รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

ความหลากหลายทางชนิด นิเวศวิทยา การแปรผันทางพันธุกรรม และการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ ระหว่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด ณ ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และพื้นที่ อพ.สธ.

Species diversity, population ecology, genetic variation and genetic assessment of possible natural hybridization among amphibian species at Lainan, Nan province and RSPG Areas

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

รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

ความหลากหลายทางชนิด นิเวศวิทยา การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด ณ ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และพื้นที่ อพ.สธ.

Species diversity, population ecology, genetic variation and genetic assessment of possible natural hybridization among amphibian species at Lainan, Nan province and RSPG Areas

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

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ คุณภาณุพงศ์ ธรรมโชติ และ คุณนายธงชัย ฐิติภูรี ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่างอึ่งและจำแนกชนิดของอึ่งในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

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

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

Abstract

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

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

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	9
ผลการศึกษา	15
สรุปและวิจารณ์ผล	30
เอกสารอ้างอิง	32
ประวัตินักวิจัยและคณะ	35

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	11
ตารางที่ 2	ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของ *M. fissipes* ในแต่ละพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง	26

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะสัณฐานภายนอกของอึ่งน้ำเต้า	6
ภาพที่ 2	ลักษณะสัณฐานภายนอกของอึ่งข้างดำ	7
ภาพที่ 3	ลักษณะสัณฐานภายนอกของอึ่งลายเลอะ	8
ภาพที่ 4	ผลการตรวจสอบขนาด PCR product ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 9 ตัว จากตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดย PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส	15
ภาพที่ 5	ผลการตรวจสอบขนาด PCR product ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 16 ตัว จากตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดย PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส	16
ภาพที่ 6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 678 bp จำนวน 25 ตัวอย่าง จาก 2 ประชากรของอึ่งน้ำเต้า (*M. fissipes*) จากตำบลไหล่น่าน (MFRN) และตำบลส้าน (MFS) อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน เทียบกับ outgroup ได้แก่ *M. ornata*, *M. okinavensis*, *M. annectens* และ *M. marmorata* โดยเครื่องหมาย (.) แสดงตำแหน่งของเบสที่เหมือนกัน	17
ภาพที่ 7	ค่า Genetic distance ภายในประชากรของอึ่งน้ำเต้าจากตำบลไหล่น่าน จำนวน 9 ตัวอย่าง (MFRN# 1-9) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 678 bps	24
ภาพที่ 8	ค่า Genetic distance ภายในประชากรของอึ่งน้ำเต้าจากตำบลส้าน จำนวน 16 ตัวอย่าง (MFS# 1-16) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 678 bp	24
ภาพที่ 9	ค่า Genetic distance ระหว่างประชากรของอึ่งน้ำเต้าจากตำบลไหล่น่าน และตำบลส้าน จำนวน 25 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 678 bps	25

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 10	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า (Phylogenetic tree) ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood method โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *M. ornata*, *M. okinavensis*, *M. annectens* และ *M. marmorata* เป็น outgroup.....	27
ภาพที่ 11	แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของประชากรอึ่งน้ำเต้า (Phylogenetic tree) และอึ่งข้างดำที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้และก่อนหน้านี้ ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood method โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *M. ornata*, *M. okinavensis*, *M. annectens* และ *M. marmorata* เป็น outgroup.....	28

ความหลากหลายทางชนิด นิเวศวิทยา การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด ณ ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และพื้นที่ อพ.สธ.

SPECIES DIVERSITY, POPULATION ECOLOGY, GENETIC VARIATION AND GENETIC ASSESSMENT OF POSSIBLE NATURAL HYBRIDIZATION AMONG AMPHIBIAN SPECIES AT LAINAN, NAN PROVINCE AND RSPG AREAS

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 และพื้นที่ที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่เป็นป่าธรรมชาติ รวมทั้งเกาะแก่งของทะเลไทย ด้วยความหลากหลายของพื้นที่และตำแหน่งที่ตั้งต่างๆ ก่อให้เกิดที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่าจำนวนมาก รวมทั้งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในปัจจุบันมีชุมชนขนาดเล็กเข้าไปตั้งถิ่นฐานอยู่อย่างถาวรในพื้นที่และพื้นที่ใกล้เคียงบางส่วนและส่วนหนึ่งดำรงชีวิตจากการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรในพื้นที่โดยได้ทำการบุกรุกทำลายป่าและแหล่งน้ำธรรมชาติไปแล้วบางส่วนเพื่อทำการเกษตรและยังล่าสัตว์ป่ากินเป็นอาหารด้วย โดยเฉพาะในบริเวณพื้นที่ที่เป็นเขตติดต่อระหว่างป่ากับหมู่บ้าน/พื้นที่กิจกรรมของมนุษย์

การศึกษาสำรวจชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรของสัตว์ป่าในพื้นที่เหล่านี้ โดยเฉพาะสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาในรายละเอียด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาทางด้านพันธุกรรม อนึ่งในช่วงทศวรรษที่ผ่านมานักชีววิทยาในหลายๆ ประเทศได้ให้ความสนใจศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปรากฏการณ์การผสมข้ามสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ (natural hybridization) ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการ (closely related species) กันอย่างกว้างขวางโดยใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาควบคู่ไปกับการศึกษาทางด้านสัณฐานภายนอก (Arnold, 1997, 2006; Mallet, 2005) ซึ่งจากการศึกษาวิจัยดังกล่าวนักชีววิทยาหลายท่านพบว่าสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ เมื่อมีการกระจายตัวมาอยู่ในบริเวณติดต่อกัน (contact zone) หรือทับซ้อนกัน (overlap area) มีความเสี่ยงสูงที่จะผสมพันธุ์ข้ามกันระหว่างสปีชีส์ที่ต่างกันแต่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการ ในบางกรณี การผสมข้ามสายพันธุ์เกิดขึ้นอย่างประสบความสำเร็จและนำไปสู่การผลิตลูกผสม (hybrid) ที่มีชีวิตและไม่เป็นหมันได้ จากเหตุการณ์ดังกล่าว โดยใช้

เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ ทำให้นักชีววิทยาสามารถตรวจหาร่องรอยของการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์กันในอดีตได้ โดยตรวจสอบดูว่ามีการถ่ายทอดสารพันธุกรรม (ไม่ว่าจะเป็นไมโทคอนเดรียลยีนหรือนิวเคลียร์ยีน) จากสิ่งมีชีวิตสปีชีส์หนึ่งไปยังสิ่งมีชีวิตอีกสปีชีส์หนึ่งหรือไม่ ถ้าตรวจพบ ก็แสดงว่าสิ่งมีชีวิตสอง สปีชีส์นั้นสามารถผสมข้ามสายพันธุ์ได้ เราเรียกปรากฏการณ์การถ่ายทอดยีนระหว่างสปีชีส์ โดยอาศัยลูกผสมที่เกิดขึ้นเป็นตัวกลางในการถ่ายทอดนี้ว่า "การเกิดยีนโฟลว์หรืออินโทรเกรสชั่น" (gene flow or introgression) (e.g., Barton & Hewitt, 1985; Mallet, 2005; Plotner et al., 2008).

สาเหตุที่ต้องใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาเข้ามาตรวจสอบความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์หรือ introgression นั้นก็เนื่องจากลูกผสม (interspecific hybrid) หรือลูกผสมแบคคลอส (backcross hybrid) ไม่ว่าจะเป็นรุ่นที่หนึ่ง สอง สาม หรือรุ่นต่อๆ มานั้น มักจะมีลักษณะสัณฐานภายนอกที่กึ่งกึ่ง (intermediate) ระหว่างสปีชีส์พ่อและสปีชีส์แม่ หรือมีแนวโน้มคล้ายคลึงกับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่ สปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่งมาก ทำให้การจำแนกหรือระบุสปีชีส์ของตัวอย่างๆ นั้นว่าเป็นสปีชีส์พ่อ, สปีชีส์แม่, ลูกผสม หรือลูกผสมแบคคลอส นั้นทำได้ยากและขาดความน่าเชื่อถือ ดังนั้น เพื่อเพิ่มความถูกต้องและน่าเชื่อถือในการระบุชนิดหรือลูกผสมประเภทต่างๆ จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลทั้งจากลักษณะสัณฐานภายนอกและข้อมูลทางด้านอณูชีววิทยาควบคู่กันไป ซึ่งการใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา ส่วนใหญ่จะใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอหรือ mtDNA หรือจากจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซน์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ จากการศึกษาด้วยวิธีการดังกล่าว ทำให้ผู้ศึกษาวิจัยสามารถตรวจพบการเกิด introgression ของ mtDNA ในสัตว์หลายชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการ เช่น ในปลา (e.g. Wilson & Bernatchez, 1998) ในแมลงหวี่ (e.g. Bachtrog et al., 2006), ในกระต่ายป่า (e.g. Alves et al., 2008; Plötner et al., 2008) และในหนู (Bozikova et al., 2005) เป็นต้น การตรวจพบการเกิด introgression ย่อมส่งผลกระทบต่อการศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอย่างมาก กล่าวคือ ทำให้เกิดความสับสนและคลุมเคลือในการระบุและจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา รวมทั้งทำให้เกิดความสับสนในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอีกด้วย ประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง แต่การศึกษาเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์หรือการเกิด 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) เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อยู่ในสกุลเดียวกัน คือ สกุล *Microhyla* มีลักษณะสัณฐานภายนอกคล้ายคลึงกัน มีขนาดลำตัวเล็ก ไม่แตกต่างกันมาก ในประเทศไทยสามารถพบการกระจายตัวของอึ่งทั้งสามชนิดได้ในทุกภาคของประเทศไทย อึ่งทั้งสามชนิดนี้มีลักษณะถิ่นอาศัยเฉพาะคล้ายๆ กัน คือใต้ใบไม้ กองหิน กองหญ้า และวัสดุอื่นๆ บนพื้นดิน มีการกระจายตัวทับซ้อนกันในหลายพื้นที่ในประเทศไทย และที่สำคัญอึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีการปฏิสนธิภายนอกตัว (external fertilization) ซึ่งเป็นกระบวนการที่สามารถเพิ่มความเสี่ยงให้สเปิร์มของอึ่งชนิดหนึ่งเข้าผสมกับไข่ของอึ่งอีกชนิดหนึ่งได้ง่ายกว่าการมีการปฏิสนธิภายในตัว (internal

fertilization) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด จึงมีความเป็นไปได้ที่อึ่งสองหรือสามชนิดนี้จะผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ ดังนั้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมพันธุ์ข้ามกันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดนี้ จึงควรตรวจสอบดูว่ามียีนโฟลว์จากประชากรของอึ่งชนิดหนึ่งไปยังประชากรของอึ่งอีกชนิดหนึ่งหรือไม่ โดยใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาในการตรวจสอบ

