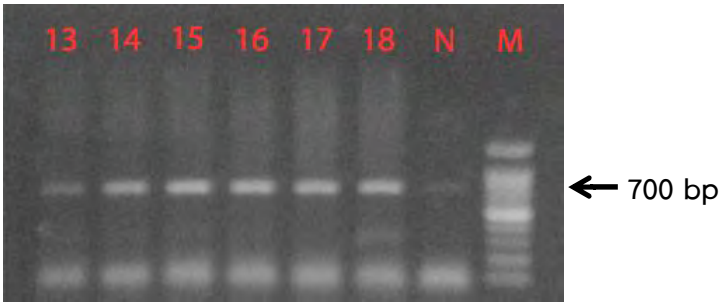


รูปที่ 10 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 6 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 1-6 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 6 ตัว (ตัวอย่างที่ MHKK1-6)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control

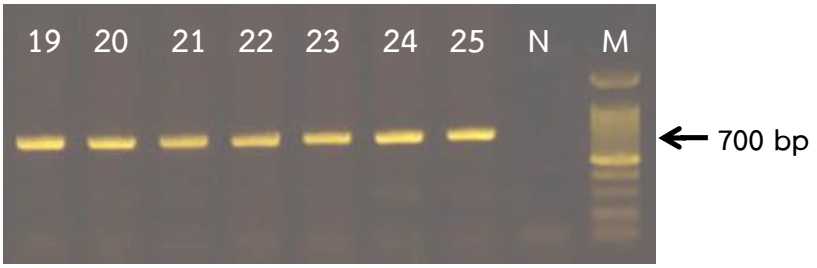


รูปที่ 11 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 6 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 13-18 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 6 ตัว (ตัวอย่างที่ MHKK13-18)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control

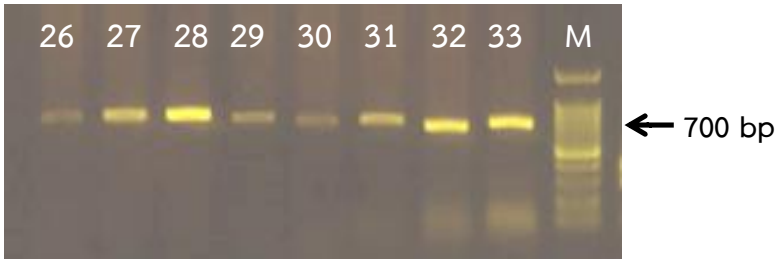


รูปที่ 12 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 7 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 19-25 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 7 ตัว (ตัวอย่างที่ MHKK19-25)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control

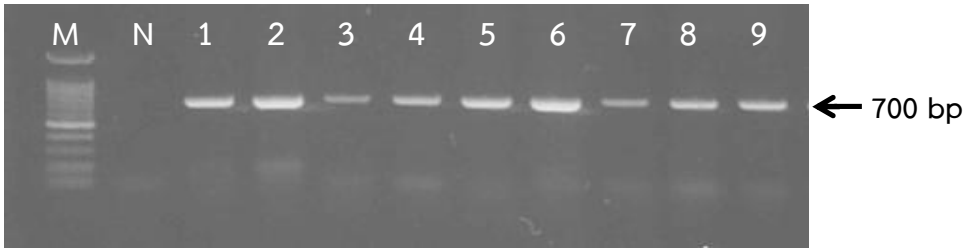


รูปที่ 13 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 7 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 26-33 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งข้างดำจำนวน 7 ตัว (ตัวอย่างที่ MHKK19-25)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control



รูปที่ 14 แสดงผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งลายเลอะจำนวน 9 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 1-9 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งลายเลอะจำนวน 9 ตัว (ตัวอย่างที่ MBKK1-9)

Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

Lane N : Negative control

2. ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ

จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรีจำนวน 88 ตัวอย่าง พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 39 ตัวอย่าง อึ่งข้างดำจำนวน 24 ตัวอย่าง และอึ่งลายเลอะจำนวน 9 ตัวอย่างที่ให้ผล sequencing ชัดเจนและไม่เกิดการซ้อนทับกันของลำดับเบส (ตารางที่ 2) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 677 คู่เบส มีเบสที่มีเปอร์เซ็นต์ A+T เฉลี่ยเท่ากับ 0.57 ซึ่งมี nucleotide composition เป็น: T(33.5%), C(25.6%), A(23.9%) และ G(17.0%)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Dnasp พบจำนวน haplotype ที่แตกต่างกันจำนวน 36 haplotype ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 189 (27.92%) ตำแหน่ง (รูปที่ 15) มี parsimony informative sites จำนวน 178 ตำแหน่ง นอกจากนี้ในการหาค่า genetic distance โดยวิธี Kimura two parameter พบว่าระหว่างประชากรของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ มีค่า Genetic distance อยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.223 โดยค่า genetic distance ภายในประชากรของอึ่งน้ำเต้ามีค่าระหว่าง 0.000-0.196 (รูปที่ 16) ค่า genetic distance ภายในประชากรของอึ่งข้างดำมีค่าระหว่าง 0.000-0.026 (รูปที่ 17) และค่า genetic distance ภายในประชากรของอึ่งลายเลอะมีค่าระหว่าง 0.001-0.015 (รูปที่ 18)

