

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทอโรไซโกซิตีของไอโซไซม์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา
ของกบหนอง *Fejervarya limnocharis*



นายอนุสรณ์ ปานสุข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

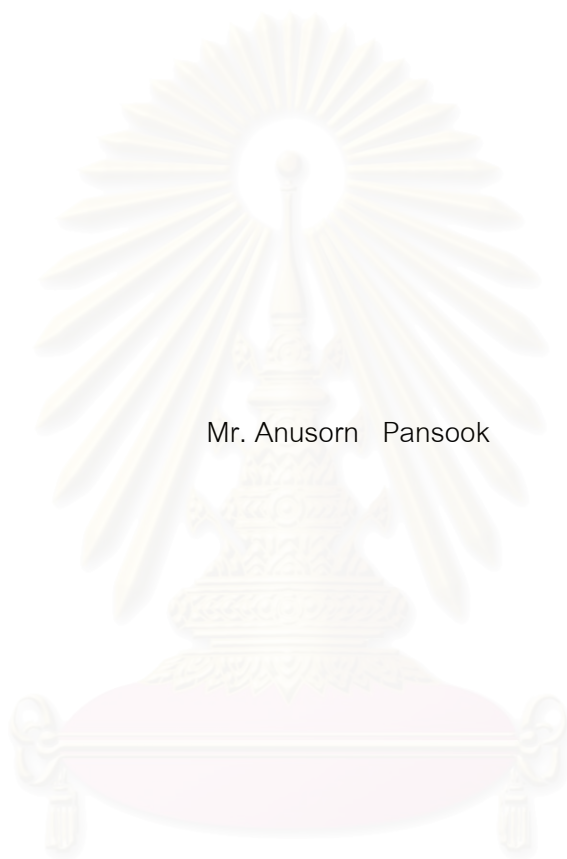
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-7193-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RELATIONSHIP BETWEEN ISOZYME HETEROZYGOSITY AND MORPHOLOGICAL
CHARACTERS OF WHITE-LINED FROG *Fejervarya limnocharis*



Mr. Anusorn Pansook

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic year 2004
ISBN 974-17-7193-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทอโรไซโกซิตีของไอโซไซม์กับลักษณะทาง
 สัณฐานวิทยาของกบหนอง *Fejervarya limnocharis*
 โดย นาย อนุสรณ์ ปานสุข
 สาขาวิชา พันธุศาสตร์
 อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
 ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์
 (รองศาสตราจารย์ ดร. ธาราพงษ์ วิทิตสานต์)

รองคณบดีฝ่ายบริหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
 (รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ ไก่สกุล)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พชนี สิงห์อาษา)

อนุสรณ์ ปานสุข : ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบหนอง *Fejervarya limnocharis*. (RELATIONSHIP BETWEEN ISOZYME HETEROZYGOSITY AND MORPHOLOGICAL CHARACTERS OF WHITE-LINED FROG *Fejervarya limnocharis*) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ผุสดี ปริยานนท์ จำนวนหน้า 51 หน้า. ISBN 974-17-7193-2.

การหาค่าเฮเทโรไซโกซิตี เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบหนอง *Fejervarya limnocharis* ทำโดยศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ด้วยเทคนิค อิเล็กโทรโฟเรซิสในกบหนอง 4 กลุ่มประชากร ได้แก่ จังหวัดพังงา 1 กลุ่มประชากร, จังหวัดกาญจนบุรี 1 กลุ่มประชากร และจังหวัดชลบุรี 2 กลุ่มประชากร รวมจำนวนทั้งสิ้น 72 ตัวอย่างจากการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ทั้งสิ้น 15 โลไซ พบว่ามีลักษณะเป็น polymorphic 9 โลไซ (ADH, G6PD, GLD, MDH-1, MDH-2, ME-1, ME-2, ODH and SOD) โลไซที่มีการพบอัลลีลมากที่สุด ได้แก่ MDH-1 จำนวน 7 อัลลีล เมื่อคำนวณด้วยโปรแกรมไบโอซีเอสสามารถหาค่าเฮเทโรไซโกซิตี (H_{obs}) ได้ระหว่าง 0.022-0.058 ในขณะที่ค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คาดหวัง (H_{exp}) มีค่าระหว่าง 0.119-0.178 และเมื่อคำนวณทางสถิติไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบหนองในกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา ($r = 0.074, P \leq 0.05$) รวมทั้งความเกี่ยวข้องระหว่างความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของกบหนองกับโลคัส ADH, G6PD, MDH-1, MDH-2, ME-2 และ SOD

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาพฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4472483823 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: ISOZYME / HETEROZYGOSITY / *Fejervarya limnocharis*

ANUSORN PANSOOK : RELATIONSHIP BETWEEN ISOZYME
HETEROZYGOSITY AND MORPHOLOGICAL CHARACTERS OF WHITE-
LINED FROG *Fejervarya limnocharis*. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF.
WARAWUT CHULALAKSANANUKUL Ph.D. THESIS COADVISOR : ASST.
PROF. PUTSATEE PARIYANONTH, 51 pp. ISBN 974-17-7193-2.

The isozyme heterozygosity of white-lined frog *Fejervarya limnocharis* was identified from electrophoretic patterns of 4 populations collected from Phang-nga province, Kanchanaburi province and two samples from Chonburi province. All of these populations composed of 72 samples studied. The starch gel electrophoresis technique was investigated 15 loci of isozyme heterozygosity. The results showed that 9 loci were polymorphic; ADH, G6PD, GLD, MDH-1, MDH-2, ME-1, ME-2, ODH and SOD. Whereas, MDH-1 locus showed the most amount of polymorphic allelic pattern. The calculated heterozygosity values were 0.022-0.058 and expected heterozygosity values were 0.119-0.178. These values revealed that no difference relationship between isozyme heterozygosity and morphological characters of these 4 populations was found ($r = 0.215$, $P \leq 0.05$). The relationship between morphological variation and 6 loci, namely ADH, G6PD, MDH-1, MDH-2, ME-2 and SOD was not found ($P \leq 0.05$).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....Botany..... Student's signature.....

Field of study.....Genetic..... Advisor's signature.....

Academic year2004..... Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยจากความช่วยเหลือของหลายๆฝ่ายดังต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่ให้โอกาสในการศึกษา

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และความช่วยเหลือต่างๆ จนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โกัสกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พชณี สิงห์อาษา ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการสอบ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณหน่วยวิจัยสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) หน่วยสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว และ กองการเกษตรและสหกรณ์ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา กองบัญชาการทหารสูงสุด ที่อำนวยความสะดวกในหลายๆด้าน ระหว่างการเก็บตัวอย่างสัตว์ทดลองเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

กราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน และทุนอุดหนุนงานวิจัย

กราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่ๆ ที่สนับสนุนด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ทำยนี้ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ในงานวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
เฮเทอโรไซโกซิตี.....	3
ชีววิทยาของกบหนอง.....	3
การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและใน กบหนอง (<i>Fejervarya</i> <i>limnocharis</i>).....	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
พื้นที่ทำการศึกษา.....	6
สัตว์ทดลอง.....	6
สารเคมี.....	13
อุปกรณ์.....	14
วิธีดำเนินการทดลอง.....	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	22
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	22
การวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนไอโซไซม์.....	24
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	31
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	32
การวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนไอโซไซม์.....	32
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	35
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	36
.....	

	หน้า
รายการอ้างอิง.....	39
ภาษาไทย.....	39
ภาษาอังกฤษ.....	40
ภาคผนวก.....	43
ภาคผนวก ก.....	44
ภาคผนวก ข.....	46
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	51



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3-1	ชนิดไอโซไซม์, โลกัศ, แหล่งเนื้อเยื่อที่ทำการสกัด และระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของกบหนอง.....	21
4-1	ค่าต่ำสุด, สูงสุด และค่าเฉลี่ยของความยาวลำตัวของกบหนองที่สำรวจพบ.....	23
4-2	ค่าต่ำสุด, สูงสุด และค่าเฉลี่ยของความกว้างของแถบสีบนหลังกบหนองที่สำรวจพบ.....	23
4-3	ค่าความถี่อัลลีลในโลไซต่างๆ, จำนวนอัลลีลต่อโลกัศ, เพอร์เซ็นต์โลไซที่เป็น polymorphic, ค่าเฮเทโรไซโกซิตีตามทฤษฎี และค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้ในประชากรกลุ่มต่างๆ.....	25
4-4	จำนวนอัลลีลในแต่ละโลกัศ.....	26
4-5	ค่าความต่างของพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรซึ่งคำนวณตามวิธีของ Nei's (1978) และวิธีของRogers' (1972).....	26
5-1	จำนวนอัลลีลในแต่ละโลกัศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด.....	35

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3-1 บริเวณที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างกบหนอง.....	7
3-2 แผนที่ตั้งเขาวังเขมร อ.ไทรโยค จ. กาญจนบุรี.....	8
3-3 แหล่งน้ำที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองเขาวังเขมร อ.ไทรโยค จ. กาญจนบุรี.....	8
3-4 แผนที่ตั้งเกาะพระทอง อ.คุระบุรี จ.พังงา.....	9
3-5 แหล่งน้ำที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองเกาะพระทอง อ.คุระบุรี จ.พังงา.....	9
3-6 แผนที่ตั้งเขาเขียว เขาชมพู่ และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี.....	10
3-7 สภาพพื้นที่ที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองเขาเขียว เขาชมพู่ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี.....	11
3-8 แหล่งน้ำที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองเขาเขียว เขาชมพู่ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี.....	11
3-9 สภาพพื้นที่ที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี.....	12
3-10 แหล่งน้ำที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี.....	12
3-11 บริเวณที่ทำการวัดความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนอง.....	17
3-12 การวางกระดาษกรองที่มีสารละลายตัวอย่างลงบนเจล.....	18
3-13 การวางแผ่นเจลลงบนชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	19
4-1 ลักษณะความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองที่แตกต่างกัน.....	22
4-2 dendrogram แสดงความเหมือนของพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร.....	27
4-3 แบบแผนไอโซไซม์โลคัส ADH ของประชากรกบหนองบริเวณเขาวังเขมร.....	27
4-4 แบบแผนไอโซไซม์โลคัส G6PD ของประชากรกบหนองบริเวณเขาวังเขมร.....	28
4-5 แบบแผนไอโซไซม์โลคัส GLD ของประชากรกบหนองบริเวณเขาวังเขมร.....	28
4-6 แบบแผนไอโซไซม์โลคัส MDH-1,2 ของประชากรกบหนองบริเวณเขาวังเขมร.....	29
4-7 แบบแผนไอโซไซม์โลคัส ME-1,2 ของประชากรกบหนองบริเวณพื้นที่ราบ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว.....	29
4-8 แบบแผนไอโซไซม์โลคัส ODH ของประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง.....	30
4-9 แบบแผนไอโซไซม์โลคัส SDH ของประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง.....	30
5-1 สภาพพื้นที่ที่ถูกทำลายด้วยคลื่นสึนามิ.....	34

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กบหนอง (*Fejervarya limnocharis*) เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดหนึ่งที่พบมากในประเทศไทย อาศัยอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันหลายแบบ เช่น ร่องน้ำไหล ในบึง แอ่งน้ำใหม่ รวมทั้งในระดับความสูงของพื้นที่ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้กบหนองมีลักษณะทางสัณฐานหลายแบบ จึงคาดว่ากบชนิดนี้น่าจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งจากการศึกษาเกี่ยวกับกบหนอง (*Fejervarya limnocharis*) ในประเทศไทย ส่วนใหญ่จะเน้นการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน จำนวนโครโมโซม และรูปแบบของโครโมโซม สำหรับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ประชากรของกบหนอง ยังคงมีอยู่น้อยมาก

ในการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ประชากร โดยการหาค่าเฮเทโรไซโกซิตีของประชากรสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ จะทำให้ทราบถึงลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น และยังทำให้ทราบถึงชนิดอัลลีลและความถี่ของอัลลีลในแต่ละกลุ่มประชากร ค่าเฮเทโรไซโกซิตีของประชากรเหล่านั้นยังสามารถแสดงให้เห็นว่าประชากรเหล่านั้นมีลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมอย่างไรและจะมีความสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาพสมดุลได้หรือไม่ นอกจากนี้ยังพบว่าในการศึกษาค่าเฮเทโรไซโกซิตียังมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอัตราการเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด