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

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

การผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตสองชนิดที่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรหรือสปีชีส์ที่แตกต่างกัน โดยการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์นั้นมีผลมาจากกระบวนการการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete reproductive isolation) (Futuyma, 1997) ในบางกรณีการผสมข้ามสายพันธุ์อาจนำไปสู่การผลิตลูกผสม (hybrid) ซึ่งลูกผสมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะมีลักษณะสัณฐานภายนอกก้ำกึ่ง (intermediate) ระหว่างสิ่งมีชีวิตสองชนิดที่ผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์กัน ทั้งนี้ถ้าลูกผสมที่เกิดขึ้นนั้นสามารถอยู่รอดและสืบพันธุ์ได้ ลูกผสมเหล่านั้นอาจทำให้เกิดการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ระหว่างสปีชีส์ทั้งสองได้ (Arnold, 1997, 2006; Mallet, 2005) โดยการผสมพันธุ์แบบ backcross กับสปีชีส์พ่อและ/หรือสปีชีส์แม่ การที่ลูกผสมมีการผสมพันธุ์แบบ backcross กับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่จะทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนกับสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่มากขึ้น จนในที่สุดเกิดเป็นลูกผสมที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนสปีชีส์พ่อหรือสปีชีส์แม่จนแยกไม่ออก ในกรณีนี้ จึงมีการนำเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) มาใช้ในการตรวจสอบร่วมกับข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา เช่น การตรวจสอบยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตร่วมกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตจากลักษณะสัณฐานภายนอก ซึ่งหากสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นลูกผสม สิ่งมีชีวิตนั้นจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ไม่สอดคล้องกับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นโดยใช้ลักษณะสัณฐานภายนอก การผสมข้ามสายพันธุ์ในธรรมชาตินั้น ในอดีตเชื่อว่าเกิดขึ้นได้ยาก เนื่องจากเชื่อว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีกลไกการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ ทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ไม่สามารถผสมพันธุ์กับสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์ได้ แต่ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่ามีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ 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) และในหนู (Bozikova et al., 2005) เป็นต้น

การใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาเพื่อศึกษาการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์และการเกิด introgression ของยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินนั้น ปัจจุบันพบว่ายังมีไม่มากนัก จากรายงานพบการเกิด introgression ของ mtDNA ใน The European water frog ระหว่าง *Rana ridibunda* และ *R. lessonae* (Spolsky and Uzzell, 1984) ใน canyon treefrogs ระหว่าง *Hyla arenicolor* และ *H.*

wrightorum (Klymus et al., 2010) ใน green pond frogs ระหว่าง *Pelophylax nigromaculatus* และ *P. plancyi* (Liu et al., 2010) เป็นต้น ซึ่งการเกิด introgression ดังกล่าวย่อมส่งผลกระทบต่อการศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอย่างมาก กล่าวคือ ทำให้เกิดความสับสนและคลุมเคลือในการระบุและจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา รวมทั้งทำให้เกิดความสับสนในการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการอีกด้วย ดังนั้นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีการกระจายตัวทับซ้อนกันในบางพื้นที่อาศัย จึงถือเป็นสิ่งจำเป็นเร่งด่วนที่ต้องศึกษา เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประกอบการศึกษาอนุกรมวิธานเพื่อให้การระบุสปีชีส์มีความ ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น และเพื่อการจัดการทรัพยากรอย่างเหมาะสม รวมไปถึงการประยุกต์ในเชิงอนุรักษ์สายพันธุ์หรือพันธุ์กรรมดั้งเดิมต่อไป

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) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการ จัดอยู่ในสกุลเดียวกัน คือ *Microhyla* อึ่งน้ำเต้า มีความยาวประมาณ 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) และที่สำคัญการที่อึ่งทั้งสามชนิดมีการปฏิสนธิแบบภายนอกตัว (external fertilization) ทำให้โอกาสที่จะเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์กันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดเป็นไปได้สูงกว่าการปฏิสนธิแบบภายในตัว (internal fertilization) เพราะการปฏิสนธิแบบภายนอกตัวเป็นการเพิ่มโอกาสให้สเปิร์มของอึ่งชนิดหนึ่งเข้าผสมกับไข่ของอึ่งอีกชนิดหนึ่งได้ง่าย (Huxel, 1999; Wells, 1977) จากข้อมูลดังกล่าวประกอบกับมีการสำรวจพบอึ่งที่มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างอึ่งทั้งสามชนิด (intermediate) และมีการศึกษาพบว่ากบนา 2 สปีชีส์ คือ *Rana limnocharis* และ *R. cancrivora* สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ (Sumida, et al., 2002) จึงเกิดสมมติฐานว่าอึ่งทั้งสามชนิดสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันในธรรมชาติได้ ซึ่งในการทดสอบสมมติฐานนี้ เราสามารถใช้วิธีการตรวจสอบได้ทั้งทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และทางพันธุกรรม (Genetics) แต่เนื่องจากการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดของอึ่ง โดยเฉพาะอึ่งที่มีลักษณะ intermediate ซึ่งยากต่อการจำแนกชนิดของอึ่ง ดังนั้นในการทดสอบสมมติฐานในครั้งนี้ จึงนำวิธีการตรวจสอบทางพันธุกรรมเข้ามาช่วย โดยจะทำการตรวจสอบการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน COI ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิด แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเริ่มต้นและยังไม่มีการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ ดังนั้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์กันระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดจึงต้องเริ่มจากการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งทั้ง 3 ชนิด เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาออกแบบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มี

ความจำเพาะต่ออึ่งแต่ละชนิดก่อน (Species specific mitochondrial DNA markers) จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้ไปใช้ตรวจสอบการถ่ายเทเคลื่อนย้ายของยีน COI ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดต่อไป

ข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

อึ่งน้ำเต้า
Ornate Chorus Frog
Microhyla fissipes Boulenger, 1884

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

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

<u>ที่อยู่อาศัย</u> ซ่อนตัวใต้ใบไม้ ขอนไม้ และวัสดุที่กองอยู่บนพื้นป่า ทั่วไปพบในปริมาณประชากรสูงที่สุดในกลุ่มอึ่งขนาดเล็กทั้งหมด โดยเฉพาะในฤดูฝนช่วงเดือนกรกฎาคม พบในปริมาณมากบริเวณป่าดิบแล้ง รอบๆ แอ่งน้ำที่เป็นแหล่งเติบโตของลูกอ๊อด ตั้งแต่ปลายเดือนมีนาคมจนถึงเดือนมิถุนายน ลูกอึ่งขนาดเล็กมักหากินรอบๆ แอ่งที่เติบโตมาจากที่เป็นลูกอ๊อด

<u>อุปนิสัย</u> 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)

ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานภายนอกของอึ่งน้ำเต้า

อึ่งข้างดำ
Dark side chorus frog
Microhyla heymonsi Vogt, 1911

ลักษณะ ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงรูทวารร่วมประมาณ 2-3 เซนติเมตร หัวแหลม ลำตัวป้อมทรงสามเหลี่ยม ผิวหนังเรียบสีน้ำตาลกลางหลังมีลายจางๆ คล้ายรูปน้ำเต้า อาจมีเส้นสีครีมเล็กๆ พาดตามยาวหรือไม่ก็ได้ กลางหลังมีจุดสีดำ 1 จุด ด้านข้างของหัวและลำตัวถึงซอกขาหลังมีสีดำ ช่องจมูกภายในขนาดเล็ก ไม่มีฟันที่เพดานปาก กระดูก premaxilla และ maxilla สั้นเรียวยาว ปลายสั้นไม่มีรอยหยัก เพศผู้มีถุงเสียงภายนอก รูจมูกอยู่ด้านบนเกือบปลายสุดหัว อัตราส่วนระยะห่างประมาณ 1:3 เท่า ปลายปากมีลักษณะโค้งนูนเป็นสัน เยื่อบุช่องหูมองไม่เห็นจากภายนอก ท้องสีครีม รอบก้นมีสีน้ำตาลเข้ม เพศผู้มีคอและอกสีดำ นิ้วมือและขาหน้าท่อนล่างมีลายพาดขวาง ขาหลังสีเดียวกับลำตัว เมื่อพับขาหลังเข้ามาจะเห็นลายพาดขวางต่อเนื่องกัน 2-3 แถบ เท้าหน้าไม่มีพังผืด ปลายนิ้วเท้าหน้าไม่ขยายออก (ภาพที่ 2) (ธัญญา, 2546; วิเชฏฐ์และคณะ 2546)

การแพร่กระจาย ไต้หวัน จีน อินเดีย พม่า ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ ในประเทศไทยพบทุกภาคของประเทศ

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

อุปนิสัย หลบซ่อนตัวในเวลากลางวันบริเวณที่มีความชุ่มชื้นและออกหากินเวลากลางคืน เมื่อถูกรบกวนจะกระโดดหนีเป็นระยะทางไกล เวลาตกลงสู่พื้นดินจะรีบพลิกตัวหลบเข้าใต้ใบไม้หรือวัสดุอื่นๆ ทันที ไม่หมอบนิ่งอยู่กับที่

เหมือนอึ่งชนิดอื่นๆ จึงจับตัวมาศึกษาได้ยาก ผสมพันธุ์และวางไข่ในแอ่งน้ำขังชั่วคราวที่กระจายอยู่ในป่าเต็งรัง และในป่าดิบแล้งระหว่างฤดูฝน รวมทั้งในอ่างเก็บน้ำ และถังน้ำที่ตั้งไว้ในพื้นที่ป่า