การคำนวณค่าต่างๆ ของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำในแต่ละประชากร ได้แก่ จำนวนตัวอย่าง (n), จำนวนของ mutation (m), จำนวนของ haplotype (h), haplotype diversity (hd), และ π = nucleotide diversity แสดงไว้ในตารางที่ 3 หากพิจารณาจากทุกประชากรของอึ่งทั้งสองชนิดจะพบว่า โดยเฉลี่ยค่า haplotype diversity (hd) และค่า nucleotide diversity (π) มีค่าค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ย hd = 0.973 ± 0.006 และ π = 0.10891 ± 0.00525

```
                    *       20        *       40        *       60        *       80        *      100
MBKK3          : AAAGATATTGGCACCCTCTATCTAGTTTTTGGTGCCTGAGCCGGCATGGTAGGAACTGCCCTCAGCCTCCTAATCCGTGCAGAACTTAGCCAACCTGGGA : 100
MBKK9          : ..................................................................................................... : 100
MBKK1          : ..................................................................................................... : 100
MBKK8          : ..................................................................................................... : 100
MBKK2          : ..................................................................................................... : 100
MBKK5          : ..................................................................................................... : 100
MBKK4          : ..................................................................................................... : 100
MBKK7          : ..................................................................................................... : 100
MFKK40         : ..................................................................................................... : 100
MBKK6          : .....................................................................................................A. : 100
MFKK7          : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T.............................C..C. : 100
MFKK22         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T.............................C..C. : 100
MFKK5a         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T.............................C..C. : 100
MFKK25         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T.............................C..C. : 100
MFKK38         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T...............G..G........C..C. : 100
MFKK3a         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T...............G..G........C..C. : 100
MFKK21         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T...............G..G........C..C. : 100
MFKK4          : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T...............G..G........C..C. : 100
MFKK10         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T...............G..G........C..C. : 100
MFKK1          : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK8a         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK27         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK2          : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK35         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK20         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK33         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK15         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK31         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK39         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK14         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK28         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK17         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK18         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK5          : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A..G.....A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK3          : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK23         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK16         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK26         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK11         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK19         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK13         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK32         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK34         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T............G..G...........C..C. : 100
MFKK6          : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T...............G...........C..C. : 100
MFKK4a         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T...............G...........C..C. : 100
MFKK24         : ..............T..T..C...A.C.....G...........A..A........A.....T..T...............G...........C..C. : 100
MFKK37         : ..............T..T..C...A.C.....A...........A..A........A.....T..T...............G..C........C..C. : 100
MFKK2a         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK1a         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK23         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK24         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK2a         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK15         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK30         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK17         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK19         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK18         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK8a         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK14         : ...........T.....T...T..A.............G..T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK3a         : ...........T.....T...T..A.............G..T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK7a         : ...........T.....T...T..A.............G..T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK6a         : ...........T.....T...T..A.............G..T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........G..CT : 100
MHKK22         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK29         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK10a        : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK16         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK20         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK28         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK31         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK27         : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C...........T...T....T...........A........A..CT : 100
MHKK3          : ...........T.....T...T..A.......C.........T..A..A..G..C.........T..T...T....T.....G.....A........A..CT : 100
MHKK4          : ...........T.....T...T..A.................T..A..A..G..C.....T..T..T...T....T.....G.....A........A..CT : 100
M. annectens   : .....C..C......T.G..C..T..A.....................A..G..G..A.....A.....T..C..T..A........A............G : 100
M. marmorata   : .....C..C........A..C..T..A........A.....T..T..A........C...T.A..T..T..T..T..A.....G..C........A..A. : 100
```

```
                    *      120        *      140        *      160        *      180        *      200
MBKK3        : CTCTGCTAGGTGACGACCAGATTTACAATGTTATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTAATAATTTTCTTCATAGTTATGCCAATTATAATTGGCGGCTTCGG : 200
MBKK9        : ..........................................................................................T......... : 200
MBKK1        : .....................................................................G....................T......... : 200
MBKK8        : ..........................................................................................T......... : 200
MBKK2        : ..........................................................................................T......... : 200
MBKK5        : ..........................................................................................T......... : 200
MBKK4        : ..........................................................................................T......... : 200
MBKK7        : ..........................................................................................T......... : 200
MFKK40       : ..........................................................................................G......... : 200
MBKK6        : ..........................................................C...............................T......... : 200
MFKK7        : ..........C..T.....A.....T..C...........C.....C..A..C...........T..T..G.....A.....C..G..C..T.....T.. : 200
MFKK22       : ..........C..T.....A.....T..C...........C.....C..A..C...........T..T..G.....A.....C..G..C..T.....T.. : 200
MFKK5a       : ..........C..T.....A.....T..C...........C.....C..A..C...........T..T..G.....A.....C..G..C..T.....T.. : 200
MFKK25       : ..........C..T.....A.....T..C...........C.....C..A..C...........T..T..G.....A.....C..G..C..T.....T.. : 200
MFKK38       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK3a       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK21       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK4        : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK10       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK1        : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK8a       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK27       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK2        : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK35       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK20       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK33       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK15       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK31       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK39       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK14       : ..........C..T.....A..C.....C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK28       : ..........C..T.....A..C.....C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK17       : ..........C..T.....A..C.....C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK18       : ..........C..T.....A..C.....C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK5        : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK3        : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK23       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK16       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK26       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK11       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK19       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK13       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK32       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK34       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK6        : ..........C..T.....A........C...........C.....A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK4a       : ..........C..T.....A........C...........C.....A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK24       : ..........C..T.....A........C...........C.....A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK37       : ..........C..T.....A........C...........C.....C..A..............T..T..G..............G...........T.. : 200
MFKK2a       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK1a       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK23       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK24       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK2a       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK15       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK30       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK17       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK19       : ....T.....G..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK18       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....G..T..T.. : 200
MHKK8a       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....G..T..T.. : 200
MHKK14       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK3a       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK7a       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK6a       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..AA....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK22       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK29       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK10a      : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T........A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK16       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T........A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK20       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T........A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK28       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T........A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK31       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T........A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK27       : ....T.....A..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T........A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK3        : ....T.....G..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T..G.....A..T.....G.....A..T..T.. : 200
MHKK4        : ....T.....G..T.....A.....T.....C...............C..A.....T........T..T........A..T.....G.....A..T..T.. : 200
M. annectens : .C..T.....G.......A.....T.....A..C.....C..C.............T..G.....................C..C.........G..A..T.. : 200
M. marmorata : ....TT...C.....T..A.....T.....A.....A..C..C...........C..G.....T..T..G..C.....C..C........A........ : 200
```

```
                    *       220         *       240         *       260         *       280         *       300
MBKK3         : AAATTGATTAGTCCCCCTAATAATTGGGGCCCCTGACATGGCATTCCCTCGTATAAATAATATAAGTTTTTGACTTCTTCCCCCCTCATTTCTCCTTCTT : 300
MBKK9         : ............................................................................................... : 300
MBKK1         : ............................................................................................... : 300
MBKK8         : ............................................................................................... : 300
MBKK2         : ............................A..................................................................... : 300
MBKK5         : ............................A..................................................................... : 300
MBKK4         : ............................................................................................... : 300
MBKK7         : ............................................................................................... : 300
MFKK40        : ............................................................................................... : 300
MBKK6         : ............................A.....................................................T.............C : 300
MFKK7         : C......C.T..T..A...........A..T..G.....A..G........A.......C.....C..C.............T..T........CT.G : 300