อย่างไรก็ตาม การที่ค่าเฮเทโรไซโกซิตีของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ในประชากรมีค่าสูงและมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ในประชากรเหล่านั้น ทำให้สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีความสามารถในการปรับตัวสูง เกิดการคัดเลือกพันธุ์ตามธรรมชาติ อีกทั้งสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบเฮเทโรไซกัสมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า ทำให้มีโอกาสอยู่รอดได้ดีกว่าสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบโฮโมไซกัส และเมื่ออัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้นทำให้มีโอกาสอยู่รอดของสมาชิกในประชากรได้ดีกว่า หรือ ในกรณีที่ทำให้มีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยามากขึ้น ก็อาจทำให้สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นสามารถหลบหลีกหรือพรางตัวได้มากขึ้นกลมกลืนกับสภาพแวดล้อมได้หลายแบบ ทั้งนี้เนื่องจากสิ่งแวดลอมในธรรมชาติมีหลากหลายและมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา

การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรของกบหนอง (*Fejervarya limnocharis*) โดยการศึกษาจากแบบแผนไอโซไซม์ เพื่อหาค่าเฮเทโรไซโกซิตี

ของกลุ่มประชากรกบหนองในพื้นที่ต่างๆ ที่แตกต่างกัน และเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทอโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบหนองในพื้นที่ต่างๆ อีกทั้งเพื่อประเมินโครงสร้างทางพันธุกรรมและขนาดประชากรของกบหนองในพื้นที่ต่างๆเหล่านั้น ซึ่งจะส่งผลให้มีการวางแผนเพื่อการจัดการกับประชากรของกบหนอง และการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติในแต่ละพื้นที่ได้อย่างเหมาะสมและอย่างถูกต้องในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. หาค่าเฮเทอโรไซโกซิตีในแต่ละกลุ่มประชากรของกบหนองที่ศึกษาในพื้นที่ต่างๆ
2. หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทอโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบหนอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้

1. ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบหนองในแต่ละกลุ่มประชากรที่อยู่ในสภาพพื้นที่ที่แตกต่างกัน
2. สามารถประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบหนองกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เฮเทโรไซโกซิติ

HEDRICK, 1999 ได้อธิบาย ไว้ว่า เฮเทโรไซโกซิติ คือ สัดส่วนของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮเทโรไซกัส กับ โดไมนทั้งหมดในประชากรของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษานั้นๆ ซึ่งความสำคัญของค่าเฮเทโรไซโกซิติ เป็นค่าที่แสดงถึงความหลากหลายของพันธุกรรมในประชากรนั้นๆ โดยประชากรใดมีค่าเฮเทโรไซโกซิติสูง แสดงให้เห็นว่าประชากรกลุ่มนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังนั้น การที่ประชากรกลุ่มนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ทำให้มีความสามารถในการปรับตัวอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความหลากหลายได้เช่นกัน

ชีววิทยาของกบหนอง

กบหนอง *Fejervarya limnocharis* เป็น สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

จัดอยู่ใน Phylum Chordata,

Class Amphibia,

Order Anura (Salientia) (Duellman and Trueb, 1986)



รูปที่ 2-1 ลักษณะภายนอกและความหลากหลายของแถบสีกลางลำตัวของกบหนอง

กบชนิดนี้ เดิมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Rana limnocharis* ลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีลำตัวป้อม สีเขียวมะกอกหรือสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวเรียว ปลายปากมน ระยะห่างระหว่างตาแคบกว่าเปลือกตาบน ผิวหนังขึ้น บนหลังมีจุดสีน้ำตาลเข้มขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป และมีรอยพับของผิวหนังเป็นแนวตามยาวลำตัวประมาณ 3-5 แนว ที่กลางลำตัวจะเห็นแถบสีเข้มรูป W ขอบ

ปากบนและล่างมีแถบสีเข้ม บางตัวอาจจะมีเส้นกลางตัว ท้องสีขาวออกครีม เยื่อแก้วหูอยู่ใต้ ผิวหนัง แขนและนิ้วมีสีส้ม นิ้วเท้ามีพังผืด ปลายนิ้วมน นิ้วที่ 1 ยาวกว่านิ้วที่ 2 มีตุ่มแข็งบริเวณ กลางฝ่าเท้า กบหนองจัดเป็นกบที่พบอาศัยอยู่บริเวณพื้นที่ราบและหุบเขาทั่วทั้งประเทศไทย และมีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาสูง (Tayler, 1962 ; ธีัญญา จันอาจ, 2546)

การศึกษาทั่วไปเกี่ยวกับประชากรกบหนองในประเทศไทย ได้มีการศึกษาสำรวจเกี่ยวกับจำนวนประชากรของกบหนองในพื้นที่ต่างๆ พบว่ากบหนองสามารถอาศัยอยู่ได้ในพื้นที่ทั่วไปหลายแบบและหลายแห่งของประเทศไทย (ธีัญญา จันอาจ, 2530 ; ศรีวรรณ จิระสุขทวี, 2534 ; วิชญ์ คณชื้อ, 2539 ; ธีัญชลี สิริมนตรารภรณ์, 2541 ; ผุสดี ปริยานนท์, 2542 ; อนุสรณ์ ปานสุข, 2543)

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและในกบหนอง (*Fejervarya limnocharis*)

การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการจัดจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตและการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ประชากร

การนำวิธีการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ไปใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มสิ่งมีชีวิต ได้มีการศึกษาในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกหลายชนิด ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบ serum albumin ของกบ *Rana pipiens* 2 ชนิดย่อย เพื่อหาลักษณะทางพันธุกรรมของลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างชนิดย่อยทั้ง 2 ชนิด (Platz, 1976) การศึกษาความหลากหลายของแบบแผนไอโซไซม์ในกบ 2 ชนิด คือ *Rana boylei* และ *Rana muscosa* (Case, 1978) การจัดจำแนก *Bufo microscaphus* complex โดยใช้ข้อมูลทางอัลโลไซม์ (Gergus, 1998) การศึกษาความหลากหลายของแบบแผนไอโซไซม์ในกบอ่องเล็ก *Rana nigrovittata* เปรียบเทียบกับกบอ่องใหญ่ *R. mortenseni* ที่พบในประเทศไทย (Matsui และคณะ, 2001)

นอกจากนี้ได้มีนำวิธีการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ เพื่อใช้ในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกหลายชนิด ตัวอย่างเช่น การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของ gene flow ระหว่างประชากรกบ Leopard frog 2 ชนิด ที่อาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกัน คือ *Rana pipiens berlandieri* กับ plain type *Rana pipiens* (Platz, 1972) มีการใช้แบบแผนไอโซไซม์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวเคมีในประชากรของคางคกอาร์เจนตินา *Bufo arenarum* พบว่า คางคกชนิดนี้มีเปอร์เซ็นต์ของ Polymorphisms สูงกว่าคางคกชนิดอื่นๆ (Matthews, 1975)

Ward และคณะ, 1987 ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยวิธีไอโซไซม์ ในกลุ่มประชากรของ Cricket frog *Acris crepitans* ที่พบบริเวณทางตอนใต้และตอนเหนือของ มลรัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในแต่ละกลุ่ม

Karakousis และคณะ, 1995 ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมและลักษณะทาง สันฐานวิทยาของคางคกสีเขียว *Bufo viridis* บริเวณทางตอนเหนือของประเทศกรีซ และมีผู้ ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในวงศ์ Microhylidae จำนวน 12 ชนิด ที่ในประเทศปาปัวนิวกินี (Sumida และคณะ, 2000) โดยการศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ รวมทั้งมีการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกบ South African ghost frog, *Heleophryne natalensis* จำนวน 5 กลุ่มประชากร ที่พบในบริเวณทวีปแอฟริกา (Grobler และคณะ, 2003) ดัง จะเห็นได้ว่า การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์สามารถนำไปใช้อธิบายถึงปรากฏการณ์ gene flow ใน ประชากรได้

นอกจากการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ที่นำไปใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิต และ ศึกษาด้าน gene flow แล้ว ยังได้มีการนำวิธีการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ไปศึกษาความสัมพันธ์ ของค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสันฐานวิทยา ตัวอย่างเช่น การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับความหลากหลายของลักษณะทางสันฐานวิทยาในประชากรธรรมชาติใน ปลาทะเล *Fundulus heteroclitus* พบว่าค่าความแปรปรวนของความยาวครีบของปลาที่มี ลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮเทโรไซกัสจะมากกว่าปลาที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบโฮโมไซกัส แสดงให้เห็นว่า ความยาวครีบของปลาที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮเทโรไซกัสมีความ หลากหลายมากกว่าปลาที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ โฮโมไซกัส (Mitton, 1978)

การศึกษาเรื่องความหลากหลายของลักษณะทางสันฐานวิทยากับค่า เฮเทโรไซโกซิตี ในผีเสื้อกลางคืน *Danaus plexippus* พบว่าค่าความแปรปรวนของลายบนปีกของผีเสื้อที่มี ลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮเทโรไซกัสจะมีมากกว่าผีเสื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบโฮโมไซกัส แสดงให้เห็นว่าลายบนปีกของผีเสื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮเทโรไซกัสมีความ หลากหลายมากกว่าผีเสื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบโฮโมไซกัส (Eanes, 2521)

การศึกษาเรื่องค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับการเจริญเติบโตในตัวอ่อนของซาลาแมนเดอร์ *Ambystoma tigrinum* พบว่าค่าเฮเทโรไซโกซิตีมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของประชากร ซาลาแมนเดอร์ระยะตัวอ่อนในกลุ่มที่มีค่าเฮเทโรไซโกซิตีสูงมีอัตราการเจริญเติบโตที่มากกว่า (สูงขึ้น) (Pierce และ Mitton, 1978)

การศึกษาเรื่องความหลากหลายของพันธุกรรมในระดับสูงระหว่างดอกไม้ทะเล *Anthopleura orientalis* ที่อยู่ในบริเวณเดียวกัน พบว่าประชากรของดอกไม้ทะเล *Anthopleura orientalis* มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีสูง ทำให้ดอกไม้ทะเลมีสีที่หลากหลาย (Manchenko และคณะ, 2000)

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับกบหนอง *Fejervarya limnocharis* โดยใช้เทคนิคโปรตีนอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยทำการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ประชากรของกบหนองในสถานที่ต่างๆ ได้แก่ บริเวณหมู่เกาะทางตอนใต้ของประเทศญี่ปุ่นและประเทศไต้หวัน ทำให้สามารถอธิบายถึงปรากฏการณ์ gene flow ระหว่างกลุ่มประชากร และการแยกตัวของกลุ่มประชากรที่เกิดขึ้นในอดีตได้ (Toda และคณะ, 1997)

การศึกษาเกี่ยวกับกบหนอง *Fejervarya limnocharis* บริเวณเกาะไต้หวันและเกาะใกล้เคียง ผลการศึกษาพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของกบหนองที่สำรวจพบบนเกาะไต้หวันและเกาะใกล้เคียงสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ประชากรที่อยู่ทางด้านทิศตะวันตก ทิศเหนือ และทิศใต้ของเกาะไต้หวัน รวมทั้งประชากรที่อยู่ที่อยู่ทางเกาะทางใต้ของประเทศจีน กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่อยู่ทางทิศตะวันออกของประเทศไต้หวัน ส่วนกลุ่มที่ 3 ได้แก่ประชากรที่อยู่บนเกาะ Ryukyus ทางตอนใต้ของประเทศญี่ปุ่น (Toda และคณะ, 1998)