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

ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานภายนอกอึ่งข้างดำ

อึ่งลายเลอะ
Noisy chorus frog
Microhyla butleri Boulenger, 1900

<u>ลักษณะ</u> มีขนาดตัวเล็ก ขนาดวัดจากปลายปากถึงรูทวารร่วมประมาณ 30 มิลลิเมตร ลำตัวเรียว หัวแหลม ผิวหนังลำตัวเรียบ แต่ทางส่วนต้นของด้านหลังมีตุ่มแบนกระจายอยู่บ้าง ด้านหลังสีเทาหรือสีน้ำตาลเทาหรือสีน้ำตาลแดง ส่วนปลายสุดของหัวเป็นสีจางและมีทางสีครีมจากด้านท้ายตัวลงไปที่ต้นขาหน้า บนหลังมีลวดลายสีเข้มขอบขาวหรือขอบสีแดงรูปร่างคล้ายน้ำเต้า ด้านข้างลำตัวสีจางและมีจุดสีแดงกระจาย เพศผู้มีคางเป็นจุดประสีเทาเข้มและซีดจางจนเกือบขาวในเพศเมีย ขาหน้าและขาหลังเรียวยาว เมื่อพับขาหลังแนบกับลำตัวไปทางด้านหน้า ข้อเท้าอยู่ในตำแหน่งใกล้ส่วนปลายของปาก นิ้วเท้าหน้าไม่มีแผ่นหนังระหว่างนิ้ว นิ้วเท้าหลังมีแผ่นหนังประมาณ 1/3 ของความยาวนิ้ว ส่วนปลายของนิ้ว ทุกนิ้วขยายออกเป็นตุ่มและมีรอยหยักทางด้านหน้าของตุ่ม กับมีร่องยาวอยู่ทางด้านบนของตุ่ม ตุ่มของนิ้วเท้าหลังใหญ่กว่าของนิ้วเท้าหน้า (ภาพที่ 3) (ธัญญา, 2546; วิเชฏฐ์และคณะ 2546)

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

ที่อยู่อาศัย อยู่ตามพื้นล่างของป่าบริเวณที่มีความชุ่มชื้น โดยทั่วไปอยู่ตามชั้นใบไม้ผุบนพื้นป่าดิบแล้งและป่ารกๆ ริมลำห้วย ซ่อนอยู่ใต้ขอนไม้และกองใบไม้ผุ

อุปนิสัย หลบซ่อนตัวในเวลากลางวันบริเวณที่มีความชุ่มชื้นและออกหากินเวลากลางคืน ผสมพันธุ์และวางไข่ในอ่างเก็บน้ำ มีเสียงร้องดังกว่าอึ่งชนิดอื่นๆ

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

ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานภายนอกอึ่งลายเลอะ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI (cytochrome c oxidase subunit I) ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ระหว่างประชากรของอึ่งน้ำเต้า (*M. fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butleri*) ในพื้นที่ต่างๆ ในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งทั้งสามชนิดที่กระจายตัวอยู่ในพื้นที่ต่างๆ ในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และในโครงการ อพ.สธ.
3. เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในพื้นที่ต่างๆ ในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่านและในโครงการ อพ.สธ. โดยใช้ยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบ

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 และอึ่งลายเลอะจากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน จำนวนชนิดละประมาณ 10-20 ตัว โดยตัวอย่างที่เก็บมาได้จะถูกเก็บรักษาตัวอย่างไว้ใน 95% เอธานอล เพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3.3 ขั้นตอนการทดลอง

ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลักๆ ได้แก่

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

3.3.2 การเพิ่มจำนวนยีน COI ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (DNA amplification)

3.3.3 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

3.3.4 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการให้บริสุทธิ์ (PCR product purification)

3.3.5 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

3.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Multiple sequence alignment and genetic analyses)

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอ (total DNA) จากเนื้อเยื่อตับของอึ่งโดยใช้ 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 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 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) จากนั้นนำตัวอย่างเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายใส (supernatant) ปริมาณ 540 ไมโครลิตร ลงในมินิคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอในสารละลายจับตัวกับเมมเบรน (membrane) ในหลอดมินิคอลัมน์
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 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (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 ชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

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	45°C	1 นาที
	Extension	72°C	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 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการให้บริสุทธิ์ (PCR product purification)

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

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

3.3.5 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

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

3.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (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 ของอึ่งทั้งสามชนิดทั้งภายในและระหว่างประชากร 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 สร้างแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวัฒนาการและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum Likelihood method โดยคำนวน bootstrap percentage 1,000 ครั้ง เพื่อสนับสนุน tree ที่ได้ด้วยโปรแกรม Mega version 5.05 โดยใช้ *M. ornate* (Genbank accession number DQ512876), *M. okinavensis* (AB303950), *M. annectens* (AB611944) และ *M. marmorata* (AB611952) เป็น outgroup

ของการศึกษา จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์เพื่อหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพื่อทำการออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่ออิ่งแต่ละชนิด

ผลการศึกษา

1. ผลการเก็บตัวอย่างอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ จากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

ได้ทำการสำรวจและพยายามเก็บตัวอย่างอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ จากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดยในการศึกษาครั้งนี้เก็บได้เฉพาะตัวอย่างของอึ่งน้ำเต้า (*M. fissipes*) เพียงสปีชีส์เดียวเท่านั้น จำนวน 25 ตัว จากสองพื้นที่ของอำเภอเวียงสา คือ จากตำบลไหล่น่าน จำนวน 9 ตัว (MFRN# 1-9) และ จากตำบลส้าน จำนวน 16 ตัว (MFS# 1-16) แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการเก็บตัวอย่างของอึ่งข้างดำและอึ่งลายเลอะจากทั้งสองพื้นที่ ทั้งนี้ตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมด ได้ทำการรักษาตัวอย่างไว้ใน 95% เอธานอล

2. ผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนยีน COI ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตับของอึ่งน้ำเต้าทั้ง 25 ตัวอย่าง และเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดมาได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ LCO1490 และ HCO2198 โดยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าอึ่งน้ำเต้าทั้ง 25 ตัวอย่าง ให้ผล PCR product เป็นแถบสีเข้ม band เดียวชัดเจน โดยขนาดของ PCR product ที่ต้องการมีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 4 และ 5)

ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบขนาด PCR product ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 9 ตัว จากตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดย PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane N	: Negative control (ไม่มี DNA template ใช้ MilliQ แทน)
Lane 2-4 และ 5-9	: PCR product ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 9 ตัว (ตัวอย่างที่ MFRN #1-9 ตามลำดับ)
Lane M:	: 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบขนาด PCR product ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 16 ตัว จากตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดย PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

Lane 1-8 และ 9-16 : PCR product ของอึ่งน้ำเต้าจำนวน 16 ตัว (ตัวอย่างที่ MFS# 1-16 ตามลำดับ)

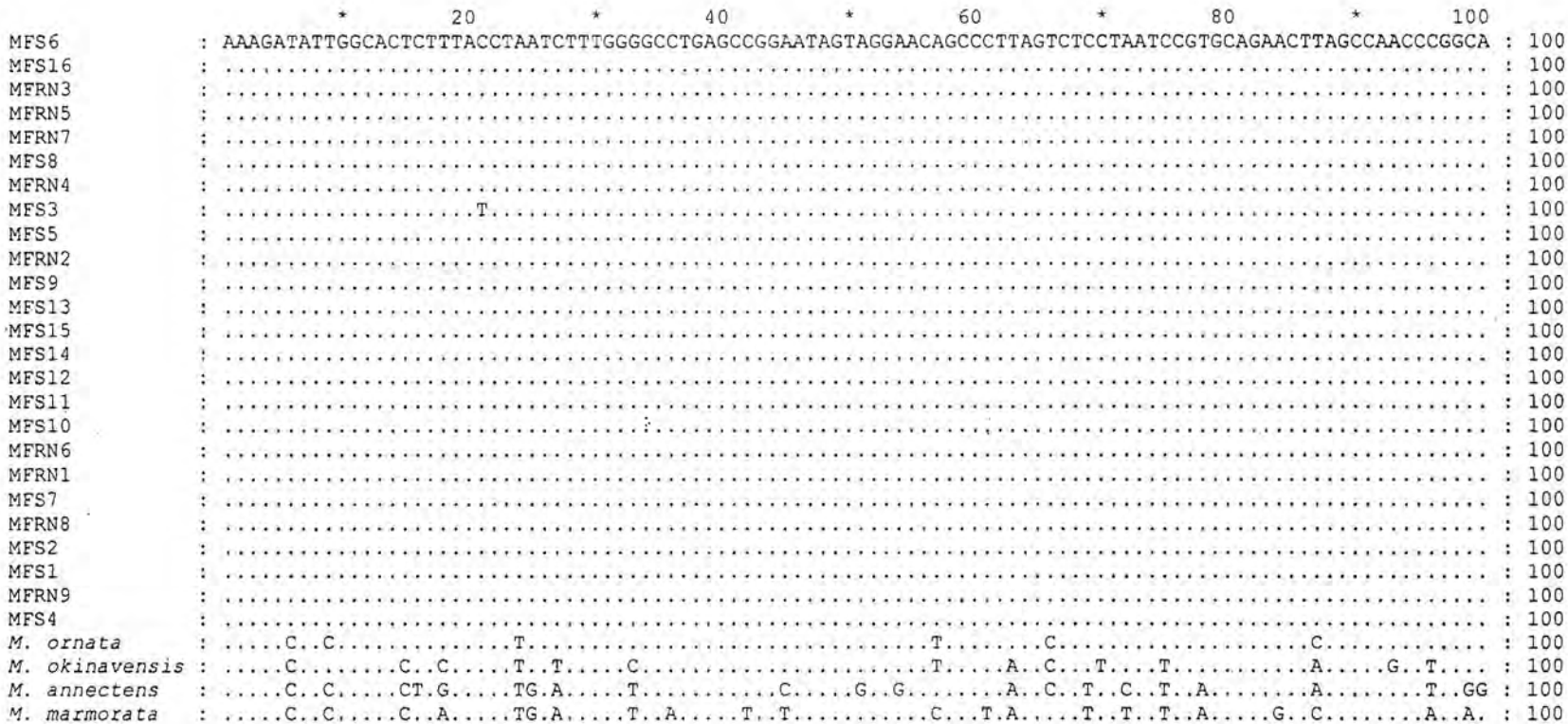
Lane M : 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder

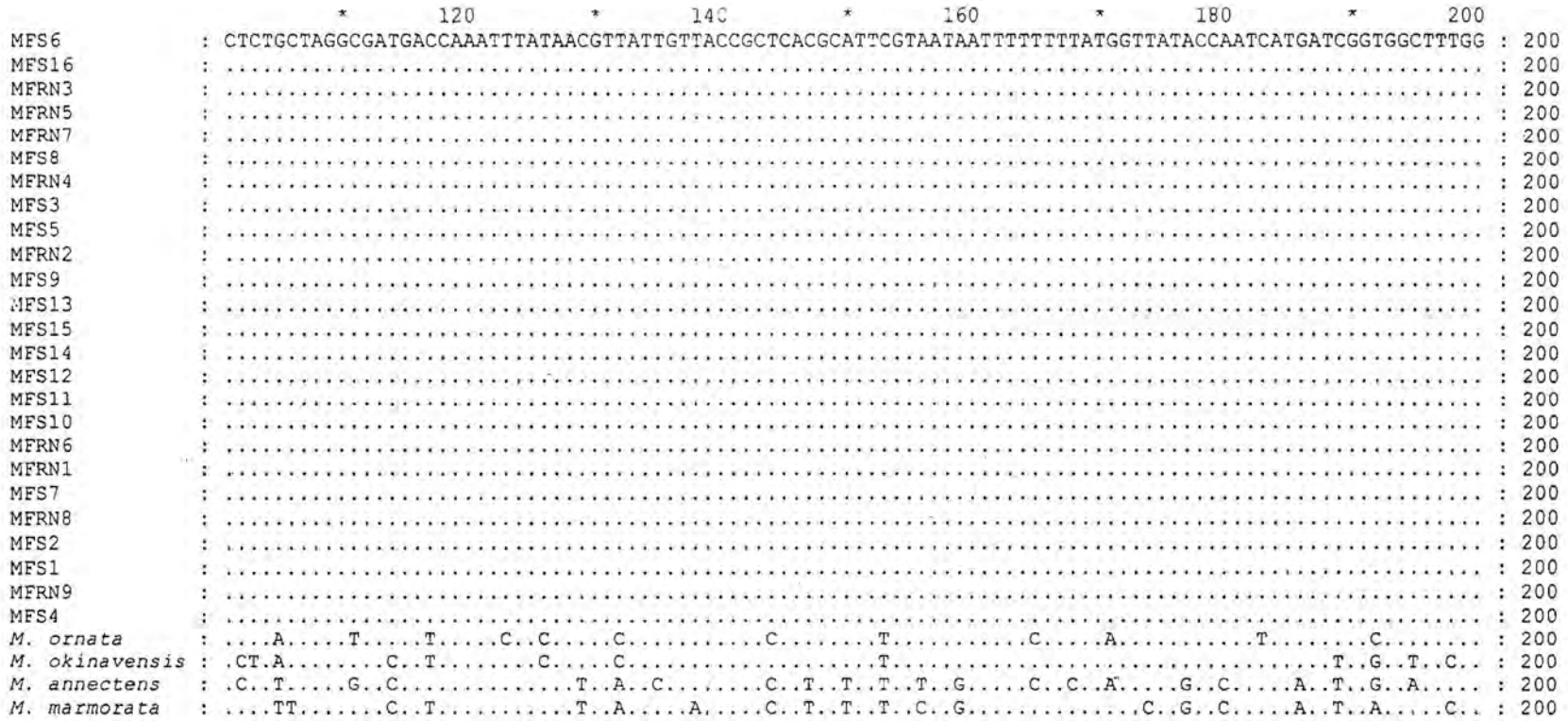
3. ผลการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของประชากรอึ่งน้ำเต้าในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

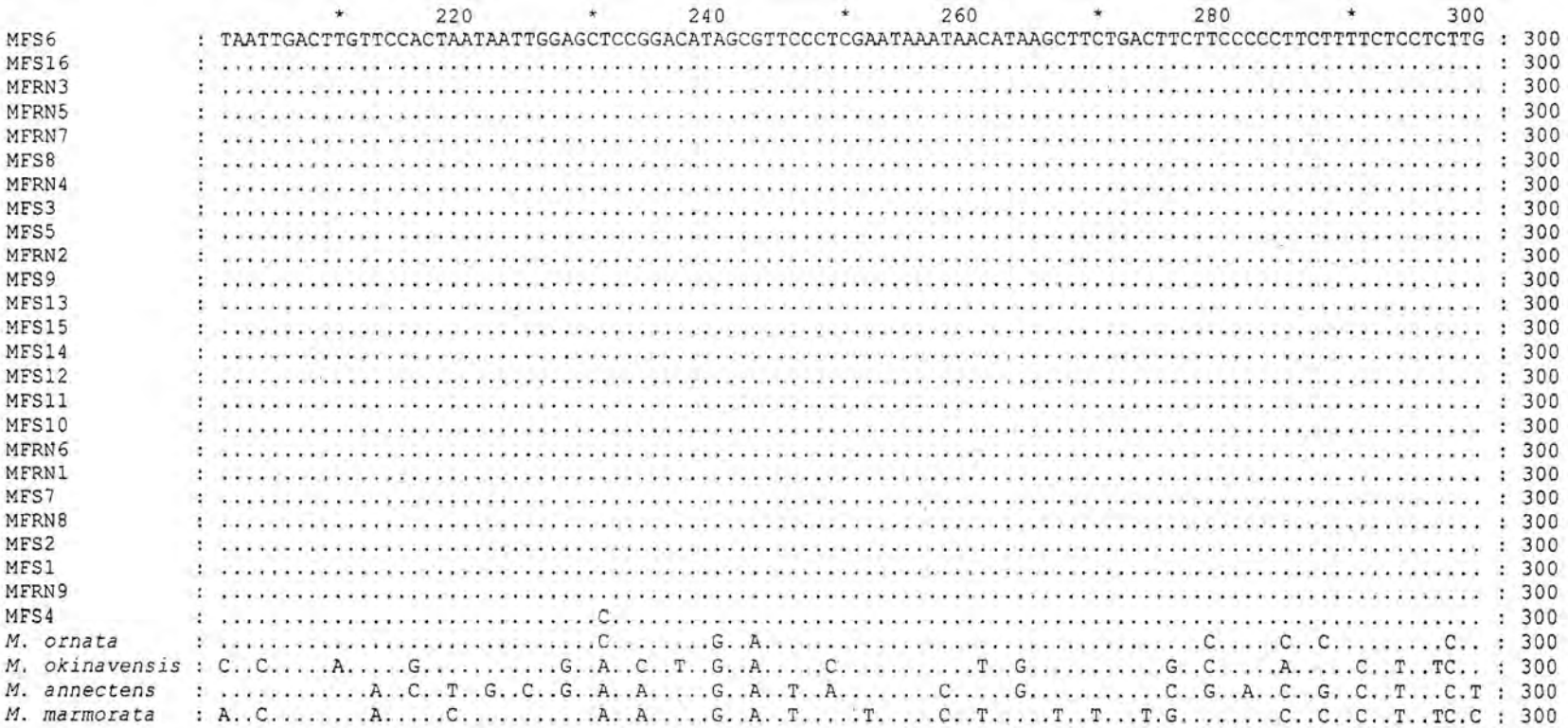
เมื่อนำ PCR product ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของอึ่งน้ำเต้า ในสองพื้นที่ของอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน จำนวน 25 ตัวอย่าง ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ พบว่า PCR product ของอึ่งน้ำเต้าทั้ง 25 ตัวอย่าง ให้ผล sequencing ชัดเจนและไม่เกิดการซ้อนทับกันของลำดับเบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 678 คู่เบส มีเปอร์เซ็นต์ A+T เฉลี่ยเท่ากับ 0.57 ซึ่งประกอบด้วยเปอร์เซ็นต์ nucleotide composition ดังนี้ T = 33.4%, C = 25.9%, A = 23.7% และ G = 17.0%

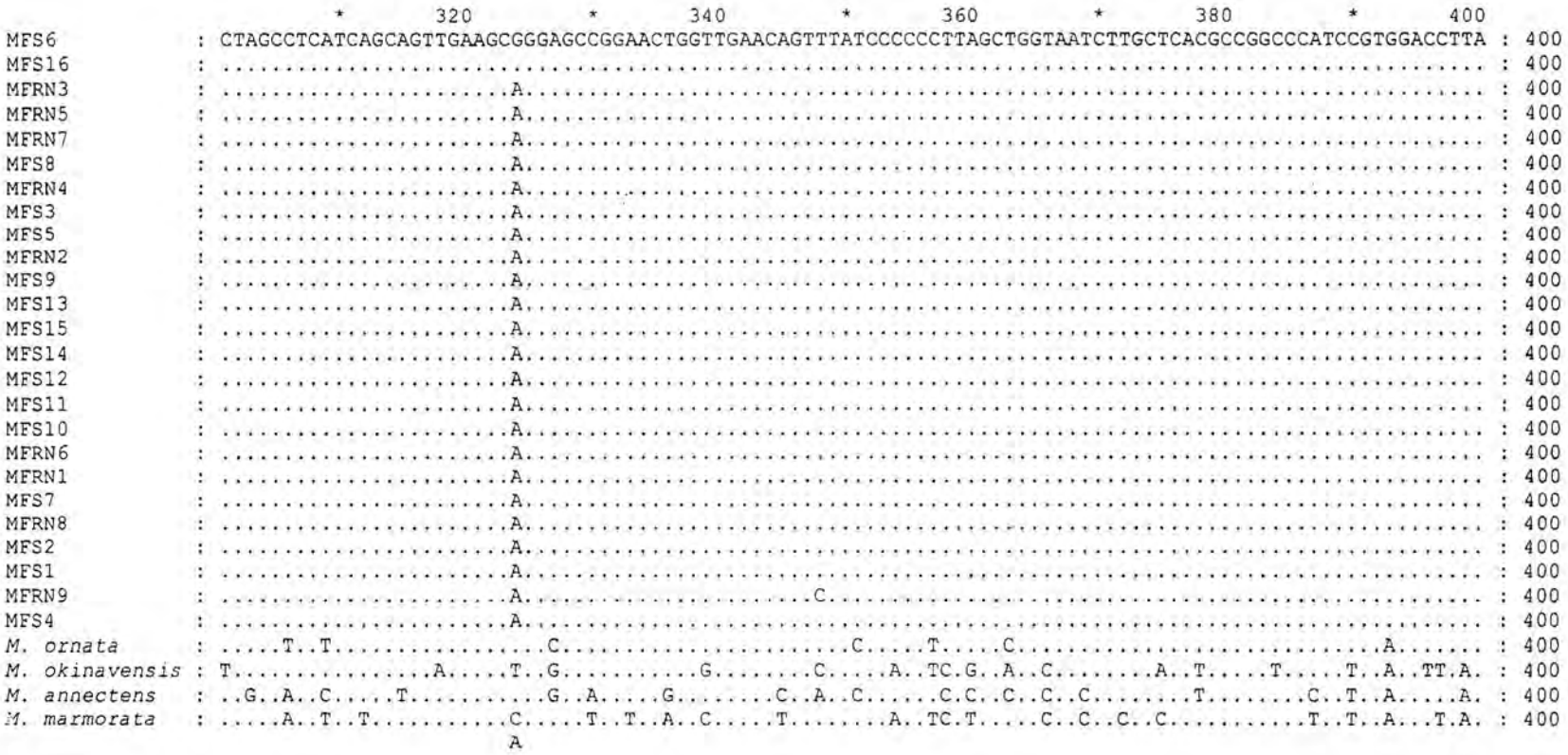
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 25 sequence ด้วยโปรแกรม Dnasp พบจำนวน haplotype ที่แตกต่างกันจำนวน 7 haplotype ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 6 (0.88%) ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 21, 231, 324, 348, 547 และ 639 (ภาพที่ 6) นอกจากนี้ในการหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยวิธี Kimura two parameter ด้วยโปรแกรม Mega พบว่า genetic distance ภายในประชากรอึ่งน้ำเต้าที่ตำบลไหล่น่าน มีค่าอยู่ระหว่าง 0.000-0.003 (ภาพที่ 7) และภายในประชากรอึ่งน้ำเต้าที่ตำบลส้าน มีค่าอยู่ระหว่าง 0.000-0.003 (ภาพที่ 8) ส่วน genetic distance ระหว่างประชากร มีค่าอยู่ระหว่าง 0.000-0.003 (ภาพที่ 9)