MFKK22        : C......C.T..T..A...........A..T..G.....A..G........A.......C.....C..C.............T..T........CT.G : 300
MFKK5a        : C......C.T..T..A...........A..T..G.....A..G........A.......C.....C..C.............T..T........CT.G : 300
MFKK25        : C......C.T..T..A...........A..T..G.....A..G........A.......C.....C..C.............T..T........CT.G : 300
MFKK38        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK3a        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK21        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK4         : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK10        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK1         : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK8a        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK27        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK2         : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK35        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK20        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK33        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK15        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK31        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK39        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK14        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK28        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK17        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK18        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK5         : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK3         : T......C.T..T..A...........A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK23        : T......C.T..T..A...........A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK16        : T......C.T..T..A...........A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK26        : T......C.T..T..A...........A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK11        : T......C.T..T..A...........A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK19        : T......C.T..T..A...........A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK13        : T......C.T..T..A...........A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK32        : T......C.T..T..A...........A.....G................A.......C.....C..C.............T..T........CT.G : 300
MFKK34        : T......C.T..T..A...........A.....G................A.......C.....C..C.............T..T........CT.G : 300
MFKK6         : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK4a        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK24        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK37        : T......C.T..T..A........C..A.....G................A.......C.....C..C.............T..T.........T.G : 300
MFKK2a        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A..G..C..TT.A..C : 300
MHKK1a        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A..G..C..TT.A..C : 300
MHKK23        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A..G..C..TT.A..C : 300
MHKK24        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A..G..C..TT.A..C : 300
MHKK2a        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A..G..C..TT.A..C : 300
MHKK15        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A..G..C..TT.A..C : 300
MHKK30        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A..G..C..TT.A..C : 300
MHKK17        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A..G..C..TT.A..C : 300
MHKK19        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A..G..C..TT.A..C : 300
MHKK18        : T..C...C.G.....TT..............A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A.....C..TT.A..C : 300
MHKK8a        : T..C...C.G.....TT..............A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A.....C..TT.A..C : 300
MHKK14        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A.....C..TT.A..C : 300
MHKK3a        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A.....C..TT.A..C : 300
MHKK7a        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C..T..A.....C..TT.A..C : 300
MHKK6a        : T..C...C.G.....TT..........A.....A...G.A...A.T.....A.......C.....C..C........C.....A.....C..TT.A..C : 300
MHKK22        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C.....A.....C..TT.A..C : 300
MHKK29        : T..C...C.G.....TT.......C..A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C.....A.....C..TT.A..C : 300
MHKK10a       : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C.....A.....C..TT.A..C : 300
MHKK16        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C.....A.....C..TT.A..C : 300
MHKK20        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C.....A.....C..TT.A..C : 300
MHKK28        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C.....A.....C..TT.A..C : 300
MHKK31        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C.....A.....C..TT.A..C : 300
MHKK27        : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........C.....A.....C..TT.A..C : 300
MHKK3         : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C..........T..A.....C...T.A..C : 300
MHKK4         : T..C...C.G.....TT..........A.....A.....A.....T.....A.......C.....C..C........AA.T..A.....C..TT.A..C : 300
M. annectens  : T......C.T..A.....T..G..C.....A..A...........T..A..A.....C..C..G..C..C.....C..G..A.....G..C..T..C... : 300
M. marmorata  : ...C...C.T..A..A..C........A..A..A...........T...........C..............T.G...........C..C..T.....C : 300
```

```
                    *      320         *      340         *      360         *      380         *      400
MBKK3          : TTAGCCTCATCTGCAGTAGAAGCCGGAGCCGGAACGGGCTGAACAGTCTATCCCCCCTTAGCAGGAAACCTAGCTCACGCAGGCCCATCAGTAGACCTAA : 400
MBKK9          : ..................................................................................................... : 400
MBKK1          : ..................................................................................................... : 400
MBKK8          : .....................................................C....................................... : 400
MBKK2          : .....................................................C....................................... : 400
MBKK5          : .....................................................C....................................... : 400
MBKK4          : .....................................................C....................................... : 400
MBKK7          : .....................................................C....................................... : 400
MFKK40         : .....................................................C....................................... : 400
MBKK6          : .....................................................C....................................... : 400
MFKK7          : C.........A....T.....A..........T..T........T.............T..T.....T........C........C..G.....T. : 400
MFKK22         : C.........A....T.....A..........T..T........T.............T..T.....T........C........C..G.....T. : 400
MFKK5a         : C.........A....T.....A..........T..T........T.............T..T.....T........C........C..G.....T. : 400
MFKK25         : C.........A....T.....A..........T..T........T.............T..T.....T........C........C..G.....T. : 400
MFKK38         : C....T.....A....T.....A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK3a         : C....T.....A....T.....A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK21         : C....T.....A....T.....A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK4          : C....T.....A....T.....A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK10         : C....T.....A....T.....A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK1          : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK8a         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK27         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK2          : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK35         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK20         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK33         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK15         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK31         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK39         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK14         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK28         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK17         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK18         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK5          : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK3          : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK23         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK16         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK26         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK11         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK19         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK13         : C....T.....A...A.T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK32         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK34         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK6          : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK4a         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK24         : C....T.....A....T...T.A..G..T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK37         : C....T.....A....T...T.A.....T.....T..T........T.............T..T..T..T..C.....C........C..G.....T. : 400
MFKK2a         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK1a         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK23         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK24         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK2a         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK15         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK30         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK17         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK19         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK18         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK8a         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK14         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK3a         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK7a         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK6a         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK22         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK29         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK10a        : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.........C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK16         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.........C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK20         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.........C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK28         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.........C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK31         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.........C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK27         : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.........C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK3          : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C..G..TT... : 400
MHKK4          : ..........A..C........T..G..A.....A..A..G..T..T.....A...C....C..T..T..T..A..T.....T.....C.....TT... : 400
M. annectens   : C.G..A..C..A..T..T.....G..G..A........T.....C..A..C......C.C..C..C.....T.....T..C.....C..T........ : 400
M. marmorata   : C....A..T........T...........T..T..A........T..T.....A..TC.T..T..C.....C..C.....C.....T..T......T... : 400
```

```
                    *       420         *       440         *       460         *       480         *       500
MBKK3         : CCATTTTCTCCCTACATCTAGCTGGGGTATCCTCTATCCTTGGGGCAATCAACTTTATTACCACAATT-ATTAACATAAAACCCCCATCAGTAACCCAAT : 499
MBKK9         : ..........................................................................-.............................. : 499
MBKK1         : ..........................................................................-.............................. : 499
MBKK8         : .....................................C.....................T......-.............................. : 499
MBKK2         : ............G..........................C.................C.........-.............................. : 499
MBKK5         : .....................................C.................C.........-.............................. : 499
MBKK4         : .....................................C.........................-.............................. : 499
MBKK7         : .....................................C.........................-.............................. : 499
MFKK40        : .....................................C.................C.........-.............................. : 499
MBKK6         : .....................................C.................C.........-.............................. : 499
MFKK7         : .A.........T.G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.............T...........T..G. : 499
MFKK22        : .A.........T.G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.............T...........T..G. : 499
MFKK5a        : .A.........T.G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.............T...........T..G. : 499
MFKK25        : .A.........T.G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.............T...........T..G. : 499
MFKK38        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK3a        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK21        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK4         : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK10        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK1         : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK8a        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK27        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK2         : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK35        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK20        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK33        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK15        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK31        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK39        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK14        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK28        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK17        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK18        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK5         : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK3         : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK23        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK16        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK26        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK11        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK19        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK13        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK32        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK34        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK6         : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK4a        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK24        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T.................G..T.... : 499