บทที่ 3

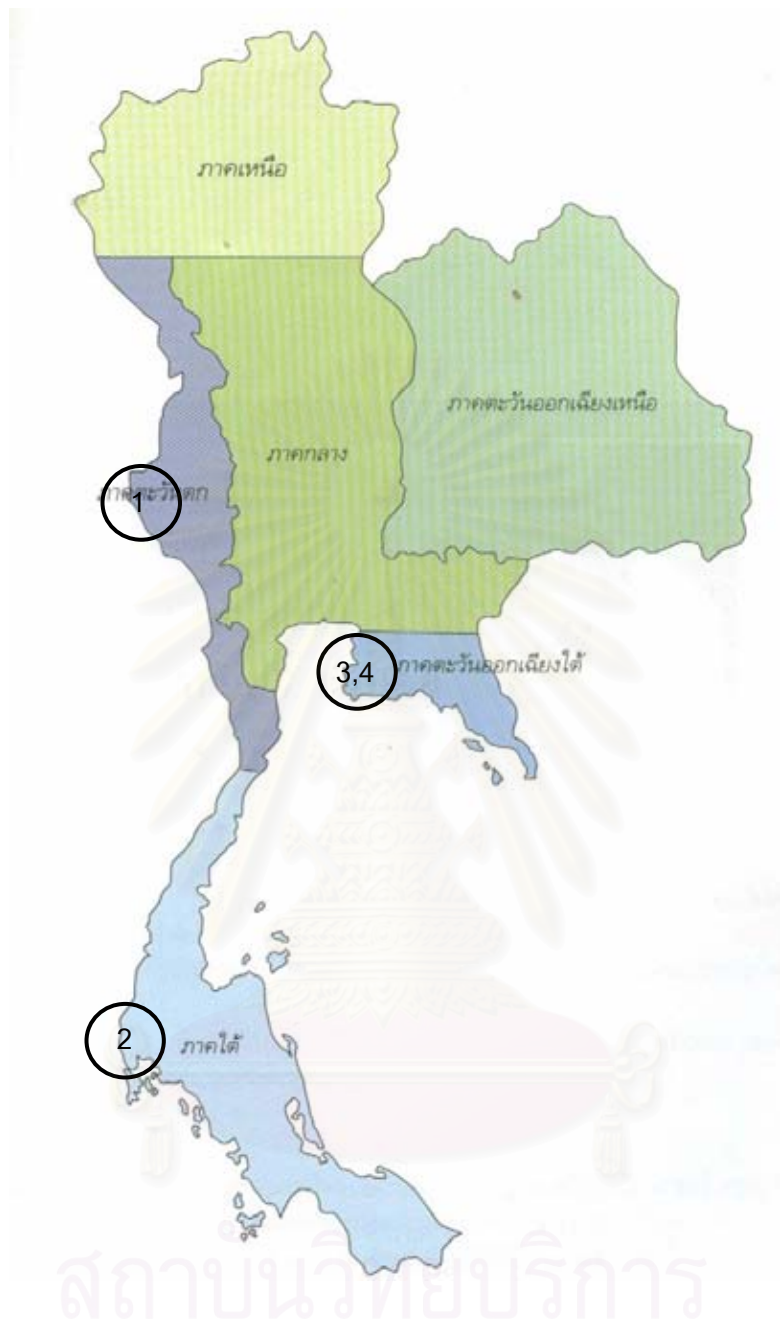
วิธีดำเนินการวิจัย

พื้นที่ทำการศึกษา แบ่งออกเป็น

1. พื้นที่ฝั่งตะวันตกของประเทศไทย ประกอบด้วย
 - 1.1 พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาวังเขมร อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี
 - 1.2 เกาะพระทอง อ. คุระบุรี จ. พังงา
2. พื้นที่ฝั่งตะวันออกของประเทศไทย ประกอบด้วย
 - 2.1 พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาเขียว เขาชมพู่ อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี
 - 2.2 แหล่งน้ำบนพื้นที่ราบ บริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี

สัตว์ทดลอง

1. กบหนอง *Fejervarya limnocharis* เขาวังเขมร อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี จำนวน 21 ตัวอย่าง
2. กบหนอง *Fejervarya limnocharis* จากเกาะพระทอง อ. คุระบุรี จ. พังงา จำนวน 21 ตัวอย่าง
3. กบหนอง *Fejervarya limnocharis* แหล่งน้ำบนเขาเขียว เขาชมพู่ อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง
4. กบหนอง *Fejervarya limnocharis* จากพื้นที่ราบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง



รูปที่ 3-1 บริเวณที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างกบหนอง

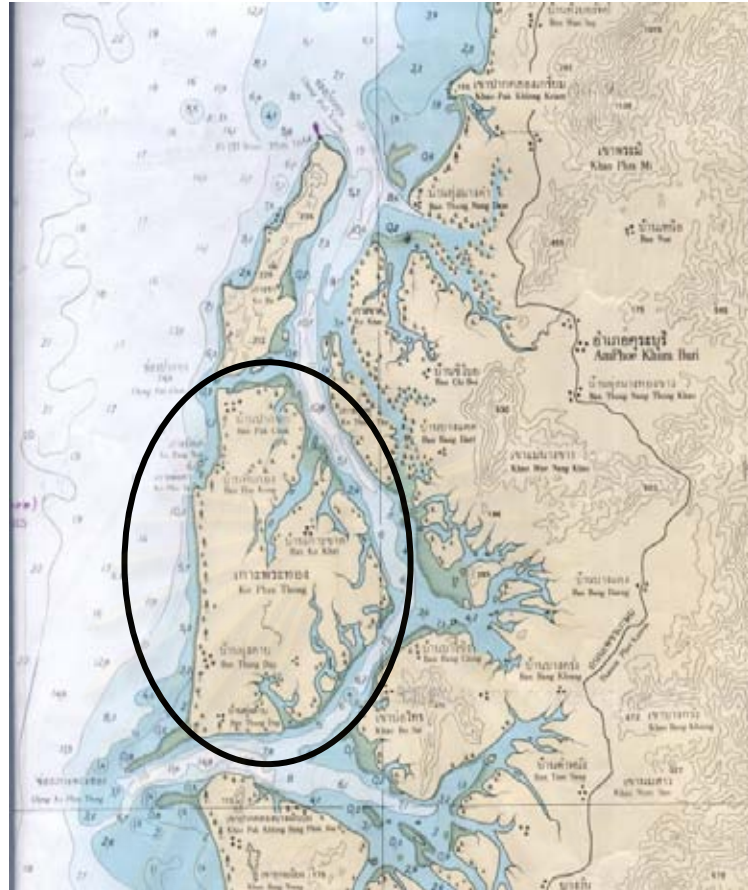
- 1 = พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาวังเขมร อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี
- 2 = เกาะพระทอง อ. คุระบุรี จ. พังงา
- 3 = พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาเขียว เขาชมพู่ อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี
- 4 = แหล่งน้ำบนพื้นที่ราบ บริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี



รูปที่ 3-2 แผนที่ตั้งเขาวังเขมร อ.ไทรโยค จ. กาญจนบุรี



รูปที่ 3-3 แหล่งน้ำที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองเขาวังเขมร อ.ไทรโยค จ. กาญจนบุรี



รูปที่ 3-4 แผนที่ตั้งเกาะพระทอง อ.คุระบุรี จ.พังงา



รูปที่ 3-5 แหล่งน้ำที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองเกาะพระทอง อ.คุระบุรี จ.พังงา



รูปที่ 3-6 แผนที่ตั้งเขาเขียว เขาชมพู่ และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3-7 สภาพพื้นที่ที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองเขาเขียว เขาชมพู่ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี



รูปที่ 3-8 แหล่งน้ำที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองเขาเขียว เขาชมพู่ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี



รูปที่ 3-9 สภาพพื้นที่ที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองสวนสัตว์เปิดเขาเขียว
อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี



รูปที่ 3-10 แหล่งน้ำที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างกบหนองสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี

สารเคมี

1. Potato starch, Hydrolyzed for electrophoresis (Sigma, S5651)
2. Trizma-Base (Sigma, T6791)
3. Citric acid monohydrate (Sigma, C7129)
4. Maleic acid (Carlo, 407266)
5. 2-Mercaptoethanol (Sigma, M7154)
6. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Carlo, 405463)
7. Absolute methanol (Merck, 1.06009)
8. Galcial acetic acid (Carlo, 401481)
9. di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Carlo, 480141)
10. conc. Hydrochloric acid (HCl) (Carlo, 403872)
11. Magnesium chloride (MgCl_2) (Sigma, M9272)
12. Manganese (II) chloride (MnCl_2) (Sigma, M3634)
13. Sodium hydroxide (NaOH) (Carlo, 480522)
14. Thiazolyl blue (MTT) (Fluka, 88415)
15. Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Fluka, 74030)
16. Phenazine methosulphate (PMS) (Fluka, 68600)
17. β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β -NAD) (Sigma, N6522)
18. β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (β -NADP) (Sigma, N0505)
19. 95% Ethanol

20. Fumaric acid (Sigma, F2752)
21. MonoSodium pyruvate (Sigma, P2256)
22. L-Glutamic acid (Sigma, G1626)
23. Glucose-6-phosphate (Sigma, G7250)
24. Na₂-D,L-Isocitric acid.H₂O (Fluka, 58800)
25. Lithium D,L-Lactic acid (Merck, 822084)
26. D,L-Malic acid (Sigma, M0875)
27. Octanol (Sigma, O4500)
28. 6-Phosphogluconic acid (Sigma, P7877)
29. Glucose-1-phosphate (Sigma, G7000)
30. Glucose-1,6-diphosphate (Sigma, G5875)
31. Sorbital (Fluka, 8553)
32. Malate dehydrogenase (Sigma, M7508)
33. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma, G7877)

อุปกรณ์

1. กระบอกไซ
2. กรอบพลาสติก
3. เครื่องดูดอากาศ (Vacuum pump)
4. Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
5. เวอร์เนีย คาลิเปอร์

6. ชุด Electrophoresis
7. กระดาษกรอง
8. ตะเกียงแก๊ส
9. โกร่งบดตัวอย่าง
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge)
11. เครื่องดูดสารปริมาตรน้อยอัตโนมัติ (Auto Micropipette)
12. หลอดเก็บสารขนาดเล็ก (Eppendorf tube)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

(1) การเก็บตัวอย่างกบหนอง *Fejervarya limnocharis*

การเก็บตัวอย่างกบหนองทำในเวลากลางวันตั้งแต่เวลา 19.00 น. ถึง 21.00 น. ด้วยวิธี Visual Encounter Surveys (VES) (Heyer et.al., 1993) ซึ่งตัวอย่างกบหนองมาจาก สามารถแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

1. พื้นที่ฝั่งตะวันตกของประเทศไทย ประกอบด้วย

1.1 พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาวังเขมร อ.ไพร่ไทยค จ.กาญจนบุรี ซึ่งสภาพพื้นที่เป็นผืนป่าที่ยังอุดมสมบูรณ์ และเป็นผืนป่าที่ติดต่อกับผืนป่าตะวันตกของประเทศไทยและผืนป่าของประเทศพม่า

จำนวน 21 ตัวอย่าง

1.2 เกาะพระทอง อ.คุระบุรี จ.พังงา ซึ่งสภาพพื้นที่เป็นเกาะที่มีน้ำทะเลล้อมรอบ จำนวน 21 ตัวอย่าง

2. พื้นที่ฝั่งตะวันออกของประเทศไทย ประกอบด้วย

2.1 พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาเขียว เขาชมพู อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี ซึ่งลักษณะพื้นที่เป็นเกาะกลางเมืองที่ล้อมรอบด้วยถนน และพื้นที่ทำการเกษตรกรรม จำนวน 15 ตัวอย่าง

2.2 แหล่งน้ำบนพื้นที่ราบ บริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี เป็นพื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์จากชาวบ้านและนักท่องเที่ยวเป็นจำนวนมาก จำนวน 15 ตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Fejervarya limnocharis*

ตัวอย่างทั้งหมดนำมาวัดความยาวลำตัว (Snout and Vent Length, SVL) และวัดความกว้างแถบสีบริเวณระหว่างตาด้วยเวอร์เนีย คาลิปเปอร์ รวมทั้งถ่ายรูปเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาของแต่ละพื้นที่



รูปที่ 3-11 บริเวณที่ทำการวัดความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนอง

(3) การสกัดเอนไซม์จากตัวอย่าง

(3.1) ตัดกล้ามเนื้อและตับจากตัวอย่างกบหนอง

(3.2) นำกล้ามเนื้อหรือตับที่ได้มาสกัดในสารละลายที่มีส่วนประกอบของ Tris 0.01 M, EDTA 0.001 M และ Mercapthoethanol 0.001 M, pH 6.8 ในอัตราส่วน 1:1 (w/v) โดยบดในโถรงบตัวอย่างจนได้สารละลายเนื้อเดียวกัน

(3.3) สารละลายที่ได้นำมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3.4) ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนเก็บไว้ในหลอดเก็บสารขนาดเล็ก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาต่อไป

(4) การเตรียมเจลแป้ง (Starch gel) สำหรับการศึกษแบบแผนไอโซไซม์

(4.1) ชั่ง Potato starch 20.4 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ปริมาตร 170 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยบัฟเฟอร์แต่ละชนิดที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของไอโซไซม์ที่จะทำการศึกษา

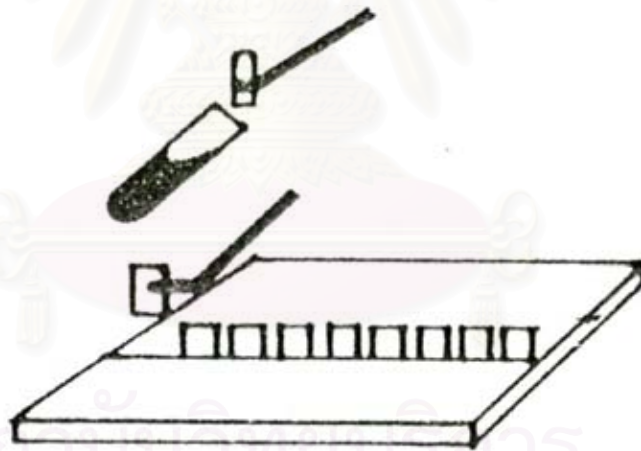
(4.2) นำสารละลาย Potato starch มาทำให้ร้อนด้วยตะเกียงแก๊ส ระหว่างการทำให้ร้อนจะต้องมีการเหยียงสารตลอดเวลา เพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายไหม้ และไม่เกิดการแบ่งชั้นของ Potato starch กับบัฟเฟอร์ จนกระทั่งสารละลายใส