การคำนวณค่าต่างๆ ของอึ่งน้ำเต้าในแต่ละประชากร ได้แก่ จำนวนตัวอย่าง (n), จำนวนของ mutation (m), จำนวนของ haplotype (h), ค่าความหลากหลายของ haplotype (haplotype diversity; hd), และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity; π) แสดงไว้ในตารางที่ 2 ทั้งนี้หากพิจารณาจากทุกประชากรจะพบว่า โดยเฉลี่ยค่า haplotype diversity และค่า nucleotide diversity มีค่าค่อนข้างต่ำ โดยเฉลี่ย hd = 0.627 ± 0.102 และ π = 0.00111 ± 0.00024

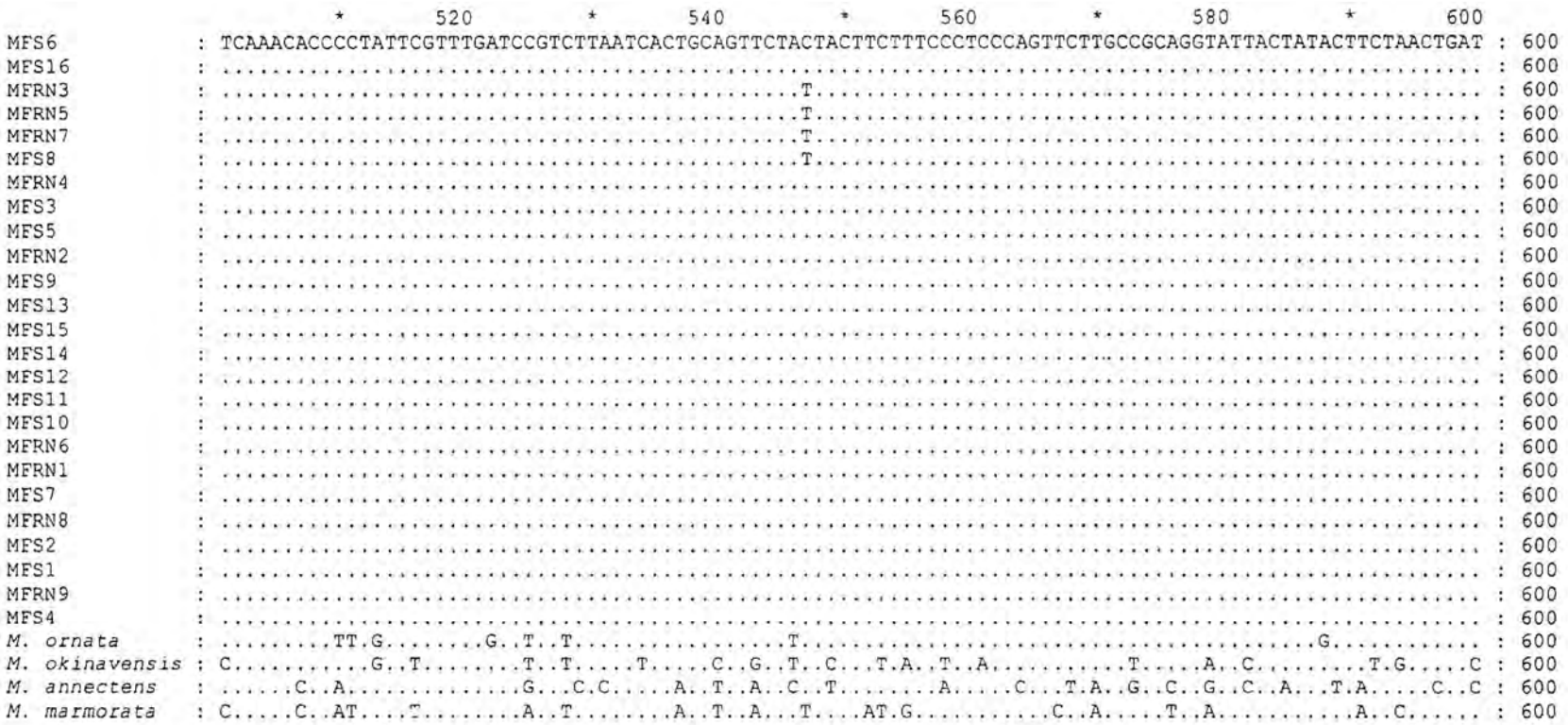

* 20 * 40 * 60 * 80 * 100
MFS6 : AAAGATATTGGCACTCTTTACCTAATCTTTGGGGCCTGAGCCGGAATAGTAGGAACAGCCCTTAGTCTCCTAATCCGTGCAGAACTTAGCCAACCCGGCA : 100
MFS16 : 100
MFRN3 : 100
MFRN5 : 100
MFRN7 : 100
MFS8 : 100
MFRN4 : 100
MFS3 : 100
MFS5 : 100
MFRN2 : 100
MFS9 : 100
MFS13 : 100
MFS15 : 100
MFS14 : 100
MFS12 : 100
MFS11 : 100
MFS10 : 100
MFRN6 : 100
MFRN1 : 100
MFS7 : 100
MFRN8 : 100
MFS2 : 100
MFS1 : 100
MFRN9 : 100
MFS4 : 100
M. ornata : 100
M. okinavensis : 100
M. annectens : 100
M. marmorata : 100