MFKK37        : .A.....T.....G...T..........T..T..A..T...........T..T........T..T...-.....T........T...........T.... : 499
MFKK2a        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK1a        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK23        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK24        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK2a        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK15        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK30        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK17        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK19        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK18        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK8a        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK14        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....T...............T..T..T.... : 499
MHKK3a        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....T...............T..T..T.... : 499
MHKK7a        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....T...............T..T..T.... : 499
MHKK6a        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK22        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK29        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK10a       : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK16        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK20        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK28        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK31        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK27        : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...-.....................T..T..T.... : 499
MHKK3         : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T.....C..T..C...-.....................T..C..T.... : 499
MHKK4         : .A.....T...T..........C..A..T..A..A..TT.A..T.....T..T........T..C...T.....................T..C..T.... : 500
M. annectens  : ....C........C........A..........A.....A.....T..........C..T..T..C-C.A..............C.....C..... : 499
M. marmorata  : .T.....T.........T..............A..T..C.....C..T..T........A..T..C-C.C..............T..T.......... : 499
```

```
                    *       520         *       540         *       560         *       580         *       600
MBKK3         : ATCAAACACCTTTATTT-GTCTGATCTGTCCTAATTACAGCTGTCCTTCTCCTACTTTCCCTCCCTGTTCTTGCTGCAGGCATTACAATACTTTTAACCG : 598
MBKK9         : ................-.......................................................................................... : 598
MBKK1         : ................-.......................................................................................... : 598
MBKK8         : ................-..T....................................................................................... : 598
MBKK2         : ................-.................G......................................................................... : 598
MBKK5         : ................-.................G......................................................................... : 598
MBKK4         : ................-.......................................................................................... : 598
MBKK7         : ................-.......................................................................................... : 598
MFKK40        : ................-.......................................................................................... : 598
MBKK6         : ................-.................G......................................................................... : 598
MFKK7         : .........CC.....-........C..TT....C..T..A..T..A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK22        : .........CC.....-........C..TT....C..T..A..T..A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK5a        : .........CC.....-........C..TT....C..T..A..T..A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK25        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK38        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK3a        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK21        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK4         : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK10        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK1         : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK8a        : .........CC....CT..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 599
MFKK27        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK2         : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..C...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK35        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..C...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK20        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK33        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK15        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK31        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK39        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK14        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK28        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK17        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK18        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK5         : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK3         : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK23        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK16        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK26        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK11        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK19        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK13        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK32        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK34        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK6         : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK4a        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK24        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T...........A........C.....T.....T......C....T. : 598
MFKK37        : .........CC....C-..T..G..C...T....C..T..A.....A..A..T.....T.....A........C.....T.....T......C.G..T. : 598
MFKK2a        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK1a        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK23        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK24        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK2a        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK15        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK30        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK17        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.....................T...........T. : 598
MHKK19        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK18        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK8a        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK14        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK3a        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK7a        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK6a        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK22        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK29        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK10a       : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK16        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK20        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK28        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK31        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK27        : .C........CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK3         : .C..G.....CC.....-..G........T........T.....A.....T..T..A..T........C.................T...........T. : 598
MHKK4         : .C........CC.....-..A........T........T.....A.....T..TT.A..T........C.................T...........T. : 599
M. annectens  : .......C..AC....C-..T.....G.....C..C........A..C..T..T.....A.....C...T.A..G..C..G..C......T.AC..... : 598
M. marmorata  : .C.....C..A.....-..T.....A..TT....C........A..AT.A...T.G........A..C..A..C..T..A.....T.....AC.C..T. : 598
```

```
                        *       620         *       640         *       660         *
MBKK3         : ACCGCAACCTCAATACTACATTCTTTGATCCAGCTGGGGGCGGTGACCCAGTCTTATATCAACACCTGTTCTGATTTTT : 677
MBKK9         : ..............................................................................  : 677
MBKK1         : ..............................................................................  : 677
MBKK8         : ..............................................................................  : 677
MBKK2         : ..............................................................................  : 677
MBKK5         : ..............................................................................  : 677
MBKK4         : ..............................................................................  : 677
MBKK7         : ..............................................................................  : 677
MFKK40        : ............................C.................................................  : 677
MBKK6         : ..............................................................................  : 677
MFKK7         : .T..A...T.G.....C..C..........T........A..A.........C.T........T..T...........  : 677
MFKK22        : .T..A...T.G.....C..C..........T........A..A.........C.T........T..T...........  : 677
MFKK5a        : .T..A...T.G.....C..C..........T........A..A.........C.T........T..T...........  : 677
MFKK25        : ....T...T.G.....C..C........C..T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK38        : ....T...T.G.....C..C........C..T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK3a        : ....T...T.G.....C..C........C..T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK21        : ....T...T.G.....C..C........C..T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK4         : ....T...T.G.....C..C........C..T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK10        : ....T...T.G.....C..C........C..T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK1         : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK8a        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 678
MFKK27        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK2         : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK35        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK20        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK33        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK15        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK31        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK39        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK14        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK28        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK17        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK18        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK5         : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK3         : ....T...T.G.....C..C..........T.....A..A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK23        : ....T...T.G.....C..C..........T.....A..A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK16        : ....T...T.G.....C..C..........T.....A..A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK26        : ....T...T.G.....C..C..........T.....A..A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK11        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK19        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK13        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK32        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK34        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T...A..C.C........T..T...........  : 677
MFKK6         : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK4a        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK24        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK37        : ....T...T.G.....C..C..........T........A..A..T......C.C........T..T...........  : 677
MFKK2a        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..G..G.........C.T..C..G.....C...........  : 677
MHKK1a        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..G..G.........C.T..C..G.....C...........  : 677
MHKK23        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..G..G.........C.T..C..G.....C...........  : 677
MHKK24        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..G..G.........C.T..C..G.....C...........  : 677
MHKK2a        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..G..G.........C.T..C..G.....C...........  : 677
MHKK15        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK30        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK17        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK19        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK18        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK8a        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK14        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK3a        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK7a        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK6a        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK22        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK29        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK10a       : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK16        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK20        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK28        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK31        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK27        : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C....C...C...........  : 677
MHKK3         : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 677
MHKK4         : ..........A..C..A.....T........T..A..A..A..G.........C.T..C........C...........  : 678
M. annectens  : ....A...T.A.....C.....T..C..C..G..A..C..G..G.........C.C.....................C..  : 677
M. marmorata  : .T..A...T.A..C..C.....T........C..A.....A..A.....CA..C.C...........A..T........  : 677
```