(4.3) ทำการไล่อากาศออกจากสารละลายด้วย Vacuum pump และเทลงบนกระจกใส ที่มีกรอบพลาสติกขนาด 15*12.5*0.6 เซนติเมตร ปิดทับด้วยกระจกใสอีกแผ่น ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้แผ่นเจลแข็งตัวพร้อมที่จะนำไปใช้งาน

(5) การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์

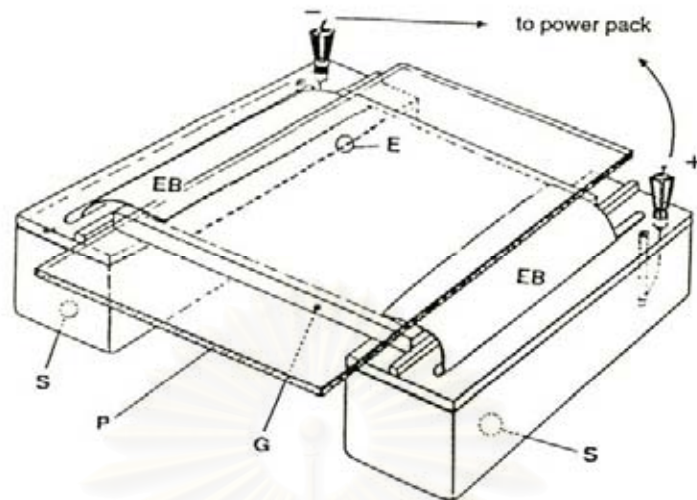
(5.1) เปิดกระจกที่ปิดทับแผ่นเจล 1 ด้าน และกรีดแผ่นเจลตามขวางห่างจากขอบประมาณ 5 เซนติเมตร เพื่อไว้ใส่ตัวอย่างสำหรับการศึกษา

(5.2) หยดสารละลายตัวอย่างลงบนกระดาษกรองขนาด 3*7 มิลลิเมตร วางตามแนวตั้งบริเวณแผ่นเจลที่ทำการกรีด ตามรูปที่ 3-12 โดยจะหยด tagging dye ลงบนกระดาษกรองวางไว้ด้านซ้ายสุดของแผ่นเจล



รูปที่ 3-12 การวางกระดาษกรองที่มีสารละลายตัวอย่างลงบนเจล (PASTEUR และคณะ, 1988)

(5.3) วางแผ่นเจลลงบนชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามรูปที่ 3-13



รูปที่ 3-13 การวางแผ่นเจลลงบนชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (PASTEUR และคณะ, 1988)

(5.4) ทำการผ่านกระแสไฟฟ้า 180 V 50 mA 10 W เป็นเวลาประมาณ 4-6 ชั่วโมง

(5.5) ทำการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ทั้งสิ้น 15 โลไซ โดย running buffer ที่ใช้ในการทดลองขึ้นอยู่กับชนิดของไอโซไซม์ที่ทำการศึกษา ซึ่งชนิดของไอโซไซม์ที่ทำการศึกษาและชนิดของ running buffer ที่ใช้ในแต่ละระบบ แสดงไว้ในตารางที่ 3-1

(5.6) เมื่อครบกำหนดเวลา นำแผ่นเจลมาข้มเพื่อให้ปรากฏแถบสีบนแผ่นเจล ซึ่งวิธีการข้มสีทำตามวิธีของ PASTEUR และคณะ (1988)

(5.7) ทำการหาค่า R_f ซึ่งค่า R_f คำนวณได้จาก

$$R_f = \text{ระยะทางที่ไอโซไซม์เคลื่อนที่} / \text{ระยะทางที่ tagging dye เคลื่อนที่}$$

(5.8) เมื่อได้ค่า R_f จากการคำนวณมาแล้ว จะนำค่า R_f มาแทนค่าด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษ โดยเริ่มต้นจากแถบสีที่มีค่า R_f มากที่สุด ซึ่งจะแทนด้วยตัวอักษร A และเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยจนครบทุกค่า ซึ่งตัวอักษรที่แทนค่านี้จะใช้แทนอัลลีลที่อยู่ในโลกัสนั้นๆ

(6) การวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนไอโซม

นำข้อมูลอัลลีลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนไอโซม ด้วยโปรแกรม BIOSYS เวอร์ชัน 2.0 และคำนวณหาค่าต่างๆ ได้แก่

(6.1) ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อ 1 โลกัส

(6.2) เปอร์เซนต์โลไซที่เป็น polymorphic

(6.3) ค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คาดหวัง (H_{exp})

(6.4) ค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้ (H_{obs})

(6.5) ค่าความต่างของลักษณะทางพันธุกรรม (D) (genetic similarity & genetic distance) ตามวิธีของ Nei's (1978) unbiased genetic distance และวิธีของ Rogers' (1972) distance

(7) การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 10.0 ซึ่งจะทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ดังนี้

(7.1) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีกลางหลังของกบหนองแต่ละกลุ่มประชากร

(7.2) ความแตกต่างของค่าความแปรปรวนความกว้างของแถบสีกลางหลังระหว่างกบหนองที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นเฮเทโรไซกัสกับกบหนองที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นโฮโมไซกัส ในแต่ละโลกัส

ตารางที่ 3-1 ชนิดไอโซไซม์, โลคัส, แหล่งเนื้อเยื่อที่ทำการสกัด และระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของกบหนอง

ไอโซไซม์	E.C. number	โลคัส	เนื้อเยื่อ	ระบบบัฟเฟอร์
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	ADH	ตับ	TC 8.0
Fumarase	4.2.1.2	FUM	ตับ	TC 6.7
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.1.1.49	G6PD	กล้ามเนื้อ	TME 6.9
Glutamate dehydrogenase	1.4.1.2	GLD	ตับ	TC 8.0
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	IDH-1	ตับ	TC 6.7
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	IDH-2	ตับ	TC 6.7
L-Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	LDH-1	ตับ	TC 6.7
L-Lactate dehydrogenase	1.1.1.27	LDH-2	ตับ	TC 6.7
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	MDH-1	กล้ามเนื้อ	TC 6.7
Malate dehydrogenase	1.1.1.37	MDH-2	กล้ามเนื้อ	TC 6.7
Malic enzyme (NADP dependent)	1.1.1.40	ME-1	กล้ามเนื้อ	TC 8.0
Malic enzyme (NADP dependent)	1.1.1.40	ME-2	กล้ามเนื้อ	TC 8.0
Octanol dehydrogenase	1.1.1.73	ODH	ตับ	TME 6.9
Phosphoglucomutase	5.4.2.2	PGM	ตับ	TC 8.0
Sorbital dehydrogenase	1.1.1.14	SDH	กล้ามเนื้อ	TC 8.0

TC 6.7 = Tris-citrate pH 6.7, TC 8.0 = Tris-citrate pH 8.0, TME 6.9 = Tris-Maleate-EDTA, pH 6.9

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการเก็บตัวอย่างกบหนองทั้งสิ้น 4 บริเวณ พบว่า กบหนองที่ทำการสำรวจพบจะมี ความกว้างของแถบสีบริเวณกลางหลังที่แตกต่างกัน ซึ่งลักษณะของแถบสีที่แตกต่างกันได้แสดงไว้ ในรูปที่ 4-1



รูปที่ 4-1 ลักษณะความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองที่แตกต่างกัน

รูป ก กบหนองที่มีแถบสีกลางหลังกว้าง

รูป ข กบหนองที่มีแถบสีกลางหลังแคบ

รูป ค กบหนองที่ไม่มีแถบสีกลางหลัง

ซึ่งจากการสำรวจกบหนองทั้งสิ้น 4 แหล่งประชากร จำนวนทั้งหมด 72 ตัวอย่างพบว่า บริเวณเขาวังเขมร อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี จะมีค่าเฉลี่ยความยาวลำตัวมากที่สุด คือ 4.57 เซนติเมตร และแหล่งน้ำบนเขาเขียว เขาชมพู อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี จะพบกบหนองที่มีค่าเฉลี่ยความยาวลำตัวน้อยที่สุด คือ 4.07 เซนติเมตร ส่วนความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองบริเวณที่ทำการสำรวจทั้ง 4 แห่ง จะสามารถพบกบหนองที่มีแถบสีทั้ง 3 แบบ ตามรูปที่ 4-1 โดยบริเวณเขาวังเขมร อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี จะพบกบหนองที่ไม่มีแถบสีบนหลังมากที่สุด จำนวน 8 ตัว สำหรับความยาวลำตัว (ค่า SVL) ของกบหนองที่สูงสุดและต่ำสุด, ความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองที่สูงสุดและต่ำสุด รวมทั้งค่าเฉลี่ยของความยาวลำตัว (ค่า SVL) และความกว้างของ

แถบสีบนหลังของกบหนองในแต่ละกลุ่มประชากร แสดงไว้ในตารางที่ 4-1 และตารางที่ 4-2 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-1 ค่าต่ำสุด, สูงสุด และค่าเฉลี่ยความยาวลำตัวของกบหนองที่สำรวจพบ

กลุ่มประชากร	SVL (ซม.)		
	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย
เขาวังเขมร	3.40	6.53	4.57 ± 0.78
เกาะพระทอง	3.65	5.31	4.29 ± 0.47
แหล่งน้ำบนเขาเขียว เขาชมพู	3.51	5.33	4.07 ± 0.48
พื้นที่ราบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว	3.44	5.34	4.26 ± 0.49

ตารางที่ 4-2 ค่าต่ำสุด, สูงสุด และค่าเฉลี่ยความกว้างแถบสีบนหลังของกบหนองที่สำรวจพบ

กลุ่มประชากร	ความกว้าง ของแถบสี (มม.)		
	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย
เขาวังเขมร	0.00	3.20	0.74 ± 0.99
เกาะพระทอง	0.70	3.60	2.25 ± 0.97
แหล่งน้ำบนเขาเขียว เขาชมพู	0.00	3.60	1.43 ± 0.83
พื้นที่ราบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว	0.00	1.40	0.38 ± 0.52

การวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนไอโซไซม์

ในการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ทั้งสิ้น 15 โลไซม์ในครั้งนี้ ได้แก่ Alcohol dehydrogenase (ADH) , Fumarase (FUM), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Glutamate dehydrogenase (GLD), Isocitrate dehydrogenase-1 (IDH-1), Isocitrate dehydrogenase-2 (IDH-2), L-Lactate dehydrogenase-1 (LDH-1), L-Lactate dehydrogenase-2 (LDH-2), Malate dehydrogenase-1 (MDH-1), Malate dehydrogenase-2 (MDH-2), Malic enzyme-1 (ME-1), Malic enzyme-2 (ME-2), Octanol dehydrogenase (ODH), Phosphoglucosmutase (PGM) และ Sorbital dehydrogenase (SDH) จากข้อมูลของอัลลีลซึ่งหาได้จากค่า Rf และทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BIOSYS เวอร์ชัน 2.0 พบว่าโลไซม์ทั้งหมด 15 โลไซม์ทั้งสิ้น 9 โลไซม์ที่มีลักษณะเป็น polymorphic ได้แก่ Alcohol dehydrogenase (ADH), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Glutamate dehydrogenase (GLD), L-Lactate dehydrogenase-1 (LDH-1), L-Lactate dehydrogenase-2 (LDH-2), Malate dehydrogenase-1 (MDH-1), Malate dehydrogenase-2 (MDH-2), Malic enzyme-1 (ME-1), Malic enzyme-2 (ME-2), Octanol dehydrogenase (ODH) และ Sorbital dehydrogenase (SDH) ซึ่งโลคัส Malate dehydrogenase-1 เป็นโลคัสที่มีจำนวนอัลลีลมากที่สุดจำนวน 7 อัลลีลสำหรับจำนวนอัลลีลต่อโลคัส (A) มีค่าตั้งแต่ 1.50-1.80 โดยกลุ่มประชากรจากพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาวังเขมร อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี และกลุ่มประชากรจากเกาะพะล่อง อำเภอคุระบุรี จังหวัดพังงา เป็นกลุ่มประชากรที่มีจำนวนอัลลีลต่อโลคัสมากที่สุด เปอร์เซ็นต์โลไซม์ที่เป็น polymorphic (P) มีค่าตั้งแต่ 26.7-40.0 % โดยกลุ่มประชากรจากเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี เป็นกลุ่มประชากรที่มีค่าเปอร์เซ็นต์โลไซม์ที่เป็น polymorphic มากที่สุด, ค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้ (H_{obs}) มีค่าตั้งแต่ 0.022-0.058 โดยกลุ่มประชากรจากเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรีเป็นกลุ่มประชากรที่มีค่าเฮเทโรไซโกซิตีสูงที่สุด ซึ่งความถี่ของอัลลีลแต่ละโลคัสและจำนวนอัลลีลในแต่ละโลคัสแสดงไว้ในตารางที่ 4-3 และ 4-4 ตามลำดับ