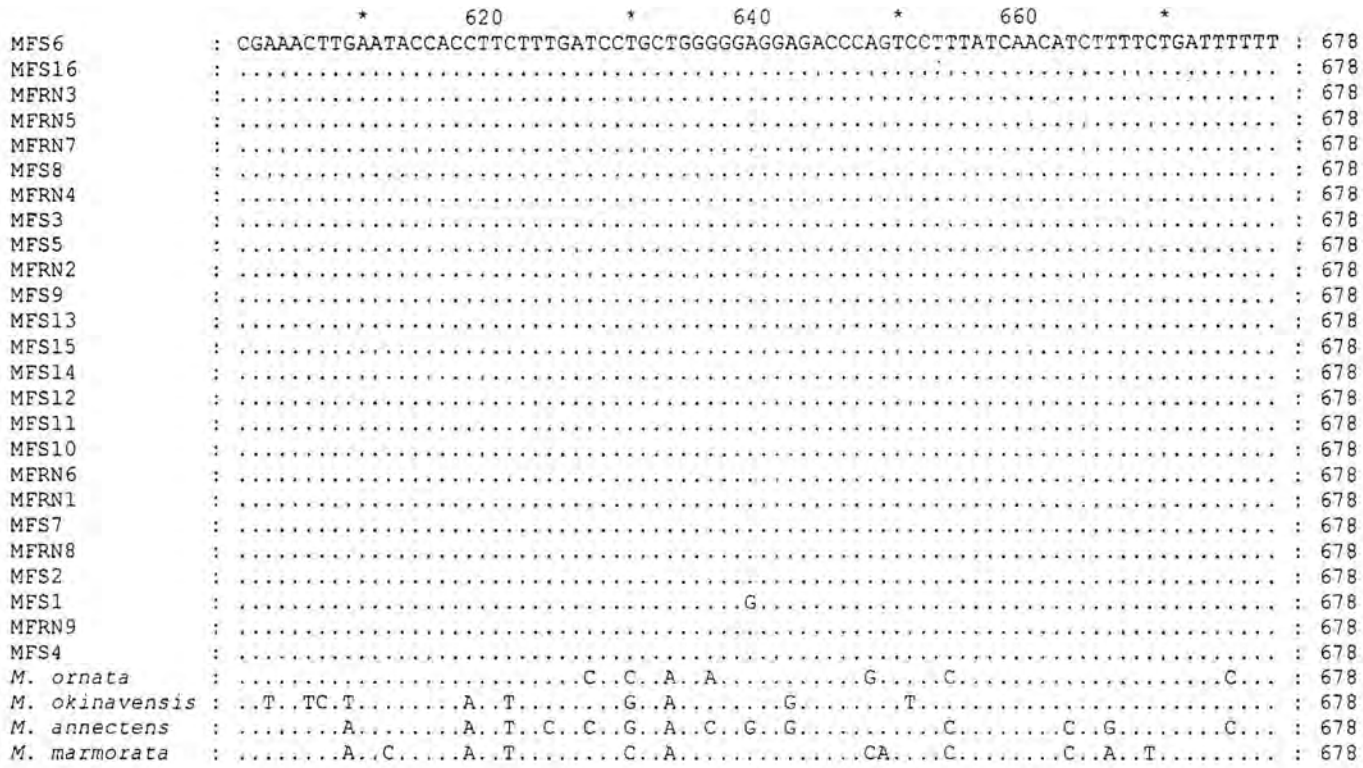

120
140
160
180
200
MFS6 : CTCTGCTAGGCGATGACCAAATTTATAACGTTATTGTTACCGCTCACGCATTCGTAATAATTTTTTTTATGGTTATACCAATCATGATCGGTGGCTTTGG : 200
MFS16 : ..... : 200
MFRN3 : ..... : 200
MFRN5 : ..... : 200
MFRN7 : ..... : 200
MFS8 : ..... : 200
MFRN4 : ..... : 200
MFS3 : ..... : 200
MFS5 : ..... : 200
MFRN2 : ..... : 200
MFS9 : ..... : 200
MFS13 : ..... : 200
MFS15 : ..... : 200
MFS14 : ..... : 200
MFS12 : ..... : 200
MFS11 : ..... : 200
MFS10 : ..... : 200
MFRN6 : ..... : 200
MFRN1 : ..... : 200
MFS7 : ..... : 200
MFRN8 : ..... : 200
MFS2 : ..... : 200
MFS1 : ..... : 200
MFRN9 : ..... : 200
MFS4 : ..... : 200
M. ornata : ....A.....T.....T.....C..C.....C..........C........T..........C.....A..........T........C..... : 200
M. okinavensis : .CT.A.....C..T.....C.....C.....T.....T..G..T..C.. : 200
M. annectens : .C..T.....G..C.....T..A..C.....C..T..T..T..T..G.....C..C..A.....G..C.....A..T..G..A..... : 200
M. marmorata : ....TT.....C..T.....T..A.....A.....C..T..T..T..C..G.....C..G..C.....A..T..A.....C.. : 200


220
240
260
280
300
MFS6 : TAATTGACTTGTTCCACTAATAATTGGAGCTCCGGACATAGCGTTCCCTCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTTCTTCCCCCTTCTTTTCTCCTCTTG : 300
MFS16 : ..... : 300
MFRN3 : ..... : 300
MFRN5 : ..... : 300
MFRN7 : ..... : 300
MFS8 : ..... : 300
MFRN4 : ..... : 300
MFS3 : ..... : 300
MFS5 : ..... : 300
MFRN2 : ..... : 300
MFS9 : ..... : 300
MFS13 : ..... : 300
MFS15 : ..... : 300
MFS14 : ..... : 300
MFS12 : ..... : 300
MFS11 : ..... : 300
MFS10 : ..... : 300
MFRN6 : ..... : 300
MFRN1 : ..... : 300
MFS7 : ..... : 300
MFRN8 : ..... : 300
MFS2 : ..... : 300
MFS1 : ..... : 300
MFRN9 : ..... : 300
MFS4 : .....C..... : 300
M. ornata : .....C.....G..A.....C.....C..C.....C.. : 300
M. okinavensis : C..C.....A.....G.....G..A..C..T..G..A.....C.....T..G.....G..C.....A.....C..T..TC.. : 300
M. annectens : .....A..C..T..G..C..G..A..A.....G..A..T..A.....C.....G.....C..G..A..C..G..C..T...C.T : 300
M. marmorata : A..C.....A.....C.....A..A.....G..A..T.....T.....C..T.....T..T...T.G.....C..C..C..T..TC.C : 300


320
340
360
380
400
MFS6 : CTAGCCTCATCAGCAGTTGAAGCGGGAGCCGGAACTGGTTGAACAGTTTATCCCCCCTTAGCTGGTAATCTTGCTCACGCCGGCCCATCCGTGGACCTTA : 400
MFS16 : ..... : 400
MFRN3 : .....A..... : 400
MFRN5 : .....A..... : 400
MFRN7 : .....A..... : 400
MFS8 : .....A..... : 400
MFRN4 : .....A..... : 400
MFS3 : .....A..... : 400
MFS5 : .....A..... : 400
MFRN2 : .....A..... : 400
MFS9 : .....A..... : 400
MFS13 : .....A..... : 400
MFS15 : .....A..... : 400
MFS14 : .....A..... : 400
MFS12 : .....A..... : 400
MFS11 : .....A..... : 400
MFS10 : .....A..... : 400
MFRN6 : .....A..... : 400
MFRN1 : .....A..... : 400
MFS7 : .....A..... : 400
MFRN8 : .....A..... : 400
MFS2 : .....A..... : 400
MFS1 : .....A..... : 400
MFRN9 : .....A.....C..... : 400
MFS4 : .....A..... : 400
M. ornata : .....T..T.....C.....C.....T.....C.....A..... : 400
M. okinavensis : T.....A.....T..G.....G.....C.....A..TC.G..A..C.....A..T.....T.....T..A..TT.A. : 400
M. annectens : ..G..A..C.....T.....G..A.....G.....C..A..C.....C.C..C..C..C.....T.....C..T..A.....A. : 400
M. marmorata : .....A..T..T.....C.....T..T..A..C.....T.....A..TC.T.....C..C..C..C.....T..T..A...T.A. : 400
A

```
                    *       420         *       440         *       460         *       480         *       500
MFS6          : CAATTTTCTCCTTGCATTTAGCTGGGGTTTCTTCAATTCTTGGGGCAATTAATTTTATTACTACTATTATTAACATAAAACCCCCATCAGTAACTCAGTA : 500
MFS16         : ..................................................................................................... : 500
MFRN3         : ..................................................................................................... : 500
MFRN5         : ..................................................................................................... : 500
MFRN7         : ..................................................................................................... : 500
MFS8          : ..................................................................................................... : 500
MFRN4         : ..................................................................................................... : 500
MFS3          : ..................................................................................................... : 500
MFS5          : ..................................................................................................... : 500
MFRN2         : ..................................................................................................... : 500
MFS9          : ..................................................................................................... : 500
MFS13         : ..................................................................................................... : 500
MFS15         : ..................................................................................................... : 500
MFS14         : ..................................................................................................... : 500
MFS12         : ..................................................................................................... : 500
MFS11         : ..................................................................................................... : 500
MFS10         : ..................................................................................................... : 500
MFRN6         : ..................................................................................................... : 500
MFRN1         : ..................................................................................................... : 500
MFS7          : ..................................................................................................... : 500
MFRN8         : ..................................................................................................... : 500
MFS2          : ..................................................................................................... : 500
MFS1          : ..................................................................................................... : 500
MFRN9         : ..................................................................................................... : 500
MFS4          : ..................................................................................................... : 500
M. ornata     : .......T..TC.A.....G........C..............A.....C..C.....................................A.. : 500
M. okinavensis : .......T..TC.....C.G..A...........T..............C...........C..A...........G.................C..A.. : 500
M. annectens  : .C..C......C.C...C...A.....A..C.....C..A.....T..C..C.....C........CC.A..............C.....C..C..A.. : 500
M. marmorata  : .T.....T...C.A..............A..C........C.....C..............A.....CC.C..............T..T.....C..A.. : 500
```


* 520 * 540 * 560 * 580 * 600
MFS6 : TCAAACACCCCTATTCGTTTGATCCGTCTTAATCACTGCAGTTCTACTACTTCTTTCCCTCCCAGTTCTTGCCGCAGGTATTACTATACTTCTAACTGAT : 600
MFS16 : ..... : 600
MFRN3 : .....T..... : 600
MFRN5 : .....T..... : 600
MFRN7 : .....T..... : 600
MFS8 : .....T..... : 600
MFRN4 : ..... : 600
MFS3 : ..... : 600
MFS5 : ..... : 600
MFRN2 : ..... : 600
MFS9 : ..... : 600
MFS13 : ..... : 600
MFS15 : ..... : 600
MFS14 : ..... : 600
MFS12 : ..... : 600
MFS11 : ..... : 600
MFS10 : ..... : 600
MFRN6 : ..... : 600
MFRN1 : ..... : 600
MFS7 : ..... : 600
MFRN8 : ..... : 600
MFS2 : ..... : 600
MFS1 : ..... : 600
MFRN9 : ..... : 600
MFS4 : ..... : 600
M. ornata : .....TT.G.....G..T..T.....T.....G..... : 600
M. okinavensis : C.....G..T.....T..T....T....C..G..T..C...T.A..T..A.....T.....A..C.....T.G....C : 600
M. annectens : .....C..A.....G...C.C....A..T..A..C..T.....A....C...T.A..G..C..G..C..A...T.A....C..C : 600
M. marmorata : C.....C..AT...T.....A..T.....A..T..A...T....AT.G.....C..A....T..A.....A..C..... : 600



ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ความยาว 678 bp จำนวน 25 ตัวอย่างจาก 2 ประชากรของอึ่งน้ำเต้า (*M. fissipes*) จากตำบลไหล่น่าน (MFRN) และตำบลส้าน (MFS) อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน เทียบกับ outgroup ได้แก่ *M. ornata*, *M. okinavensis*, *M. annectens* และ *M. marmorata* โดยเครื่องหมาย (.) แสดงตำแหน่งของเบสที่เหมือนกัน

	MFRN1	MFRN2	MFRN3	MFRN4	MFRN5	MFRN6	MFRN7	MFRN8	MFRN9
MFRN1									
MFRN2	0.000								
MFRN3	0.001	0.001							
MFRN4	0.000	0.000	0.001						
MFRN5	0.001	0.001	0.000	0.001					
MFRN6	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001				
MFRN7	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001			
MFRN8	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001		
MFRN9	0.001	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	

ภาพที่ 7 ค่า Genetic distance ภายในประชากรอึ่งน้ำเต้าจากตำบลไหล่น่าน จำนวน 9 ตัวอย่าง (MFRN# 1-9) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 678 คู่เบส

MFS1	MFS2	MFS3	MFS4	MFS5	MFS6	MFS7	MFS8	MFS9	MFS10	MFS11	MFS12	MFS13	MFS14	MFS15	MFS16
0.001															
0.003	0.001														
0.003	0.001	0.003													
0.001	0.000	0.001	0.001												
0.003	0.001	0.003	0.003	0.001											
0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001										
0.003	0.001	0.003	0.003	0.001	0.003	0.001									
0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001								
0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000							
0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000						
0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000					
0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000				
0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
0.003	0.001	0.003	0.003	0.001	0.000	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	