รูปที่ 15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 677 bp จำนวน 74 ตัวอย่าง จากประชากรของอึ่งน้ำเต้า (MFKK) อึ่งข้างดำ (MHKK) และอึ่งลายเลอะ (MBKK) เทียบกับ outgroup ได้แก่ *M. annectens* และ *M. marmorata* โดยเครื่องหมาย (.) แสดงตำแหน่งของเบสที่เหมือนกัน

	MFKK1	MFKK2	MFKK3	MFKK4	MFKK5	MFKK6	MFKK7	MFKK10	MFKK11	MFKK13	MFKK14	MFKK15	MFKK16	MFKK17	MFKK18	MFKK19	MFKK20	MFKK21	MFKK22	MFKK23	MFKK24	MFKK25	MFKK26	MFKK27	MFKK28	MFKK31	MFKK32	MFKK33	MFKK34	MFKK35	MFKK37	MFKK38	MFKK39	MFKK40	MFKK3a	MFKK4a	MFKK5a	MFKK8a	MFKK2a
MFKK1																																							
MFKK2	0.001																																						
MFKK3	0.006	0.007																																					
MFKK4	0.006	0.007	0.012																																				
MFKK5	0.004	0.006	0.004	0.010																																			
MFKK6	0.003	0.004	0.009	0.006	0.007																																		
MFKK7	0.054	0.056	0.058	0.054	0.059	0.054																																	
MFKK10	0.006	0.007	0.012	0.000	0.010	0.006	0.054																																
MFKK11	0.004	0.006	0.001	0.010	0.003	0.007	0.056	0.010																															
MFKK13	0.006	0.007	0.003	0.012	0.004	0.009	0.058	0.012	0.001																														
MFKK14	0.004	0.006	0.004	0.010	0.003	0.007	0.059	0.010	0.003	0.004																													
MFKK15	0.003	0.004	0.003	0.009	0.001	0.006	0.058	0.009	0.001	0.003	0.001																												
MFKK16	0.006	0.007	0.000	0.012	0.004	0.009	0.058	0.012	0.001	0.003	0.004	0.003																											
MFKK17	0.004	0.006	0.004	0.010	0.003	0.007	0.059	0.010	0.003	0.004	0.000	0.001	0.004																										
MFKK18	0.004	0.006	0.004	0.010	0.003	0.007	0.059	0.010	0.003	0.004	0.000	0.001	0.004	0.000																									
MFKK19	0.004	0.006	0.001	0.010	0.003	0.007	0.056	0.010	0.000	0.001	0.003	0.001	0.001	0.003	0.003																								
MFKK20	0.003	0.004	0.003	0.009	0.001	0.006	0.058	0.009	0.001	0.003	0.001	0.000	0.003	0.001	0.001	0.001																							
MFKK21	0.006	0.007	0.012	0.000	0.010	0.006	0.054	0.000	0.010	0.012	0.010	0.009	0.012	0.010	0.010	0.010	0.009																						
MFKK22	0.054	0.056	0.058	0.054	0.059	0.054	0.000	0.054	0.056	0.058	0.059	0.058	0.058	0.059	0.059	0.056	0.058	0.054																					
MFKK23	0.006	0.007	0.000	0.012	0.004	0.009	0.058	0.012	0.001	0.003	0.004	0.003	0.000	0.004	0.004	0.001	0.003	0.012	0.058																				
MFKK24	0.003	0.004	0.009	0.006	0.007	0.000	0.054	0.006	0.007	0.009	0.007	0.006	0.009	0.007	0.007	0.007	0.006	0.006	0.054	0.009																			
MFKK25	0.042	0.043	0.045	0.038	0.046	0.042	0.015	0.038	0.043	0.045	0.046	0.045	0.045	0.046	0.046	0.043	0.045	0.038	0.015	0.045	0.042																		
MFKK26	0.006	0.007	0.000	0.012	0.004	0.009	0.058	0.012	0.001	0.003	0.004	0.003	0.000	0.004	0.004	0.001	0.003	0.012	0.058	0.000	0.009	0.045																	
MFKK27	0.000	0.001	0.006	0.006	0.004	0.003	0.054	0.006	0.004	0.006	0.004	0.003	0.006	0.004	0.004	0.004	0.003	0.006	0.054	0.006	0.003	0.042	0.006																
MFKK28	0.004	0.006	0.004	0.010	0.003	0.007	0.059	0.010	0.003	0.004	0.000	0.001	0.004	0.000	0.000	0.003	0.001	0.010	0.059	0.004	0.007	0.046	0.004	0.004															
MFKK31	0.003	0.004	0.003	0.009	0.001	0.006	0.058	0.009	0.001	0.003	0.001	0.000	0.003	0.001	0.001	0.001	0.000	0.009	0.058	0.003	0.006	0.045	0.003	0.003	0.001														
MFKK32	0.006	0.007	0.003	0.012	0.004	0.009	0.054	0.012	0.001	0.003	0.004	0.003	0.003	0.004	0.004	0.001	0.003	0.012	0.054	0.003	0.009	0.042	0.003	0.006	0.004	0.003													
MFKK33	0.003	0.004	0.003	0.009	0.001	0.006	0.058	0.009	0.001	0.003	0.001	0.000	0.003	0.001	0.001	0.001	0.000	0.009	0.058	0.003	0.006	0.045	0.003	0.003	0.001	0.000	0.003											
MFKK34	0.006	0.007	0.003	0.012	0.004	0.009	0.054	0.012	0.001	0.003	0.004	0.003	0.003	0.004	0.004	0.001	0.003	0.012	0.054	0.003	0.009	0.042	0.003	0.006	0.004	0.003	0.000	0.003										
MFKK35	0.001	0.000	0.007	0.007	0.006	0.004	0.056	0.007	0.006	0.007	0.006	0.004	0.007	0.006	0.006	0.006	0.004	0.007	0.056	0.007	0.004	0.043	0.007	0.001	0.006	0.004	0.007	0.004	0.007									
MFKK37	0.012	0.013	0.015	0.013	0.013	0.012	0.054	0.013	0.013	0.015	0.013	0.012	0.015	0.013	0.013	0.013	0.012	0.013	0.054	0.015	0.012	0.042	0.015	0.012	0.013	0.012	0.015	0.012	0.015	0.013								
MFKK38	0.006	0.007	0.012	0.000	0.010	0.006	0.054	0.000	0.010	0.012	0.010	0.009	0.012	0.010	0.010	0.010	0.009	0.000	0.054	0.012	0.006	0.038	0.012	0.006	0.010	0.009	0.012	0.009	0.012	0.007	0.013							
MFKK39	0.003	0.004	0.003	0.009	0.001	0.006	0.058	0.009	0.001	0.003	0.001	0.000	0.003	0.001	0.001	0.001	0.000	0.009	0.058	0.003	0.006	0.045	0.003	0.003	0.001	0.000	0.003	0.000	0.003	0.004	0.012	0.009						
MFKK40	0.192	0.192	0.196	0.188	0.198	0.188	0.194	0.188	0.194	0.196	0.198	0.196	0.196	0.198	0.198	0.194	0.196	0.188	0.194	0.196	0.188	0.194	0.196	0.192	0.198	0.196	0.196	0.196	0.196	0.192	0.194	0.188	0.196					
MFKK3a	0.006	0.007	0.012	0.000	0.010	0.006	0.054	0.000	0.010	0.012	0.010	0.009	0.012	0.010	0.010	0.010	0.009	0.000	0.054	0.012	0.006	0.038	0.012	0.006	0.010	0.009	0.012	0.009	0.012	0.007	0.013	0.000	0.009	0.188				
MFKK4a	0.003	0.004	0.009	0.006	0.007	0.000	0.054	0.006	0.007	0.009	0.007	0.006	0.009	0.007	0.007	0.007	0.006	0.006	0.054	0.009	0.000	0.042	0.009	0.003	0.007	0.006	0.009	0.006	0.009	0.004	0.012	0.006	0.006	0.188	0.006			
MFKK5a	0.054	0.056	0.058	0.054	0.059	0.054	0.000	0.054	0.056	0.058	0.059	0.058	0.058	0.059	0.059	0.056	0.058	0.054	0.000	0.058	0.054	0.015	0.058	0.054	0.059	0.058	0.054	0.058	0.054	0.056	0.054	0.054	0.058	0.194	0.054	0.054		
MFKK8a	0.000	0.001	0.006	0.006	0.004	0.003	0.054	0.006	0.004	0.006	0.004	0.003	0.006	0.004	0.004	0.004	0.003	0.006	0.054	0.006	0.003	0.042	0.006	0.000	0.004	0.003	0.006	0.003	0.006	0.001	0.012	0.006	0.003	0.192	0.006	0.003	0.054	
MFKK2a	0.202	0.204	0.197	0.200	0.200	0.202	0.195	0.200	0.200	0.202	0.204	0.202	0.197	0.204	0.204	0.200	0.202	0.200	0.195	0.197	0.202	0.206	0.197	0.202	0.204	0.202	0.200	0.202	0.200	0.204	0.204	0.200	0.202	0.223	0.200	0.202	0.195	0.202