สำหรับค่าความต่างของพันธุกรรม เมื่อบริการตามวิธีของ Nei's (1978) มีค่าตั้งแต่ 0.293-0.615 และเมื่อคำนวณตามวิธีของ Rogers' (1972) มีค่าระหว่าง 0.302-0.467 โดยระหว่างกลุ่มประชากรจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี กับกลุ่มประชากรจากเกาะพะล่อง อำเภอคุระบุรี จังหวัดพังงา มีความต่างของพันธุกรรมมากที่สุด ซึ่งค่าความต่างของพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร แสดงไว้ในตารางที่ 4-5 และ dendrogram แสดงความเหมือนของพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร แสดงไว้ในรูปที่ 4-2

ตารางที่ 4-3 ค่าความถี่อัลลีลในไลโซไทต่างๆ, จำนวนอัลลีลต่อไลคัส, เปอร์เซ็นต์ไลโซไทที่เป็น polymorphic, ค่าเฮเทโรไซโกซิตีตามทฤษฎี และค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้ในประชากรกลุ่มต่างๆ

กลุ่มประชากร	ไลคัส									
	ADH	G6PD	GLD	MDH-1	MDH-2	ME-1	ME-2	ODH	SDH	
เขาวังเขมร	C (1.00)	C (.095) D (.810) E (.048) F (.048)	A (1.00)	B (.048) C (.405) F (.50) G (.048)	B (1.00)	C (.429) D (.048) E (.524)	B (.571) C (4.29)	B (1.00)	C (.571) D (.119) E (.095) F (.214)	A = 1.80 P = 33.3 H _{exp} = 0.174 H _{obs} = 0.038
เกาะพระทอง	B (1.00)	C (.048) E (.952)	B (1.00)	A (.238) B (.119) D (.048) E (.528) F (.048) G (.024)	A (.905) C (.095) D (.619) F (.143)	C (.238) D (.619) F (.143)	C (1.00)	B (1.00)	A (.262) B (.286) C (.024) D (.429)	A = 1.80 P = 26.7 H _{exp} = 0.145 H _{obs} = 0.029
แหล่งน้ำบนเขาเขียว เขาชมพู	A (.333) C (.667)	A (.767) B (.233)	A (1.00)	G (1.00)	C (1.00)	C (.600) D (.400)	B (.500) C (.300) D (.200)	A (.333) C (.667)	D (.133) F (.867)	A = 1.50 P = 40.0 H _{exp} = 0.178 H _{obs} = 0.058
พื้นที่ราบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว	A (.867) C (.033) D (.10)	A (.133) B (.200) D (.333) F (.333)	A (1.00)	G (1.00)	B (.80) C (.20)	A (.333) B (.667)	A (1.00)	B (1.00)	F (1.00)	A = 1.50 P = 26.7 H _{exp} = 0.119 H _{obs} = 0.022

A = จำนวนอัลลีลต่อไลคัส
P = เปอร์เซ็นต์ไลโซไทที่เป็น polymorphic
H_{exp} = ค่าเฮเทโรไซโกซิตีตามทฤษฎี
H_{obs} = ค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้

ตารางที่ 4-4 จำนวนอัลลีลในแต่ละโลคัส

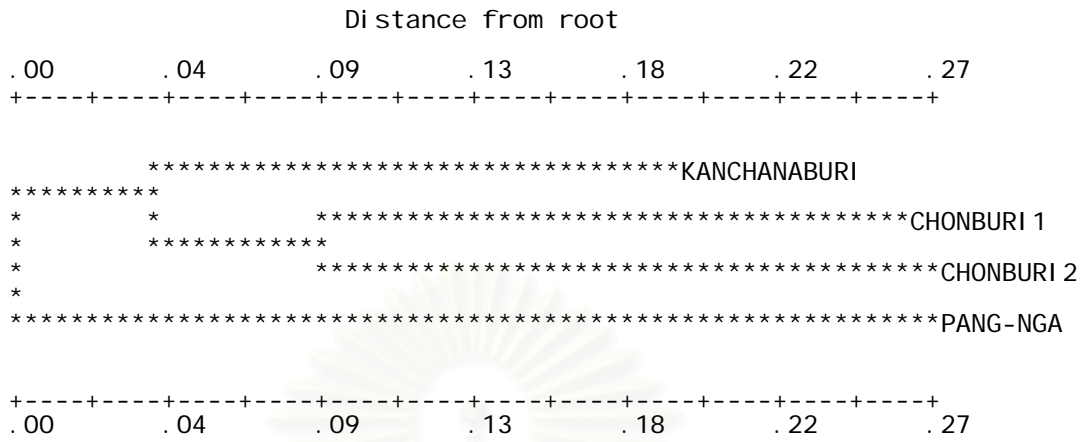
โลคัส	จำนวนอัลลีล
Alcohol dehydrogenase (ADH)	4
Fumarase (FUM)	1
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	6
Glutamate dehydrogenase (GLD)	2
Isocitrate dehydrogenase-1 (IDH-1)	1
Isocitrate dehydrogenase-2 (IDH-2)	1
Malate dehydrogenase-1 (MDH-1)	7
Malate dehydrogenase-2 (MDH-2)	3
Malic enzyme-1 (ME-1)	6
Malic enzyme-2 (ME-2)	4
Lactate dehydrogenase-1 (LDH-1)	1
Lactate dehydrogenase-2 (LDH-2)	1
Octanol dehydrogenase (ODH)	3
Phosphoglucumutase (PGM)	1
Sorbital dehydrogenase (SDH)	6

ตารางที่ 4-5 ค่าความต่างของพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรซึ่งคำนวณตามวิธีของ Nei's (1978) และวิธีของRogers' (1972)

กลุ่มประชากร	เขาวังเขมร	เกาะพระทอง	เขาเขียว เขาชมพู่	สวนสัตว์เปิด เขาเขียว
	เขาวังเขมร	-	.407	.340
เกาะพระทอง	.493	-	.467	.460
เขาเขียว เขาชมพู่	.362	.605	-	.302
สวนสัตว์เปิด เขาเขียว	.311	.615	.293	-

ด้านบนของขีด = วิธีของ Rogers' (1972), ด้านล่างของขีด = วิธีของ Nei's (1978)

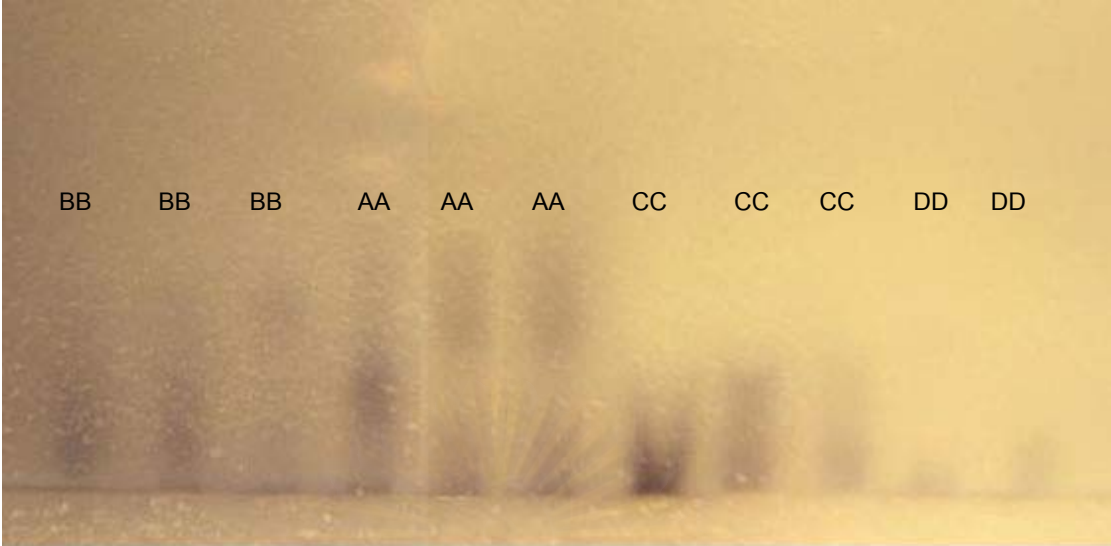
Wagner tree produced by rooting at midpoint of longest path



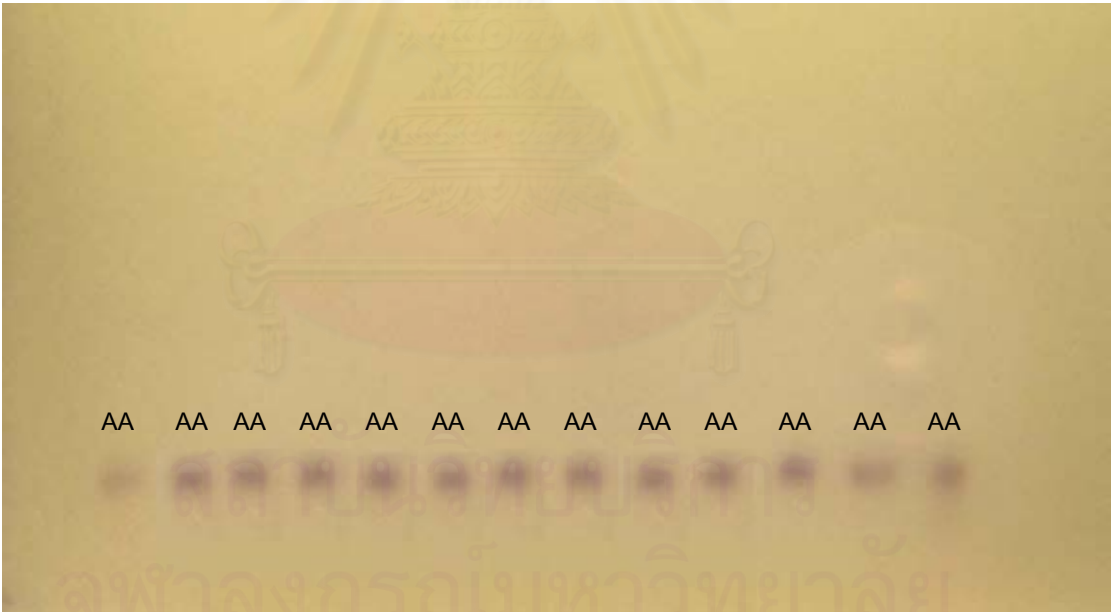
รูปที่ 4-2 dendrogram แสดงความเหมือนของพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร



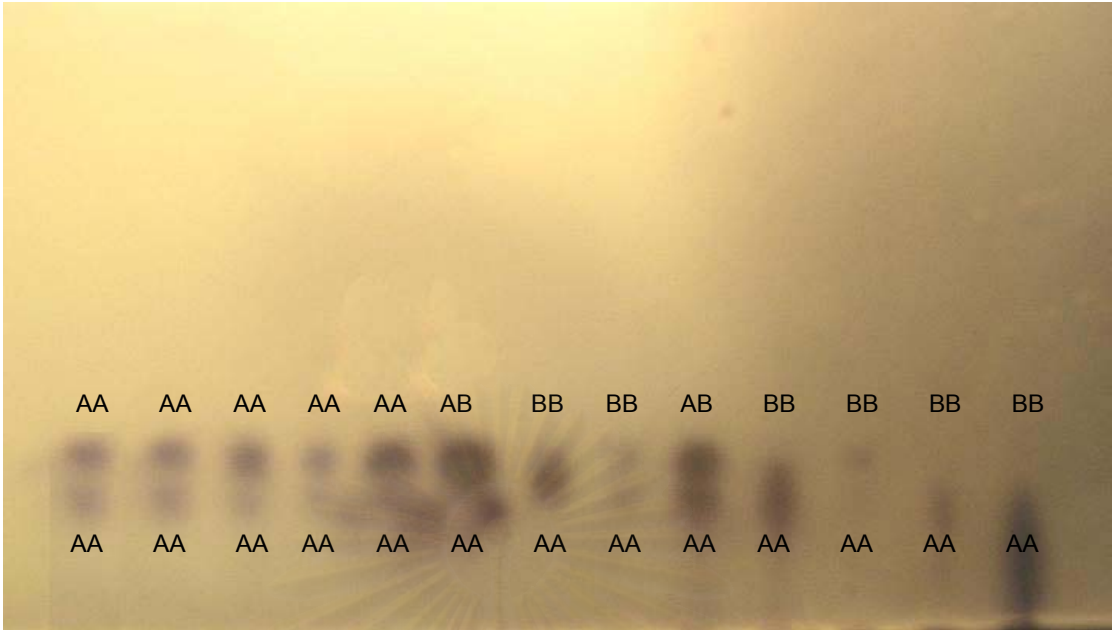
รูปที่ 4-3 แบบแผนไอโซไซม์โลคัส ADH ของประชากรบนของบริเวณเขาวังเขมร