ภาพที่ 8 ค่า Genetic distance ภายในประชากรอึ่งน้ำเต้าจากตำบลส้าน จำนวน 16 ตัวอย่าง (MFS# 1-16) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 678 คู่เบส

	MFRN1	MFRN2	MFRN3	MFRN4	MFRN5	MFRN6	MFRN7	MFRN8	MFRN9	MFS1	MFS2	MFS3	MFS4	MFS5	MFS6	MFS7	MFS8	MFS9	MFS10	MFS11	MFS12	MFS13	MFS14	MFS15	MFS16
MFRN1																									
MFRN2	0.000																								
MFRN3	0.001	0.001																							
MFRN4	0.000	0.000	0.001																						
MFRN5	0.001	0.001	0.000	0.001																					
MFRN6	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001																				
MFRN7	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001																			
MFRN8	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001																		
MFRN9	0.001	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001																	
MFS1	0.001	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003																
MFS2	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001															
MFS3	0.001	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.003	0.001														
MFS4	0.001	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.003	0.001	0.003													
MFS5	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001												
MFS6	0.001	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.003	0.001	0.003	0.003	0.001											
MFS7	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001										
MFS8	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.003	0.003	0.001	0.003	0.003	0.001	0.003	0.001									
MFS9	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001								
MFS10	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000							
MFS11	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000						
MFS12	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000					
MFS13	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000				
MFS14	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
MFS15	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
MFS16	0.001	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.003	0.001	0.003	0.003	0.001	0.000	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	

ภาพที่ 9 ค่า Genetic distance ระหว่างประชากรของอึงน้ำเต้าจากตำบลไหล่น่านและตำบลสันทราย จำนวน 25 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Kimura two parameter โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 678 bps

หมายเหตุ MFRN = *M. fissipes* จากตำบลไหล่น่าน, MFS = *M. fissipes* จากตำบลสันทราย

ตารางที่ 2 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของ *M. fissipes* ในแต่ละพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง ตัวอักษรย่อที่ใช้ในตาราง: N = จำนวนตัวอย่าง; M = จำนวนของ mutation; h = จำนวนของ haplotype; hd = haplotype diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (± S.D) และ π = nucleotide diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (± S.D)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	*M. fissipes*				
	N	M	h	*hd* ± S.D.	π ± S.D.
ตำบลไหล่น่าน	9	2	3	0.639 ± 0.126	0.00107 ± 0.00028
ตำบลส้าน	16	5	6	0.617 ± 0.135	0.00108 ± 0.00030

หมายเหตุ

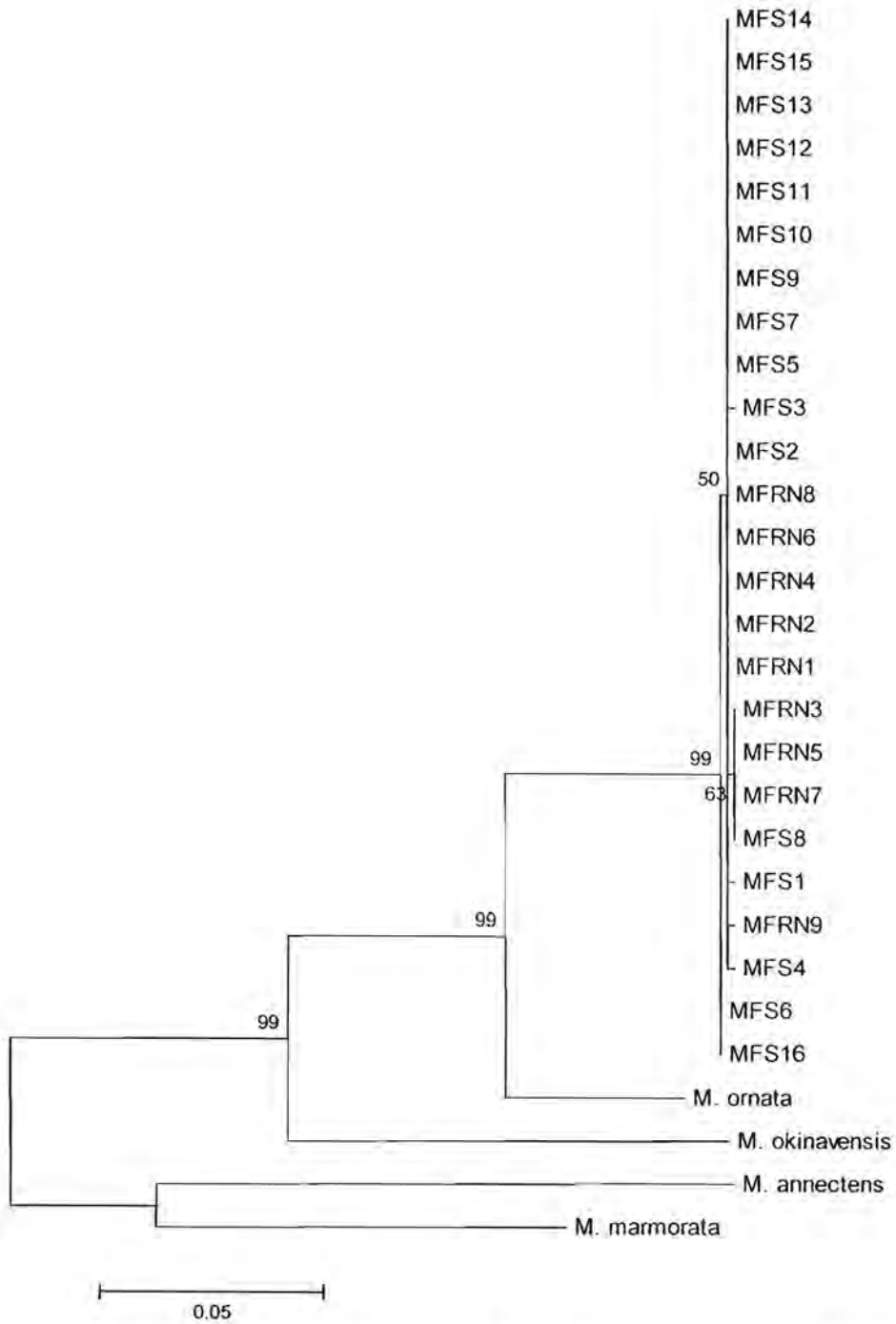
haplotype diversity (hd) หมายถึง จำนวนและความถี่ของ haplotype ที่แตกต่างกันที่พบในตัวอย่าง คำนวณจาก hd = (1 -$\sum$xi 2) n / (n -1) (Nei and Tajima, 1981) เมื่อ xi คือ ความถี่ของ haplotype และ n คือ จำนวนตัวอย่าง

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

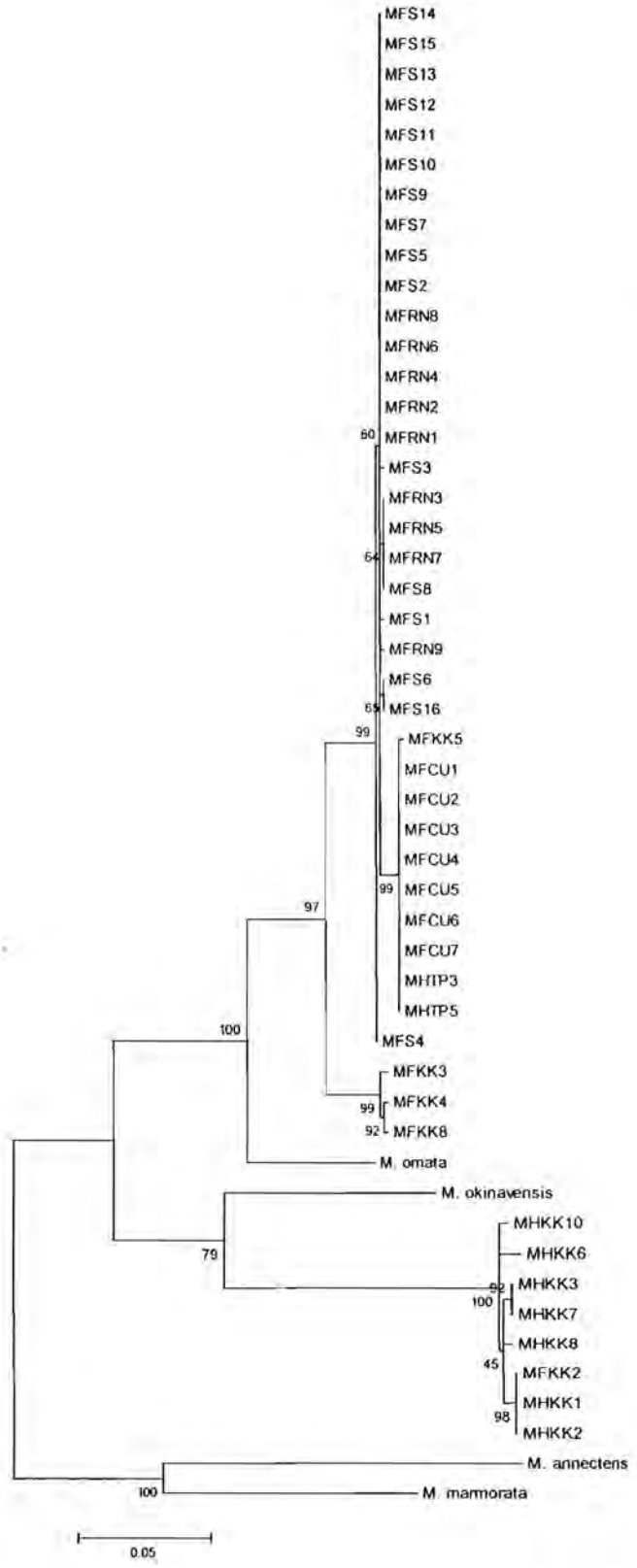
หรือ π = $\sum$xij/nc (Nei 1987, equation 10.6) เมื่อ n คือ จำนวนของ sequence ที่ทำการวิเคราะห์ผล, xi คือ ความถี่ของรูปแบบ ith ใน sequence ของดีเอ็นเอตัวอย่าง และ nc คือ จำนวนของ sequence ทั้งหมดที่ทำการเปรียบเทียบ

4. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยวิธี Maximum Likelihood ระหว่างอึ่งน้ำเต้า จากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน กับอึ่งชนิดต่างๆ ที่ได้ข้อมูลมาจาก GenBank ได้แก่ *M. ornata*, *M. okinavensis*, *M. annectens* และ *M. marmorata* จะพบว่าอึ่งน้ำเต้าทั้งจากตำบลไหล่น่านและตำบลส้านถูกจัดให้อยู่ใน clade เดียวกัน โดยแยก clade ออกมาจากอึ่งชนิดต่างๆ อย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap probability ที่มากถึง 99% (ภาพที่ 10) แสดงว่าอึ่งน้ำเต้าจากทั้งสองพื้นที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group หรืออาจกล่าวได้ว่าประชากรของอึ่งน้ำเต้าจากทั้งสองพื้นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอคล้ายคลึงกันมาก และมีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของอึ่งทั้งสี่ชนิดที่ใช้เป็น outgroup



ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของอึ่งน้ำเต้า (Phylogenetic tree) ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood method โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *M. ornata*, *M. okinavensis*, *M. annectens* และ *M. marmorata* เป็น outgroup


MFS14
MFS15
MFS13
MFS12
MFS11
MFS10
MFS9
MFS7
MFS5
MFS2
MFRN8
MFRN6
MFRN4
MFRN2
60
MFRN1
MFS3
MFRN3
MFRN5
64
MFRN7
MFS8
MFS1
MFRN9
MFS6
65
MFS16
99
MFKK5
MFCU1
MFCU2
MFCU3
MFCU4
99
MFCU5
97
MFCU6
MFCU7
MHTP3
MHTP5
100
MFS4
MFKK3
99
MFKK4
92
MFKK8
M. omata
M. okinavensis
MHKK10
79
MHKK6
92
MHKK3
100
MHKK7
MHKK8
45
MFKK2
MHKK1
98
MHKK2
M. annectens
100
M. marmorata
0.05

ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของประชากรอึ่งน้ำเต้า (Phylogenetic tree) และอึ่งข้างดำที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้และก่อนหน้านี้ ที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood method โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 678 bp ตัวเลขที่กำกับบนแผนภูมิแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1000 ซ้ำ โดยมี *M. ornata*, *M. okinavensis*, *M. annectens* และ *M. marmorata* เป็น outgroup

<u>หมายเหตุ</u>

MFRN = *M. fissipes* จากตำบลไหล่น่าน
MFCU = *M. fissipes* จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
MHTP = *M. heymonsi* จากอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ
MFS = *M. fissipes* จากตำบลส้าน
MFKK = *M. fissipes* จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว
MHKK = *M. heymonsi* จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว

สรุปและวิจารณ์ผล

ผลการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในประชากรอึ่งน้ำเต้าในสองพื้นที่ของอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ได้แก่ ที่ตำบลไหล่น่านและที่ตำบลส้าน จำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง พบว่ามีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 678 คู่เบส มีระยะห่างทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างประชากร อยู่ระหว่าง 0.000-0.003 และมีความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) จำนวน 6 (0.88%) ตำแหน่ง แสดงว่าประชากรอึ่งน้ำเต้าจากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน COI ค่อนข้างต่ำ อนึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาครั้งนี้กับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของอึ่งน้ำเต้าในพื้นที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร และ ที่พื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจสอบ พบว่าประชากรอึ่งน้ำเต้าจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 6 ตัวอย่าง ไม่มีความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI เลย ในขณะที่ประชากรอึ่งน้ำเต้าจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จำนวน 5 ตัวอย่าง มีความแปรผันทางพันธุกรรม จำนวน 38 (5.61%) ตำแหน่ง (อัมพร วิเวกแว่ว และ วิเชฏฐ์ คนซื่อ, 2555) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าประชากรอึ่งน้ำเต้าจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COI มากน้อยแตกต่างกัน โดยประชากรจากพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด

จากการศึกษาเบื้องต้น ในปี พ.ศ. 2555 โดยการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะ โดยใช้ยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบการเกิด gene flow หรือ introgression ระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ ในโครงการ อพ.สธ. และพื้นที่อื่นๆ เช่น จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร, จากบริเวณอุทยานแห่งชาติทองผาภูมิ อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี และ จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยพื้นที่ส่วนใหญ่ที่เก็บตัวอย่างมาจัดเป็น sympatric area ที่สามารถพบอึ่งทั้งสามชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน ผลการศึกษาพบการเกิด gene flow หรือ introgression ของ mitochondrial DNA จากประชากรของอึ่งข้างดำสู่ประชากรของอึ่งน้ำเต้าในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าอึ่งน้ำเต้าและอึ่งข้างดำสามารถผสมข้ามสายพันธุ์ในธรรมชาติได้ (อัมพร วิเวกแว่ว และ วิเชฏฐ์ คนซื่อ, 2555) แต่เนื่องจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยไม่ประสบความสำเร็จในการเก็บตัวอย่างอึ่งข้างดำและอึ่งลายเลอะ จากพื้นที่ในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่านได้เลย ดังนั้นจึงไม่สามารถประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในพื้นที่ดังกล่าวได้ ดังนั้นเพื่อตอบโจทย์การวิจัยดังกล่าวให้ชัดเจน จึงควรทำการเก็บตัวอย่างอึ่งข้างดำและอึ่งลายเลอะจากตำบลไหล่น่านและตำบลส้านให้ได้จำนวนที่มากเพียงพอในอนาคต

นอกจากนี้ผลการศึกษาที่ได้ยังพบว่า โดยเฉลี่ย ค่า haplotype diversity (hd) และค่า nucleotide diversity (π) ของประชากรอึ่งน้ำเต้าในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน มีค่าค่อนข้างต่ำ (hd = 0.627 ± 0.102 และ π = 0.00111 ± 0.00024) เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจากพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี (hd = 1.000 ± 0.126 และ π = 0.08612 ± 0.03601) จากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood ยังแสดงให้เห็นว่าอึ่งน้ำเต้าในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group โดยแยกกลุ่มออกมาจากอึ่งชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็น outgroup อย่างชัดเจน หรือ

อาจกล่าวได้ว่าประชากรอึ่งน้ำเต้ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแตกต่างอย่างชัดเจนจากอึ่งทั้งสี่สปีชีส์ที่ใช้เป็น outgroup อนึ่งเมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (อัมพร วิเวกแว่ว และ วิเชฏฐ์ คนซื่อ, 2555) จะพบว่าประชากรอึ่งน้ำเต้าจากตำบลไหล่น่านและตำบลส้านถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกับประชากรอึ่งน้ำเต้าจากจุฬาลงกรณ์และจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว และแยกอยู่คนละ clade กับประชากรอึ่งข้างดำอย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap probability เท่ากับ 100% (ภาพที่ 11) นอกจากนี้จากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการดังกล่าวจะเห็นว่าประชากรอึ่งน้ำเต้าจากตำบลไหล่น่านมีความใกล้ชิดกับประชากรจากตำบลส้านมากกว่าประชากรจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ภาพที่ 11) แสดงว่าอึ่งน้ำเต้าจากตำบลไหล่น่านและตำบลส้านมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากกว่าอึ่งน้ำเต้าจากพื้นที่อื่นๆ

สรุป การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างประชากรของอึ่งน้ำเต้า อึ่งข้างดำ และอึ่งลายเลอะในพื้นที่อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน แต่เนื่องการศึกษาวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างอึ่งข้างดำและอึ่งลายเลอะได้เลย ดังนั้นจึงไม่สามารถประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างอึ่งทั้งสามชนิดในพื้นที่ดังกล่าวได้ ดังนั้นเพื่อตอบโจทย์การวิจัยดังกล่าวให้ชัดเจน จึงควรทำการเก็บตัวอย่างอึ่งข้างดำและอึ่งลายเลอะจากตำบลไหล่น่านและตำบลส้านให้ได้จำนวนที่มากเพียงพอในอนาคต รวมทั้งควรเพิ่มจำนวนพื้นที่ที่ศึกษาให้ครอบคลุมมากกว่านี้ โดยควรทำการเก็บตัวอย่างทั้งจากพื้นที่ที่พบอึ่งเพียงชนิดเดียว (allopatry) และพื้นที่ที่พบอึ่งสองหรือสามชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน (sympatry) และควรทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างประชากรของอึ่งทั้งสามชนิดโดยใช้นิวเคลียร์ยีนเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบควบคู่กันไปด้วย

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., Sànchez-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.

อัมพร วิเวกแว่ว และ วิเชฏฐ์ คนซื่อ. 2555. การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งลายเลอะ (*M. butler*) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจสอบในพื้นที่ อพ.สธ. รายงานวิจัย. แหล่งทุน: ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555 โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. 1-58.

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
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. ความหลากหลายทางชนิด นิเวศวิทยา การแปรผันทางพันธุกรรมและการประเมินความเป็นไปได้ในการผสมต่างสายพันธุ์ระหว่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด ณ ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และพื้นที่ อพ.สธ. (ทุน อพ.สธ. ปีงบประมาณ 2556) สถานภาพงานวิจัย 100%
2. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของสปีชีส์ย่อยของไก่ฟ้าหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไก่ฟ้าหลังเทา (*L. leucomelana*) ในประเทศไทยโดยลำดับดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ทุน สกว. ปีงบประมาณ 2556) สถานภาพงานวิจัย 30%

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. แหล่งทุนโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยและทุน 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. แหล่งทุนโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
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. แหล่งทุนโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

10. Othman, MS, Khonsue, W, Kitana, J, Thirakhupt, K, Robson, MG and Kitana, N. 2009. Hepatic biomarker responses in the frog, *Fejervarya limnocharis*, naturally exposed to environmental stress from cadmium contamination. Abstract, 16th International Congress of Comparative Endocrinology, Hong Kong S.A.R., China (P69). 19 แหล่งทุน National Center of Excellence in Environmental and Hazardous Waste Management และ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
11. วิเชฏฐ์ คนซื่อ. 2008. 2008 ปีแห่งการอนุรักษ์กบ 2008 ปีแห่งการอนุรักษ์กบ: วิกฤติการสูญพันธุ์และบัญชีแดง. การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 12. 10-13 ตุลาคม 2551 โรงแรมไดมอนด์พลาซ่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี. แหล่งทุน โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน

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