รูปที่ 16 แสดงค่า Genetic distance ภายในประชากรของอึ่งน้ำเต้าจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวน 39 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 677 bps

	MHKK3	MHKK4	MHKK14	MHKK15	MHKK16	MHKK17	MHKK18	MHKK19	MHKK20	MHKK22	MHKK23	MHKK24	MHKK27	MHKK28	MHKK29	MHKK30	MHKK31	MHKK1a	MHKK2a	MHKK3a	MHKK6a	MHKK7a	MHKK8a	MHKK10a
MHKK3																								
MHKK4	0.016																							
MHKK14	0.017	0.020																						
MHKK15	0.015	0.018	0.004																					
MHKK16	0.018	0.018	0.007	0.006																				
MHKK17	0.016	0.020	0.006	0.001	0.007																			
MHKK18	0.017	0.020	0.006	0.004	0.007	0.006																		
MHKK19	0.013	0.016	0.006	0.001	0.007	0.003	0.006																	
MHKK20	0.018	0.018	0.007	0.006	0.000	0.007	0.007	0.007																
MHKK22	0.015	0.018	0.004	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.003															
MHKK23	0.018	0.021	0.007	0.003	0.009	0.004	0.007	0.004	0.009	0.006														
MHKK24	0.018	0.021	0.007	0.003	0.009	0.004	0.007	0.004	0.009	0.006	0.000													
MHKK27	0.020	0.019	0.009	0.007	0.001	0.009	0.009	0.009	0.001	0.004	0.010	0.010												
MHKK28	0.018	0.018	0.007	0.006	0.000	0.007	0.007	0.007	0.000	0.003	0.009	0.009	0.001											
MHKK29	0.017	0.020	0.006	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.004	0.001	0.007	0.007	0.006	0.004										
MHKK30	0.015	0.018	0.004	0.000	0.006	0.001	0.004	0.001	0.006	0.003	0.003	0.003	0.007	0.006	0.004									
MHKK31	0.018	0.018	0.007	0.006	0.000	0.007	0.007	0.007	0.000	0.003	0.009	0.009	0.001	0.000	0.004	0.006								
MHKK1a	0.018	0.021	0.007	0.003	0.009	0.004	0.007	0.004	0.009	0.006	0.000	0.000	0.010	0.009	0.007	0.003	0.009							
MHKK2a	0.018	0.021	0.007	0.003	0.009	0.004	0.007	0.004	0.009	0.006	0.000	0.000	0.010	0.009	0.007	0.003	0.009	0.000						
MHKK3a	0.017	0.020	0.000	0.004	0.007	0.006	0.006	0.006	0.007	0.004	0.007	0.007	0.009	0.007	0.006	0.004	0.007	0.007	0.007					
MHKK6a	0.023	0.026	0.009	0.010	0.010	0.012	0.012	0.012	0.010	0.007	0.013	0.013	0.012	0.010	0.009	0.010	0.010	0.013	0.013	0.009				
MHKK7a	0.017	0.020	0.000	0.004	0.007	0.006	0.006	0.006	0.007	0.004	0.007	0.007	0.009	0.007	0.006	0.004	0.007	0.007	0.007	0.000	0.009			
MHKK8a	0.017	0.020	0.006	0.004	0.007	0.006	0.000	0.006	0.007	0.004	0.007	0.007	0.009	0.007	0.006	0.004	0.007	0.007	0.007	0.006	0.012	0.006		
MHKK10a	0.018	0.018	0.007	0.006	0.000	0.007	0.007	0.007	0.000	0.003	0.009	0.009	0.001	0.000	0.004	0.006	0.000	0.009	0.009	0.007	0.010	0.007	0.007	

รูปที่ 17 แสดงค่า genetic distance ภายในประชากรของอึ่งข้างดำจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวน 24 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 677 bps

	MBKK1	MBKK2	MBKK3	MBKK4	MBKK5	MBKK6	MBKK7	MBKK8	MBKK9
MBKK1									
MBKK2	0.010								
MBKK3	0.003	0.010							
MBKK4	0.004	0.006	0.004						
MBKK5	0.009	0.001	0.009	0.004					
MBKK6	0.015	0.007	0.015	0.010	0.006				
MBKK7	0.004	0.006	0.004	0.000	0.004	0.010			
MBKK8	0.007	0.009	0.007	0.003	0.007	0.013	0.003		
MBKK9	0.001	0.009	0.001	0.003	0.007	0.013	0.003	0.006	

รูปที่ 18 แสดงค่า Genetic distance ภายในประชากรของอึ่งลายเลอะจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 677 bps

ตารางที่ 2 แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตัวอักษรย่อที่ใช้ในตาราง: N = จำนวนตัวอย่าง; M = จำนวนของ mutation; 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	39	215	16	0.941 ± 0.015	0.03049 ± 0.01075
อึ่งข้างดำ	24	32	13	0.924 ± 0.032	0.00797 ± 0.00797
อึ่งลายเลอะ	9	14	8	0.972 ± 0.064	0.00665 ± 0.00127
ทุกประชากร	**72**	**233**	**36**	**0.973 ± 0.006**	**0.10891 ± 0.00525**