รูปที่ 4-4 แบบแผนไอโซไซมิลิคส์ G6PD ของประชากรกบหนองบริเวณเขาวังเขมร



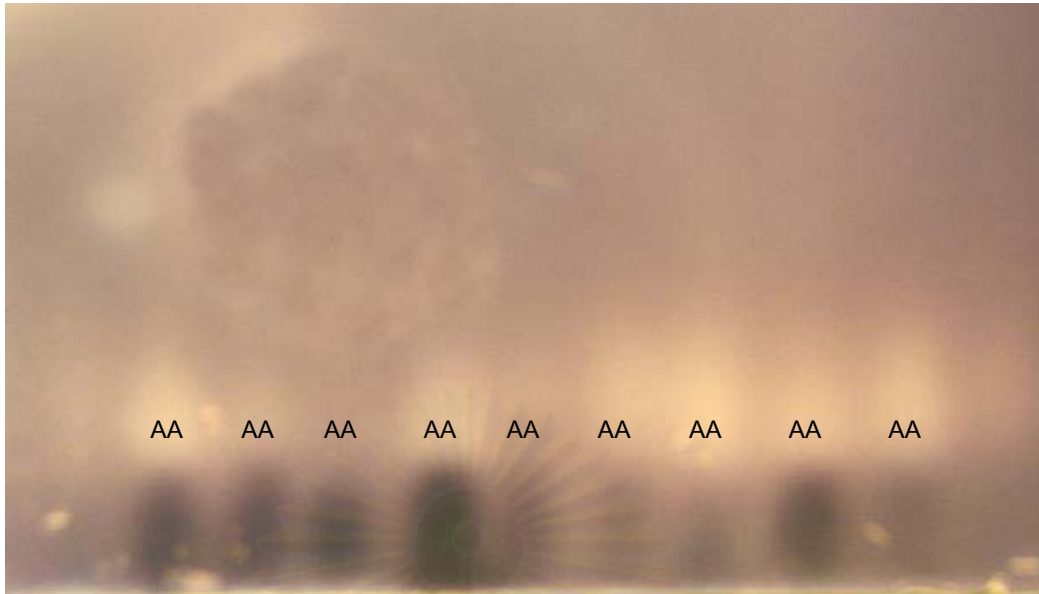
รูปที่ 4-5 แบบแผนไอโซไซมิลิคส์ GLD ของประชากรกบหนองบริเวณเขาวังเขมร



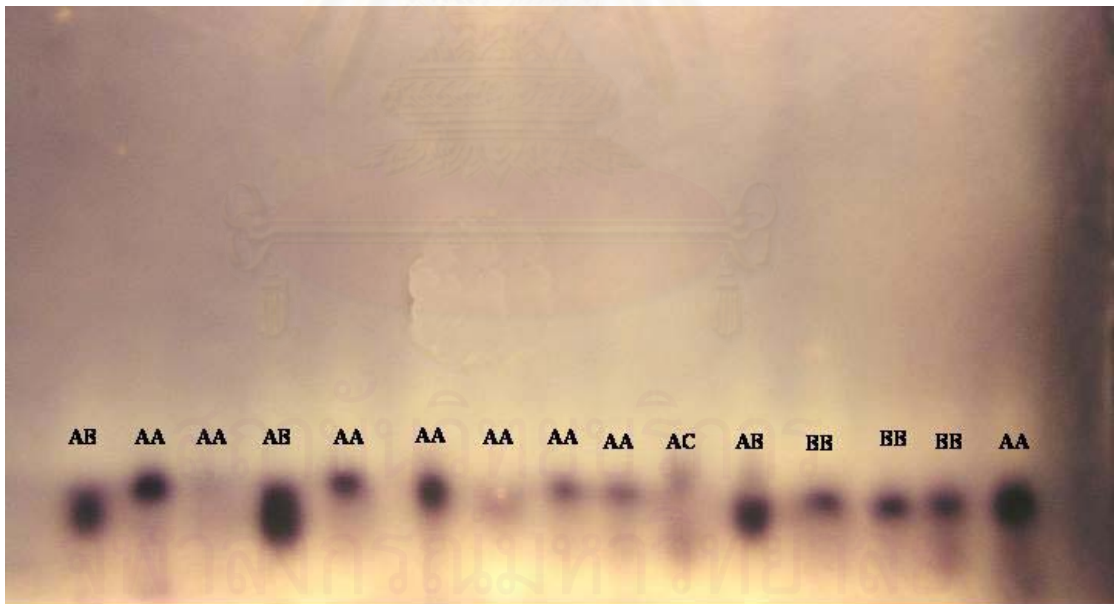
รูปที่ 4-6 แบบแผนไอโซไซมิลอคัส MDH-1,2 ของประชากรกบหนองบริเวณเขาวังเขมร



รูปที่ 4-7 แบบแผนไอโซไซมิลอคัส ME-1,2 ของประชากรกบหนองบริเวณพื้นที่ราบ
สวนสัตว์เปิดเขาเขียว



รูปที่ 4-8 แบบแผนไอโซไซม์โลคัส ODH ของประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง



รูปที่ 4-9แบบแผนไอโซไซม์โลคัส SDH ของประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติในครั้งนี้ได้ใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 10.0 มาทำการวิเคราะห์ โดยเมื่อนำค่าเฉลี่ย SVL ในแต่ละกลุ่มประชากรมาหาความแตกต่างทางสถิติ ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย SVL ในแต่ละกลุ่มประชากร ($P \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าขนาดของกบหนองที่ทำการสำรวจในแต่ละพื้นที่ไม่มีความแตกต่างกัน และเมื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองในแต่ละกลุ่มประชากร พบว่า ค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองบริเวณเกาะพระทอง อำเภอคุระบุรี จังหวัดพังงา มีค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีแตกต่างจากความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองในประชากรกลุ่มอื่น ($P \leq 0.05$) และค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีกลางหลังของกบหนองบริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรีมีค่าแตกต่างกับค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองบริเวณเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี และจากการนำข้อมูลค่าเฮเทโรไซโกตีตีมาหาความสัมพันธ์กับค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองในประชากรกลุ่มต่างๆ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าทั้งสอง ($r = 0.074, P \leq 0.05$) และเมื่อหาความแตกต่างค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีระหว่างกบหนองที่มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) แบบ โฮโมไซกัสกับกบหนองที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮเทโรไซกัสในแต่ละโลคัสจำนวน 6 โลคัส ได้แก่ Alcohol dehydrogenase (ADH), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Malate dehydrogenase-1 (MDH-1), Malate dehydrogenase-2 (MDH-2), Malic enzymes-2 (ME-2) และ Sorbital dehydrogenase (SOD) ไม่พบความแตกต่างของค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีระหว่างกบหนองที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน ($P \leq 0.05$) ซึ่งตารางการวิเคราะห์ผลทางสถิติแสดงไว้ในภาคผนวก ข

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการศึกษา

การวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนไอโซไซม์

จากการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของกบหนองในครั้งนี จะพบอัลลีลที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อประชากรได้ในหลายโลคัส ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ในการระบุถึงแหล่งที่อยู่ของกบหนอง เช่น ในโลคัส Glutamate dehydrogenase (GLD) จะพบอัลลีล B เฉพาะประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง อำเภอคุระบุรี จังหวัดพังงาเท่านั้น โลคัส Malic enzyme-2 (ME-2) จะพบเฉพาะอัลลีล A ในประชากรกบหนองบริเวณแหล่งน้ำบนพื้นที่ราบ บริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรีหรือโลคัส Octanol dehydrogenase (ODH) จะพบอัลลีล A และ C เฉพาะประชากรกบหนองบริเวณพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาเขียว เขาชมพู ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรีเท่านั้น และเมื่อพิจารณาเฉพาะประชากร 2 กลุ่ม คือ แหล่งน้ำบนพื้นที่ราบ บริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี กับพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาเขียว เขาชมพู ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่อยู่ใกล้กัน แต่มีภูเขากั้นแบ่งระหว่างกลุ่มประชากรทั้งสอง จากผลการทดลองจะพบว่า แบบแผนของไอโซไซม์ที่ทำการศึกษามีการร่วมกันของอัลลีลในหลายๆโลคัส ทำให้สันนิษฐานได้ว่า เกิดปรากฏการณ์ gene flow ระหว่างประชากรทั้ง 2 กลุ่มนี้

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนอัลลีลในแต่ละโลคัสกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นๆที่ได้ทำการศึกษาไว้แล้วตามตารางที่ 5-1 พบว่า ส่วนใหญ่จำนวนอัลลีลในแต่ละโลคัสของกบหนองที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนมากกว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกหลายชนิด เช่น จำนวนอัลลีลในโลคัส Glutamate dehydrogenase (GLD) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทุกชนิดในตารางที่ 5-1 มีจำนวน 1 อัลลีล ในขณะที่จำนวนอัลลีลในโลคัส GLD ของกบหนองที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวน 2 อัลลีล หรือจำนวนอัลลีลในโลคัส Malic enzymes-1 (ME-1) ของ *Rana mortenseni* หรือกบอ่องใหญ่ และ *R. nigrovittata* หรือกบอ่องเล็ก ที่ทำการศึกษาโดย Matsui และคณะ (2001) มีจำนวนอัลลีล 1 อัลลีล และ 2 อัลลีล ตามลำดับ แต่ในกบหนองที่ทำการศึกษานี้มีจำนวน 6 อัลลีล แต่ก็มีบางโลคัสที่จำนวนอัลลีลของกบหนองมีจำนวนน้อยกว่า เช่น จำนวนอัลลีล

ไนโลคัส Phosphoglucosyltransferase (PGM) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทุกชนิดในตารางที่ 5-1 จะมีจำนวนอัลลีลมากกว่าในกบหนองที่ทำการศึกษา

เมื่อเปรียบเทียบแบบแผนของไอโซไซม์ของกบหนองที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ กับการศึกษาที่ผ่านมา ได้แก่ การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของกบหนองซึ่งศึกษาโดย Toda และคณะ (1997) ซึ่งทำการศึกษากบหนองบริเวณตะวันตก, เกาะทางด้านทิศใต้ของประเทศญี่ปุ่น, ในประเทศไต้หวัน และด้านตะวันออกของประเทศจีน รวมทั้งการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของกบหนองซึ่งศึกษาโดย Toda และคณะ (1998) ซึ่งทำการศึกษากบหนองบริเวณประเทศไต้หวันทั้งทางด้านทิศตะวันตกและทิศตะวันออกของประเทศ และบริเวณทิศตะวันออกประเทศจีน จะพบว่าส่วนใหญ่จำนวนอัลลีลไนโลคัสที่เหมือนกัน กบหนองที่ทำการศึกษานี้จะมีจำนวนอัลลีลที่มากกว่า รวมทั้งจำนวนอัลลีลต่อโลคัส (A) ของกบหนองที่ทำการศึกษานี้มีค่าสูงกว่าการศึกษาทั้งสองครั้งที่ผ่านมา จึงอาจจะสรุปได้ว่าประชากรกบหนองในประเทศไทยมีความหลากหลายของพันธุกรรมมากกว่าประชากรกบหนองในประเทศจีน, ประเทศไต้หวัน และประเทศญี่ปุ่น

สำหรับความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม พบว่า การที่ประชากรกบหนองแหล่งน้ำบนพื้นที่ราบ บริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว กับประชากรกบหนองพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาเขียว เขาชมพู่ มีความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมน้อย ($D=0.293$) เนื่องจากบริเวณทั้งสองอยู่ใกล้กันมีเพียงภูเขามากั้นตรงกลาง จึงทำให้มีความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมน้อย ส่วนประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง จังหวัดพังงา มีความแตกต่างของลักษณะพันธุกรรมกับประชากรกลุ่มอื่นๆมากที่สุด ($D=0.493-0.615$) เพราะบริเวณเกาะพระทอง ตั้งอยู่ทางด้านทะเลฝั่งอันดามัน ซึ่งมีลักษณะเป็นเกาะที่มีน้ำทะเลล้อมรอบ ประชากรของกบหนองบริเวณนี้จึงถูกแยกออกจากบริเวณแผ่นดิน ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของกบหนองบริเวณนี้แตกต่างจากบริเวณอื่นๆมากที่สุด และการที่ประชากรกบหนองบริเวณโครงการอพ.สธ. จังหวัดกาญจนบุรี กับประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง จังหวัดพังงา มีความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมน้อยกว่าประชากรของกบหนองอีกสองบริเวณที่ทำการศึกษา เพราะว่าจังหวัดกาญจนบุรีกับจังหวัดพังงาตั้งอยู่ทางด้านทิศตะวันตกของประเทศไทยเช่นกัน ในขณะที่ประชากรกบหนองอีก 2 บริเวณ ซึ่งอยู่ในจังหวัดชลบุรี ทางด้านทิศตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งอยู่คนละฝั่งของประเทศ ทำให้ความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรบริเวณพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาวังเขมร อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี กับประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง จังหวัดพังงามีค่าน้อยกว่าประชากรอีก 2 กลุ่มที่เหลือ และจากกรณีเหตุการณ์คลื่นสึนามิที่ได้พัด

เข้ามาบริเวณฝั่งทะเลอันดามัน ซึ่งเกาะพระทอง จังหวัดพังงาเป็นอีกบริเวณหนึ่งที่ได้รับผลกระทบจากเหตุการณ์ดังกล่าว น้ำทะเลได้ท่วมขึ้นมาบนเกาะทั้งหมด ทำให้หนองน้ำบริเวณที่ทำการสำรวจบหนองถูกน้ำทะเลเข้าแทนที่ จนน้ำบริเวณดังกล่าวกลายเป็นน้ำเค็ม (Broekhoven และคณะ, 2005) จึงคาดว่าบหนองที่เคยอาศัยอยู่บริเวณดังกล่าวอาจจะสูญหายไปจนเกือบหมดเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยไม่เหมาะสม ทำให้ความถี่อัลลีล และอัลลีลของบางโลคัสที่พบได้เฉพาะบนเกาะพระทองสูญหายไป และอาจจะทำให้ลักษณะพันธุกรรมของบหนองบริเวณเกาะพระทองแตกต่างจากบริเวณอื่นๆที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มากขึ้นกว่าเดิม ซึ่งเป็นเรื่องที่ควรจะทำการศึกษาต่อไป



รูปที่ 5-1 สภาพพื้นที่ที่ถูกทำลายด้วยคลื่นสึนามิ

ตารางที่ 5-1 จำนวนอัลลีลในแต่ละโลคัสของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด

ชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	จำนวนอัลลีลแต่ละโลคัส															ค่าเฮเทโรไซโกซิตี
	ADH	FUM	G6PD	GLD	IDH-1	IDH-2	LDH-1	LDH-2	MDH-1	MDH-2	ME-1	ME-2	ODH	PGM	SDH	
<i>Acris crepitans</i>	-	-	-	-	-	-	2	1	3	2	1	-	-	4	-	-
<i>Bufo arenarum</i>	-	-	-	-	-	-	2	3	3	1	-	-	-	-	-	0.116-0.236
<i>B. microscaphus</i>	2	2	-	1	3	2	-	-	2	-	1	2	-	2	-	-
<i>B. viridis</i>	-	-	-	-	-	-	1	2	2	2	-	-	-	-	-	0.113-0.155
<i>Heleophryne natalensis</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	2	2	2	-	-	2	-	0.00-0.018
Microhylidae	-	-	-	-	9	7	6	11	8	2	8	5	-	9	-	0.00-0.013
<i>Rana boylei</i>	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>R. limnocharis</i>	-	3	-	1	4	3	2	2	3	5	4	4	-	6	-	-
<i>R. limnocharis</i> (in Taiwan)	-	3	-	1	3	3	1	3	3	4	4	3	-	6	-	0.052-0.178
<i>R. muscosa</i>	-	-	-	1	2	1	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>R. mortenseni</i>	-	1	-	1	1	1	1	1	1	-	1	2	-	1	-	0.04
<i>R. nigrovittata</i>	-	2	-	1	1	2	2	3	2	-	2	4	-	3	-	0.05-0.11
<i>R. ruglosa</i>	-	-	-	2	2	2	1	2	2	2	-	-	-	2	2	0.216

การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบหนอง ได้แก่ ความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนอง แสดงให้เห็นว่าในการศึกษาครั้งนี้ค่าเฮเทโรไซโกซิตีไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบหนอง ได้แก่ ความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนอง และเมื่อหาความแตกต่างของความแปรปรวนของความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองระหว่างกบหนองที่มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) แบบเฮเทโรไซกัสกับกบหนองที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบโฮโมไซกัส ในโลคัส ADH, G6PD, MDH-1, MDH-2, ME-2 และ SOD ซึ่งไม่พบความแตกต่างของความแปรปรวนดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าไม่มีโลคัสใดในการศึกษาครั้งนี้เกี่ยวข้องกับความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกบหนอง ซึ่งแตกต่างกับผีเสื้อกลางคืน *Danaus plexippus* ที่พบว่าโลคัสที่สร้างเอนไซม์ Mannose phosphate isomerase (MPI) โลคัสที่สร้างเอนไซม์ Phosphoglucomutase (PGM) เกี่ยวข้องกับความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ความยาวของปีก และความกว้างของจุดบนปีก (Eanes, 1978) รวมทั้งปลาทะเล *Fundulus heteroclitus* ซึ่งโลคัสที่สร้างเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยามากที่สุด เช่น ความยาวของครีบท้อง, จำนวนเกล็ดด้านข้างลำตัว หรือจำนวนครีบด้านท้อง เป็นต้น การที่สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพราะว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีการเคลื่อนที่ได้ไกล และมีพื้นที่หากินหลากหลาย จึงเกิดปรากฏการณ์ gene flow ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และจะต้องมีการพรางตัว หรือปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย เพื่อความอยู่รอด จึงทำให้พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ แต่ทั้งนี้ความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่ได้ขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นอาศัยอยู่ด้วย จึงอาจเป็นไปได้ว่า ความหลากหลายของกบหนองที่ทำการศึกษาในครั้งนี้อาจจะขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมในแต่ละกลุ่มประชากรด้วย

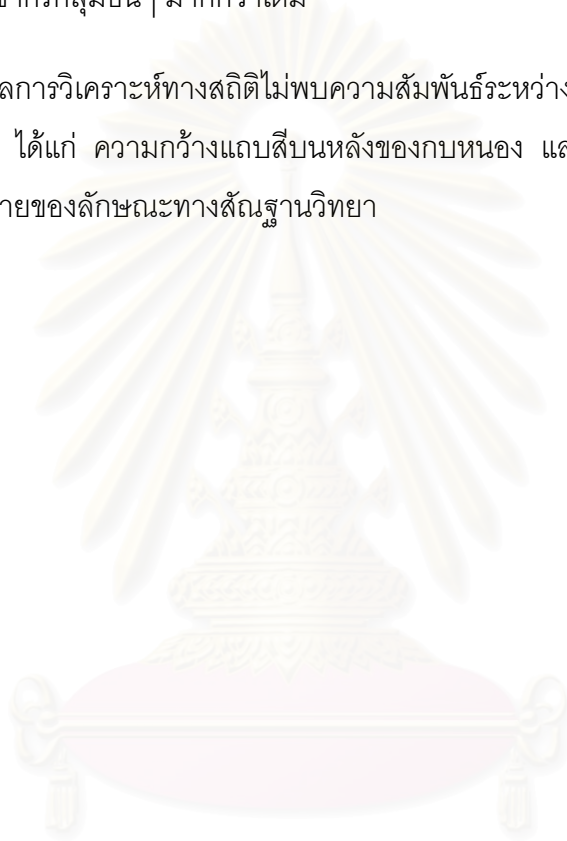
บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. จำนวนกบหนองที่สำรวจพบจากทั้งหมด 4 บริเวณ มีจำนวนดังนี้
 - (1.1) เขาวังเขมร อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี จำนวน 21 ตัวอย่าง
 - (1.2) พื้นที่ราบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง
 - (1.3) แหล่งน้ำบนเขาเขียว เขาชมพู่ อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี จำนวน 15 ตัวอย่าง
 - (1.4) เกาะพระทอง อ. คุระบุรี จ. พังงา จำนวน 21 ตัวอย่าง
2. ความยาวลำตัวของกบหนองที่สำรวจพบ (Snout and Vent Length, SVL) มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 4.07-4.57 เซนติเมตร และมีค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีบนหลังระหว่าง 0.38-2.25 มิลลิเมตร
3. การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์จำนวน 15 โลไซม์ มีจำนวน 9 โลไซม์ที่มีลักษณะเป็น polymorphic ได้แก่ Alcohol dehydrogenase (ADH), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Glutamate dehydrogenase (GLD), Malate dehydrogenase-1 (MDH-1), Malate dehydrogenase-2 (MDH-2), Malic enzyme-1 (ME-1), Malic enzyme-2 (ME-2), Octanol dehydrogenase (ODH) และ Sorbitol dehydrogenase (SDH) และอีก 6 โลไซม์มีลักษณะเป็น monomorphic ได้แก่ Fumarase (FUM), Isocitrate dehydrogenase-1 (IDH-1), Isocitrate dehydrogenase (IDH-2), Lactate dehydrogenase-1 (LDH-1), Lactate dehydrogenase-2 (LDH-2) และ Phosphoglucosmutase (PGM) ซึ่งมีจำนวนอัลลีลระหว่าง 1-6 อัลลีลระหว่าง 1.50-1.80, เปอร์เซ็นต์ไอโซไซม์ที่เป็น polymorphic ระหว่าง 26.7-40.0 และค่าเฮเทโรไซโกซิตีระหว่าง 0.022-0.058
4. พบเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ที่ใช้ระบุถึงแหล่งที่มาของกลุ่มประชากรในโลคัส Glutamate dehydrogenase (GLD) จะพบอัลลีล B เฉพาะประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง อำเภอคุระบุรี จังหวัดพังงาเท่านั้น โลคัส Malic enzyme-2 (ME-2) จะพบเฉพาะอัลลีล A ในประชากรกบหนองบริเวณแหล่งน้ำบนพื้นที่ราบ บริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรีหรือโลคัส Octanol dehydrogenase (ODH) จะพบอัลลีล A และ C เฉพาะประชากรกบหนองบริเวณพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาเขียว เขาชมพู่ ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

5. ความเหมือนของลักษณะทางพันธุกรรม พบว่า ประชากรกบหนองบริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว กับประชากรกบหนองบริเวณเขาเขียว มีความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ส่วนประชากรกบหนองบริเวณเกาะพระทอง จังหวัดพังงา มีความแตกต่างของลักษณะพันธุกรรมกับประชากรกลุ่มอื่นๆมากที่สุด และจากเหตุการณ์คลื่นสึนามิพัดเข้ามาบริเวณเกาะพระทองทำให้ที่อยู่อาศัยของกบหนองเกิดการเปลี่ยนแปลง จึงคาดว่าจะทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของกบหนองบนเกาะพระทองมีการเปลี่ยนแปลง จนเกิดความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมกับประชากรกลุ่มอื่นๆ มากกว่าเดิม

6. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทอโรไซโกซิตีกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ความกว้างแถบสีบนหลังของกบหนอง และไม่พบว่ามีโลคัสใดเกี่ยวข้องกับความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยา



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- เฉลิมชัย สุวรรณรักษ์, บุญรัตน์ ประทุมชาติ และพนม สอดสุข. 2540. การศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างทางพันธุกรรมและการวัดความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรกบนา (*Rana rugulosa*) ในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 14. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ : กรมประมง.
- ธัญญา จั่นอาจ. 2530. การสำรวจชนิดสัตว์ครึ่งน้ำครึ่งบกในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งจังหวัดอุทัยธานีและจังหวัดตาก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธัญญา จั่นอาจ. 2546. คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : บริษัท ด้านสุทธาการพิมพ์.
- ผุสดี ปริยานนท์, อีวรรณ นุตประพันธ์, กำธร อีรคุปต์ เพลินพิศ ไชคชัยชำนาญกิจ และวชิรญาณ ปวงวัฒนา. 2544. รายงานการวิจัย การศึกษาสำรวจเบื้องต้นและการจัดจำแนกชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก พื้นที่โครงการอนุรักษ์พืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ. ทรัพยากรไทย:อนุรักษ์และพัฒนาด้วยจิตสำนึกแห่งนักวิจัยไทย (เล่ม1). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : บริษัท เวิร์ค สแควร์ จำกัด.
- ผุสดี ปริยานนท์, อีวรรณ นุตประพันธ์, พชนี สิงห์อาษา และนงเยาว์ จันทรวงศ์. 2538. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกบนาชนิด *Rana tigerina* โดยการวิเคราะห์โปรตีนบางชนิดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิเชษฐี คนชื้อ. 2539. ความหลากหลายของชนิดและการแบ่งปันการใช้ทรัพยากรในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก บริเวณลำธารในป่าดิบแล้ง ศูนย์วิจัยป่าอะเซิงเทรา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิโรจน์ นุตพันธุ์. 2544. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