หมายเหตุ

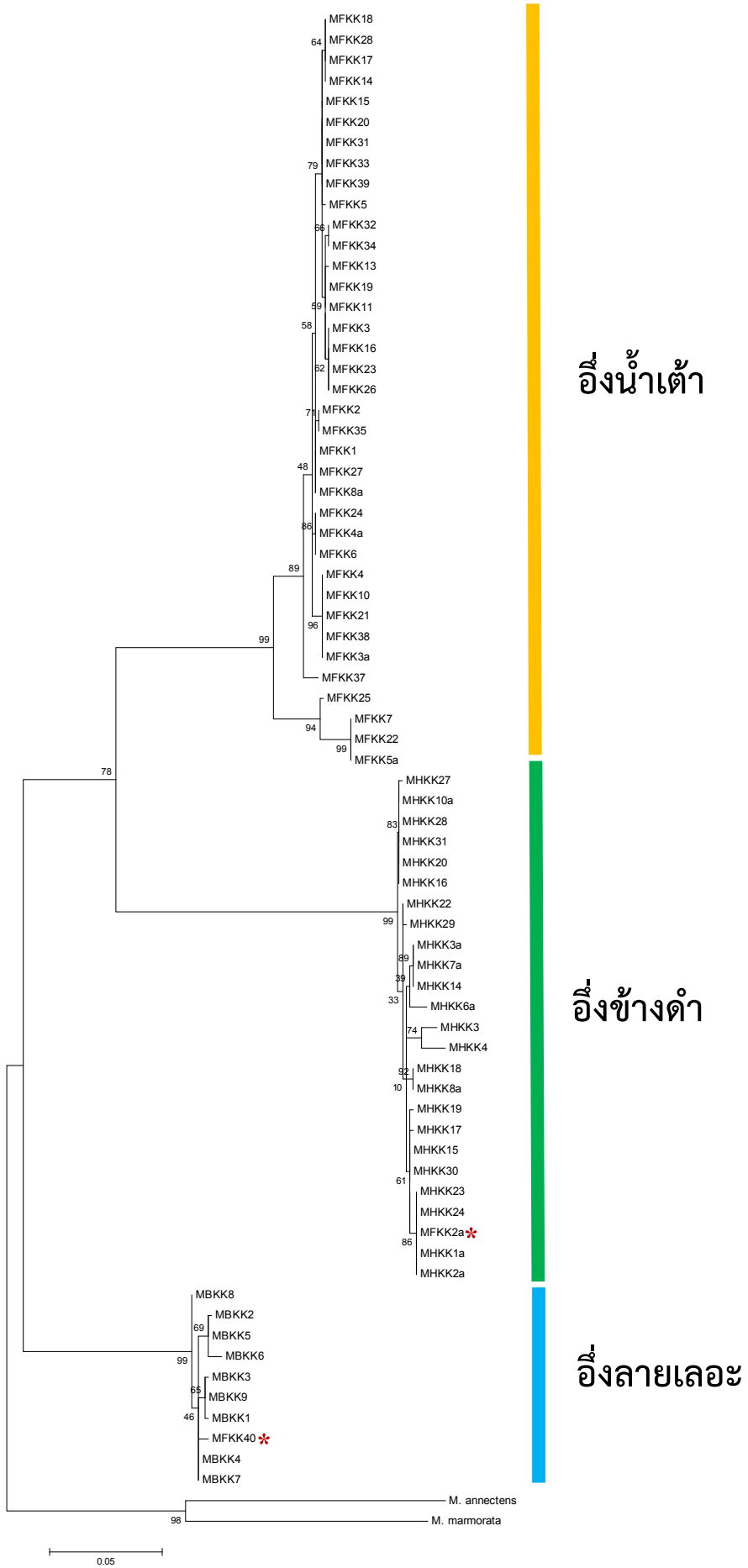
haplotype diversity (hd) หมายถึง จำนวนและความถี่ของ haplotype ที่แตกต่างกันที่พบในตัวอย่าง คำนวณจาก hd = (1 -$\sum$xi 2) n / (n -1) (Nei and Tajima, 1981) เมื่อ xi คือ ความถี่ของ haplotype และ n คือ จำนวนตัวอย่าง

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 Maximum Likelihood ระหว่างอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ จากลำดับเบสที่มีความยาว 677 bps พบว่าประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดแบ่งออกเป็น 3 clade ใหญ่ๆ ด้วยกันตามลักษณะสัณฐานของอึ่งแต่ละชนิด ได้แก่ clade ของอึ่งน้ำเต้า (MFKK) clade ของอึ่งข้างดำ (MHKK) และ clade ของอึ่งลายเลอะ (MBKK) ด้วยค่า bootstrap probability ที่มากกว่า 80% โดย clade ที่หนึ่งประกอบด้วยประชากรของอึ่งน้ำเต้าทั้งหมด clade ที่สองประกอบด้วยประชากรของอึ่งข้างดำทั้งหมด (ยกเว้น MFKK2a) ส่วน clade ที่สามประกอบด้วยประชากรของอึ่งลายเลอะทั้งหมด (ยกเว้น MFKK40)


MFKK18
MFKK28
MFKK17
MFKK14
MFKK15
MFKK20
MFKK31
MFKK33
MFKK39
MFKK5
MFKK32
MFKK34
MFKK13
MFKK19
MFKK11
MFKK3
MFKK16
MFKK23
MFKK26
MFKK2
MFKK35
MFKK1
MFKK27
MFKK8a
MFKK24
MFKK4a
MFKK6
MFKK4
MFKK10
MFKK21
MFKK38
MFKK3a
MFKK37
MFKK25
MFKK7
MFKK22
MFKK5a
MHKK27
MHKK10a
MHKK28
MHKK31
MHKK20
MHKK16
MHKK22
MHKK29
MHKK3a
MHKK7a
MHKK14
MHKK6a
MHKK3
MHKK4
MHKK18
MHKK8a
MHKK19
MHKK17
MHKK15
MHKK30
MHKK23
MHKK24
MFKK2a
MHKK1a
MHKK2a
MBKK8
MBKK2
MBKK5
MBKK6
MBKK3
MBKK9
MBKK1
MFKK40
MBKK4
MBKK7
M. annectens
M. marmorata
0.05
อึ่งน้ำเต้า
อึ่งข้างดำ
อึ่งลายเลอะ

รูปที่ 19 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood method โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 677 bps ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *M. annectens* และ *M. marmorata*

สรุปและวิจารณ์ผล

ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี จำนวนทั้งหมด 72 ตัวอย่าง พบว่ามีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 677 bps มีค่า genetic distance ระหว่างประชากรอยู่ระหว่าง 0.000-0.223 และมีความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) จำนวน 189 (27.92%) ตำแหน่ง แสดงว่าประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน COI ค่อนข้างสูง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาครั้งนี้กับงานวิจัยของ Meijden และคณะ ในปี 2007 (Meijden et al., 2007) ที่ใช้ยีน COI ในการศึกษา molecular phylogeny ของอึ่งวงศ์ Microhylidae จำนวน 34 สปีชีส์ (รวมทั้งอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ) โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 573 คู่เบส ระหว่างอึ่งทั้ง 34 สปีชีส์ พบว่ามีตำแหน่งที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมถึง 267 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน COI ในอึ่งวงศ์ Microhylidae มีความแปรผันทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมมากถึง 189 ตำแหน่ง ดังนั้นอาจสรุปได้ว่ายีน COI มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (species-specific mtDNA marker) เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของอึ่งทั้งสามชนิดได้ และเมื่อเปรียบเทียบค่า genetic distance ภายในประชากรของอึ่งแต่ละชนิด พบว่าค่า genetic distance ภายในประชากรของอึ่งน้ำเต้ามีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากภายในประชากรของอึ่งข้างดำและอึ่งลายเลอะ แสดงว่าประชากรของอึ่งน้ำเต้าแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าประชากรของอึ่งทั้งสองชนิด

นอกจากนี้ผลการศึกษาที่ได้ยังพบว่า โดยเฉลี่ย ค่า haplotype diversity (hd) และค่า nucleotide diversity ($\boldsymbol{\pi}$) ของประชากรของอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำมีค่าค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ย hd = 0.973 ± 0.006 และ $\boldsymbol{\pi}$ = 0.10891 ± 0.00525 และจากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood ยังแสดงให้เห็นว่าอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group และแยกออกเป็น 3 clade ตามลักษณะสัณฐานภายนอกอย่างชัดเจน นอกจากนี้การที่พบว่าอึ่งน้ำเต้า MFKK2a จัดอยู่ใน clade เดียวกับอึ่งข้างดำ และ MFKK40 จัดอยู่ใน clade เดียวกันกับอึ่งลายเลอะ ก็แสดงว่าเกิด gene flow ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) ระหว่างประชากรของอึ่งน้ำเต้ากับประชากรของอึ่งข้างดำและอึ่งลายเลอะ หรืออาจกล่าวได้ว่าอึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างนี้ (MFKK2a และ MFKK40) เป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้ากับอึ่งข้างดำ และระหว่างอึ่งน้ำเต้ากับอึ่งลายเลอะในอดีต เนื่องจากบริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียวที่ที่เก็บตัวอย่างมานั้น เป็นบริเวณที่สามารถพบอึ่งทั้งสามชนิดได้ง่าย และเป็นพื้นที่ที่พบว่าอึ่งทั้งสามชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่อึ่งทั้งสามชนิดจะผสมข้ามสายพันธุ์กันระหว่างสปีชีส์ โดยการเกิด gene flow ของ mtDNA ที่ตรวจพบได้ในครั้งนี้พบเพียงทิศทางเดียว คือ mtDNA จากประชากรของอึ่งข้างดำ introgress สู่ประชากรของอึ่งน้ำเต้า และ mtDNA จากประชากรของอึ่งลายเลอะ introgress สู่ประชากรของอึ่ง

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

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะในธรรมชาติ เพื่อเป็นการยืนยันการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในธรรมชาติให้ชัดเจนยิ่งขึ้น จึงควรทำการเก็บตัวอย่างอึ่งทั้งสามชนิดให้มากกว่านี้ โดยเฉพาะอึ่งลายเลอะ และควรเพิ่มจำนวนพื้นที่ที่ศึกษาให้ครอบคลุมมากกว่านี้ โดยควรทำการเก็บตัวอย่างทั้งจากพื้นที่ที่พบอึ่งเพียงชนิดเดียว (allopatry) และพื้นที่ที่พบอึ่งทั้งสองชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน (sympatry) และควรทำการศึกษานิวเคลียร์ดีเอ็นเอควบคู่กันไปด้วย เพื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาที่ได้ระหว่างไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอกับนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

Alves, P. C., Melo-Ferreira J., Freitas H., & Boursot, P. 2008. The ubiquitous mountain hare mitochondria: multiple introgressive hybridization in hares, genus *Lepus*. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 363: 2831–2839.

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

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

Bachtrog, D., Thornton, K., Clark, A. & Andolfatto, P. 2006. Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. Evolution. 60: 292–302.

Barton, N. H. & Hewitt G. M., 1985. Analysis of hybrid zones. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 16: 113-148.

Bozikova, E., Munclinger, P., Teeter, K. C., Tucker, P. K., Macholan, M. & Pialek, J. 2005. Mitochondrial DNA in the hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*: a comparison of two transects. Biological Journal of the Linnean Society. 84: 363-378.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, R., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 5: 294-299.

Futuyma, D. 1997. Evolutionary Biology. Sinauer Associates, Massachusetts, USA.

Huxel, G. R. 1999. Rapid displacement of native species by invasive species: effect of hybridization. Biological Conservation. 89: 143-152.

Klymus, K. E., Humfeld, S. C., Marshall, V. T., Cannatella, D. & Gerhardt, H. C. 2010. Molecular patterns of differentiation in canyon treefrogs (*Hyla arenicolor*): evidence for introgressive hybridization with the Arizona treefrog (*H. wrightorum*) and correlations with advertisement call differences. Journal of Evolutionary Biology. 23: 1425–1435.

Liu, K., Wang, F., Chen, W., Tu, L., Min, M., Bi, K. and Fu, J. 2010. Rampant historical mitochondrial genome introgression between two species of green pond frogs, *Pelophylax nigromaculatus* and *P. plancyi*. BMC Evolutionary Biology. 10.

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

Matsui, M., Hamidy, A., Belabut, D. M., Ahmed, N., Panha, S., Sudin, A., Khonsue, W., Oh, H., Yong, H., Jiang, J. & Nishikawa, K. 2011. Systemetic relationships of Oriental tiny frogs of the family Microhylidae (Amphibia, Anura) as revealed by mtDNA genealogy. Molecular Phylogenetics and Evolution. 61: 167-176.

Meijden, A., Vences, M., Hoegg, S., Boistel, R., Channing, A. & Meyer, A. 2007. Nuclear gene phylogeny of narrow-mouthed toads (Family: Microhylidae) and a discussion of completing hypotheses concerning their biogeographical origins. Molecular Phylogenetics and Evolution. 44: 1017-1030.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press.

Nei, M. & Tajima, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. Genetics 97: 145-163.

Plotner, J., Uzzell, T., Beerli, P, Spolsky, C., Ohst, T., Litvinchuk, S. N., Guex, G. -D., Reyer, H.-U. & Hotz, H. 2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaearctic water frogs. Journal of Evolutionary Biology. 21: 668-681.

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.

Spolsky, C. & Uzzell, T. 1984. Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 81: 5802-5805.

Sumida, M., Konda, Y., Kanamori, Y. & Nishioka, M. 2002. Inter- and intraspecific evolutionary relationship of the rice frog *Rana limnocharis* and the allied species *R. cancrivora* inferred from crossing experiments and mitochondrial DNA sequences of the 12S and 16S rRNA genes. Molecular Phylogenetics and Evolution. 25: 293-305.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution. 28: 2731-2739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment though sequence weight, positive-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleotide Acid Research. 22: 4673-4680.

Wells, K. D. 1977. The social behavior of anuran amphibians. Animal Behavior. 25: 666-693.

Wilson, C. C. & Bernatchez, L. 1998. The ghost of hybrids past: fixation of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in an introgressed population of lake trout (*S. namaycush*). Molecular Ecology. 7: 127–132.

กำธร ธีรคุปต์. 2543. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน. บทความปริทัศน์งานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย, โดยโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย. หน้า 149-171.

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

วิเชฏฐ์ คนซื่อ, อนุสรณ์ ปานสุข, สุทธิณี เหลาแตว, พัชร ดนัยสวัสดิ์, ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ, ธงชัย ฐิติภูรี, รชตะ มณีอินทร์, 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

2556-2557	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของสปีชีส์ย่อยของไก่ฟ้าหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไก่ฟ้าหลังเทา (*L. leucomelana*) ในประเทศไทยโดยลำดับดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย
2556-2557	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งบางชนิดในสกุล *Microhyla* ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ
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. การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในพื้นที่สวนสัตว์เปิด

เขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยใช้นิวเคลียร์ยีนเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ (ทุน อพ.สธ. ปีงบประมาณ 2558) สถานภาพงานวิจัย 10%

2. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของสปีชีส์ย่อยของไก่ฟ้าหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไก่ฟ้าหลังเทา (*L. leucomelana*) ในประเทศไทยโดยลำดับดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ทุน สกว. ปีงบประมาณ 2556) สถานภาพงานวิจัย 70%

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