- ศรีวรรณ จีระสุขทวีกุล. 2534. ความหลากหลายชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและ สัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่การใช้ประโยชน์ต่างกัน ในจังหวัดระยอง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัญชลี สิริมนตาภรณ์. 2541. ความหลากหลายของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ภายใน มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศิลปากร.
- อนุสรณ์ ปานสุข. 2543. การสำรวจชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ภายในมหาวิทยาลัย ศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ภาษาอังกฤษ

- BROEKHOVEN, G., TAMELANDER, J., OSBECK, M., SOONTHORNNAWAPHAT, S. and RUST, M. 2005. Kho Prathong-post-tsunami resource and livelihood impact assessment report. Thailand : IUCN The world conservation union.
- CASE, S. M. 1978. Electrophoretic variation in two species of Ranid Frogs, *Rana boylei* and *R. muscosa*. *Copeia*. 2:311-320.
- DUELLMAN, W. E. and TRUEB, L. 1986. *Biology of Amphibians*. USA : McGraw-Hill Book Company.
- EANES, W. F. 1978. Morphological variance and enzyme heterozygosity in the monarch butterfly. *Nature*. 276:263-264.
- GERGUS, E. W. A. 1998. Systematic of the *Bufo microscaphus* complex : allozyme evidence. *Herpetologica*. 54(3):317-325.
- GROBLER, J. P., MAFUMO, H. B. and MINTER, L. R. 2003. Genetic differentiation among five populations of the South African ghost frog, *Heleophryne natalensis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31(2003):1023-1032.
- HEDRICK, P. W. 1999. *Genetics of Populations*. England : Jones and Barlett Publishers.

- HEYER, W.R., DONNELLY, M.A., MCDIARMID, R.W., HAYEK, L.C. and FOSTER, M.S. 1984. **Measuring and monitoring biological diversity standard method for amphibian**. London : Smithsonian Institution Press.
- KARAKOUSIS, Y. and SKLAVOUNOU, P. K. 1995. Genetic and morphological differentiation among population of the Green toad *Bufo viridis* from northern Greece. **Biochem. Syst. Ecol.** 23(1):39-45.
- KRUSE, K. E. and DUNLAP, D. G. 1976. Serum albumins and hybridization in two species of the *Rana pipiens* complex in the north central United States. **Copeia**. 2:394-396.
- MANCHENKO, G. P., DAUTOVA, T. N., and LATYPOV, Y. Y. 2000. High level of genetic divergence between sympatric color morphs of the littoral sea anemone *Anthopleura orientalis* (Anthozoa: Actiniaria). **Biochem. Syst. Ecol.** 28 : 737-750.
- MATSUI, M., NISHIKAWA, K., KHONSUE, W., PANHA, S. and NABHITABHATA, J. 2001. Allozymic variation in *Rana nigrovittata* (Amphibia: Anura) within Thailand with special reference to the taxonomic status of *R. mortenseni*. **Nat. Hist. J. Chulalongkorn Univ.** 1(1):15-22.
- MATTHEWS, T. C. 1975. Biochemical polymorphism in populations of the Argentine Toad, *Bufo arenarum*. **Copeia**. 3:454-465.
- MITTON, J. B. 1978. Relationship between heterozygosity for enzyme loci and variation of morphological characters in natural population. **Nature**. 273:661-662.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F., CATALAN, J. and DAVIDIAN, J. B. 1988. **Practical isozyme genetics**. England : Ellis Horwood Limited.
- PIERCE, B. A. and MITTON, J, 1982. Allozyme heterozygosity and growth in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **J. Hered.** 73:250-253.
- PLATZ, J. E. 1972. Sympatric interaction between two forms of leopard frog (*Rana pipiens* complex) in Texas. **Copeia**. 2:232-240.
- SAITOU, N. and NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. **Molec. Biol. Evol.** 4:406-425.
- SUMIDA, M., ALLISON, A. and NISHIOKA, M. 2000. Evolutionary relationships among 12 species belonging to three genera of the Family Microhylidae in Papua New Guinea revealed by allozyme analysis. **Biochem. Syst. Ecol.** 28(2000):721-736.

- SWOFFORD, D. L. and SELANDER, R. B. 1981. BIOSYS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72:281-283.
- TAYLER, E. H. 1962. *The Amphibian Fauna of Thailand*. Kansas : Univ. Kansas Sci. Bull.
- TODA, M., NISHIDA, M., MATSUI, M., LUE, K. Y. and OTA, H. 1998. Genetic variation in the Indian rice frog, *Rana limnocharis* (Amphibia: Anura), in Taiwan, as revealed by allozyme data. *Herpetologica*. 54(1):73-82.
- TODA, M., NISHIDA, M., MATSUI, M., WU, G. F. and OTA, H. 1997. Allozyme variation among East Asian populations of the Indian rice frog, *Rana limnocharis* (Amphibia: Anura). *Biochem. Syst. Ecol.* 25:143-159.
- WARD, R., RUTLEDGE, J. and ZIMMERMAN, E. G. 1987. Genetic variation and population subdivision in the Cricket frog *Acris crepitans*. *Biochem. Syst. Ecol.* 15(3):377-384.
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19:395-420.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. Tris-Citrate pH 6.9

Electrode buffer pH 6.3

Tris (0.22 M)	135.0 g
Citric acid (monohydrate) (0.08 M)	90.0 g
เติมน้ำจนครบ	5,000 mL.

ปรับค่า pH เป็น 6.3 ด้วย Tris หรือ Citric acid (1 M)

Gel buffer pH 6.7

Tris (0.008 M)	4.9 g
Citric acid (monohydrate) (0.003 M)	3.2 g
เติมน้ำจนครบ	5,000 mL.

ปรับค่า pH เป็น 6.7 ด้วย Tris หรือ Citric acid (1 M)

2. Tris-Citrate pH 8.0

Electrode buffer pH 8.0

Tris (0.62 M)	378.2 g
Citric acid (monohydrate) (0.08 M)	150.0 g
เติมน้ำจนครบ	5,000 mL.

ปรับค่า pH เป็น 8.0 ด้วย Tris หรือ Citric acid (1 M)

Gel buffer pH 8.0

Electrode buffer 160 mL.

เติมน้ำจนครบ 5,000 mL.

ปรับค่า pH เป็น 8.0 ด้วย Tris หรือ Citric acid (1 M)

3. Tris-Maleate-EDTA pH 6.9

Electrode buffer pH 6.9

Tris (0.1 M) 60.5 g

Maleic acid (anhydride) (0.08 M) 49.0 g

EDTA (0.01 M) 18.6 g

MgCl₂ · 6H₂O (0.01 M) 10.0 g

เติมน้ำจนครบ 5,000 mL.

ปรับค่า pH เป็น 6.9 ด้วย NaOH น้ำหนักประมาณ 10 g และ Tris หรือ Maleic acid (anhydride) (1 M)

Gel buffer pH 6.9

Electrode buffer 40 mL.

เติมน้ำจนครบ 400 mL.

ปรับค่า pH เป็น 8.0 ด้วย Tris หรือ Maleic acid (anhydride) (1 M)

ภาคผนวก ข

ตารางทางสถิติ

ตาราง ข-1 ค่าเฉลี่ยความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนองในแต่ละกลุ่มประชากร

Descriptives

WIDTH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	21	2.2548	.9681	.2113	1.8141	2.6954	.70	3.60
2.00	15	.3760	.5151	.1330	9.074E-02	.6613	.00	1.40
3.00	15	1.4333	.8287	.2140	.9744	1.8922	.00	3.60
4.00	21	.7381	.9937	.2168	.2858	1.1904	.00	3.20
Total	72	1.2499	1.1289	.1330	.9846	1.5151	.00	3.60

ตาราง ข-2 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบความกว้างของแถบสีบนหลังของกบหนอง
ระหว่างกลุ่มประชากร

ANOVA

WIDTH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	38.666	3	12.889	16.912	.000
Within Groups	51.822	68	.762		
Total	90.488	71			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ข-3 ตารางแสดงการเปรียบเทียบความกว้างแถบสีบนหลังของกบหนองระหว่างกลุ่มประชากร ด้วยวิธีการ LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: WIDTH

LSD

(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	1.8788*	.2951	.000	1.2899	2.4677
	3.00	.8214*	.2951	.007	.2325	1.4103
	4.00	1.5167*	.2694	.000	.9791	2.0543
2.00	1.00	-1.8788*	.2951	.000	-2.4677	-1.2899
	3.00	-1.0573*	.3188	.001	-1.6934	-.4212
	4.00	-.3621	.2951	.224	-.9510	.2268
3.00	1.00	-.8214*	.2951	.007	-1.4103	-.2325
	2.00	1.0573*	.3188	.001	.4212	1.6934
	4.00	.6952*	.2951	.021	.1063	1.2841
4.00	1.00	-1.5167*	.2694	.000	-2.0543	-.9791
	2.00	.3621	.2951	.224	-.2268	.9510
	3.00	-.6952*	.2951	.021	-1.2841	-.1063

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตาราง ข-4 ค่าเฉลี่ยความยาวของลำตัว (SVL) ของกบหนองในแต่ละกลุ่มประชากร

Descriptives

SVL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	21	4.2910	.4701	.1026	4.0769	4.5050	3.65	5.33
2.00	15	4.2560	.4925	.1272	3.9833	4.5287	3.44	5.34
3.00	15	4.0713	.4767	.1231	3.8073	4.3353	3.51	5.33
4.00	21	4.5743	.7782	.1698	4.2200	4.9285	3.40	6.35
Total	72	4.3206	.5990	7.059E-02	4.1798	4.4613	3.40	6.35

ตาราง ข-5 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบความยาวลำตัว (SVL)ของกบหนอง
ระหว่างกลุ่มประชากร

ANOVA

SVL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.365	3	.788	2.319	.083
Within Groups	23.111	68	.340		
Total	25.475	71			

ตาราง ข-6 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าเฮเทอโรไซโกซิตีกับความกว้างแถบสีบนหลังของกบหนอง

Correlations

		BAND1	HETERO1
BAND1	Pearson Correlation	1.000	.074
	Sig. (2-tailed)	.	.537
	N	72	72
HETERO1	Pearson Correlation	.074	1.000
	Sig. (2-tailed)	.537	.
	N	72	72

ตาราง ข-7 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนแถบสีบนหลังของกบหนอง

โลคัส ADH

ANOVA

ADH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.032	1	1.032	1.191	.279
Within Groups	60.665	70	.867		
Total	61.697	71			

ตาราง ข-8 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนแถบสีบนหลังของกบหนอง

โลคัส G6PD

ANOVA

G6PD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.601	1	3.601	3.369	.071
Within Groups	74.824	70	1.069		
Total	78.425	71			

ตาราง ข-9 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนแถบสีบนหลังของกบหนอง

โลคัส MDH-1

ANOVA

MDH1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.103	1	.103	.080	.778
Within Groups	90.385	70	1.291		
Total	90.488	71			

ตาราง ข-10 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนแถบสีบนหลังของกบหนอง

โลคัส MDH-2

ANOVA

MDH2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.321	1	.321	.249	.619
Within Groups	90.167	70	1.288		
Total	90.488	71			

ตาราง ข-11 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนแถบสีบนหลังของกบหนอง

โลคัส ME-2

ANOVA

ME2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.292	1	3.292	3.945	.051
Within Groups	58.406	70	.834		
Total	61.697	71			

ตาราง ข-12 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนแถบสีบนหลังของกบหนอง

โลคัส SOD

ANOVA

SOD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.625	1	1.625	1.280	.262
Within Groups	88.863	70	1.269		
Total	90.488	71			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอนุสรณ์ ปานสุข เกิดเมื่อวันที่ 9 มีนาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) ในปีการศึกษา 2543 จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษา เพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน ประจำปีการศึกษา 2545 และ 2546 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้เข้าร่วมเสนองานวิทยานิพนธ์ภาคโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการ พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14 ประจำปี พ.ศ. 2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย