



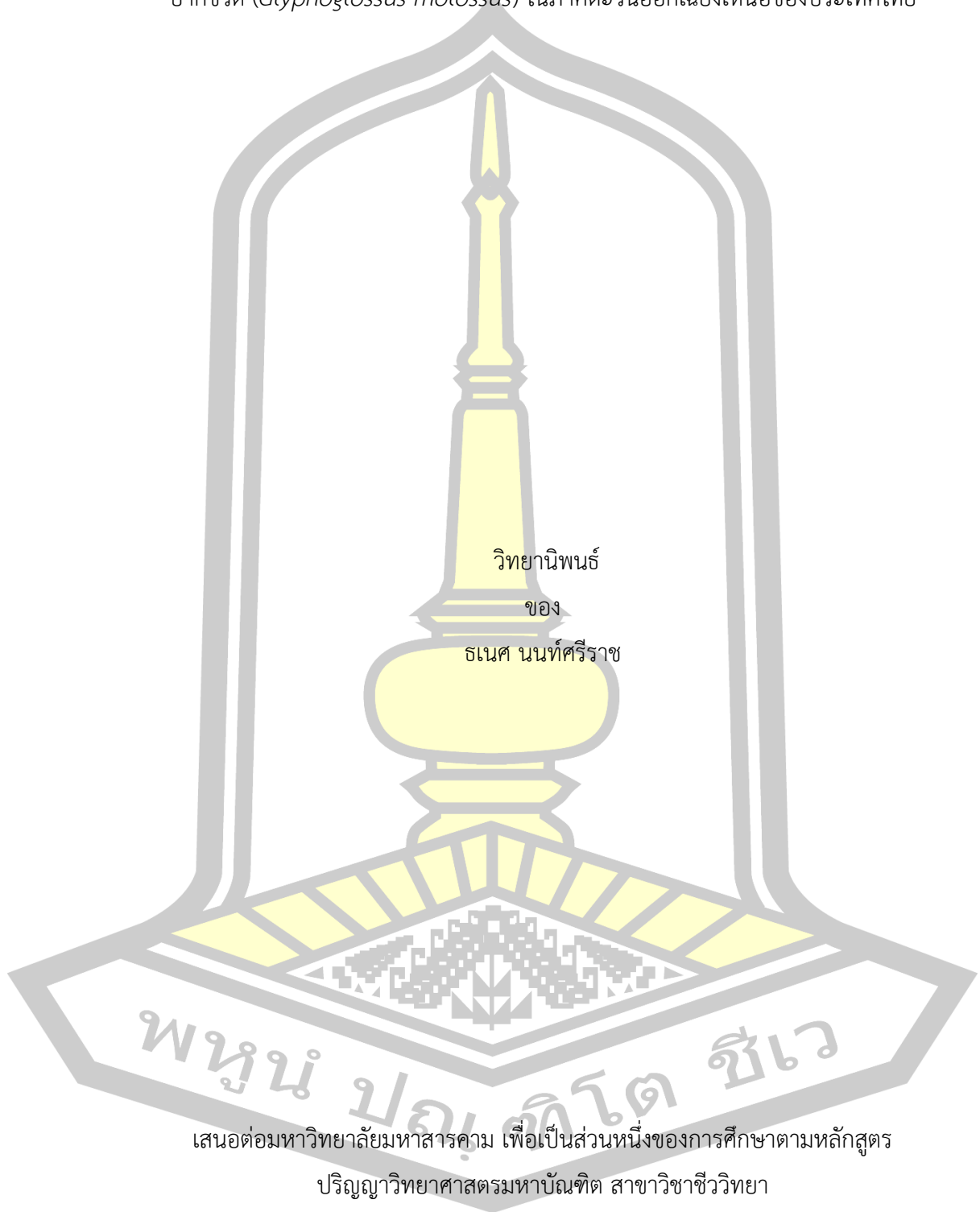
ความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างทางพันธุกรรม และความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของอึ่ง
ปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

วิทยานิพนธ์
ของ
ธเนศ นนท์ศรีราช

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มกราคม 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างทางพันธุกรรม และความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของอิง
ปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

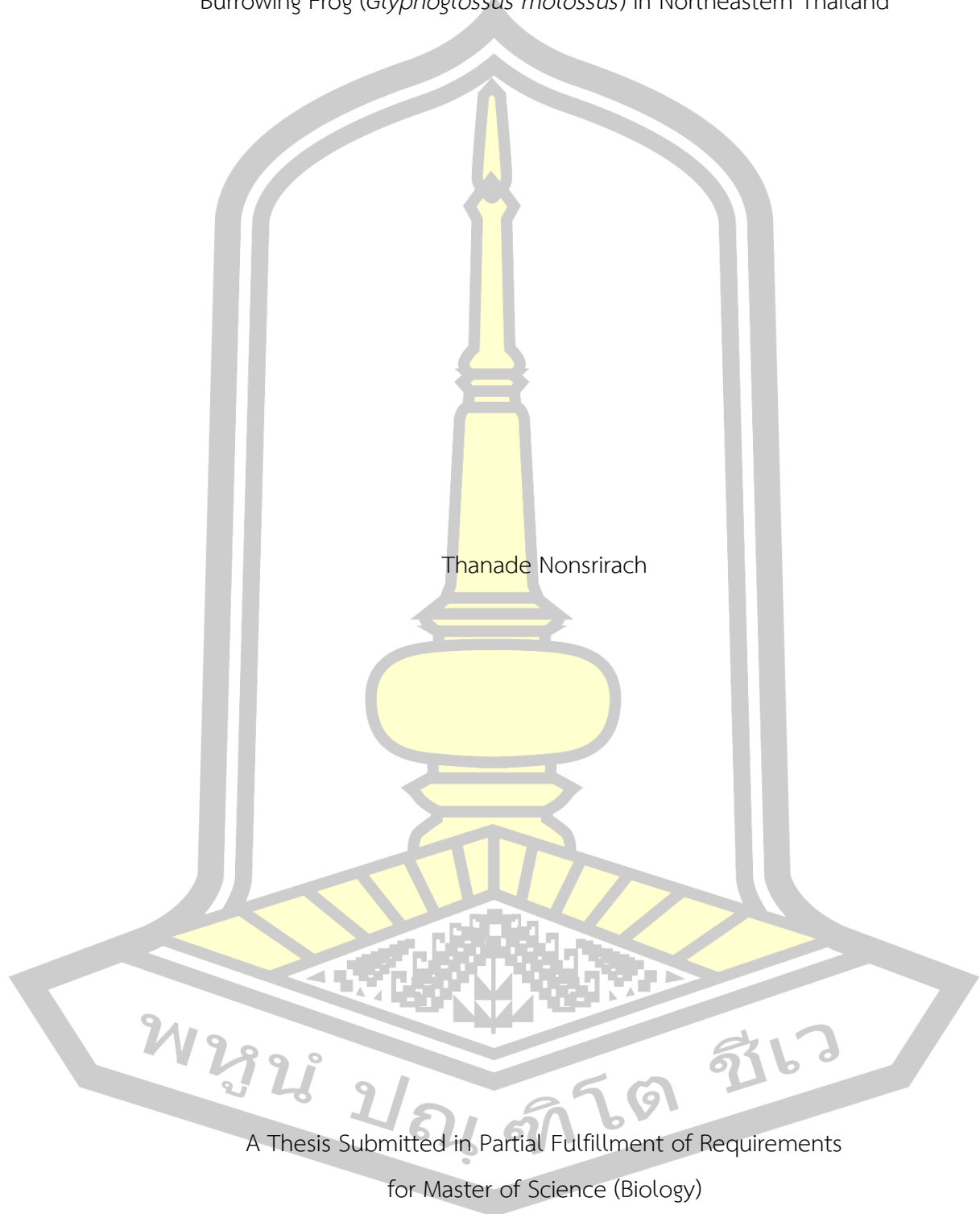


เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มกราคม 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Genetic Diversity, Genetic Structure and Morphological Variation of Truncate-snouted
Burrowing Frog (*Glyphoglossus molossus*) in Northeastern Thailand



Thanade Nonsrirach

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biology)

January 2019

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายธเนศ นนท์ศรีราช
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. อัญชลี เอามล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. คมศร เล่าห์ประเสริฐ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รศ. ดร. วัลยา สุทธิขำ)

กรรมการ

(อ. ดร. ศักดิ์บวร ตุ่มปี่สุวรรณ)

กรรมการ

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

(ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

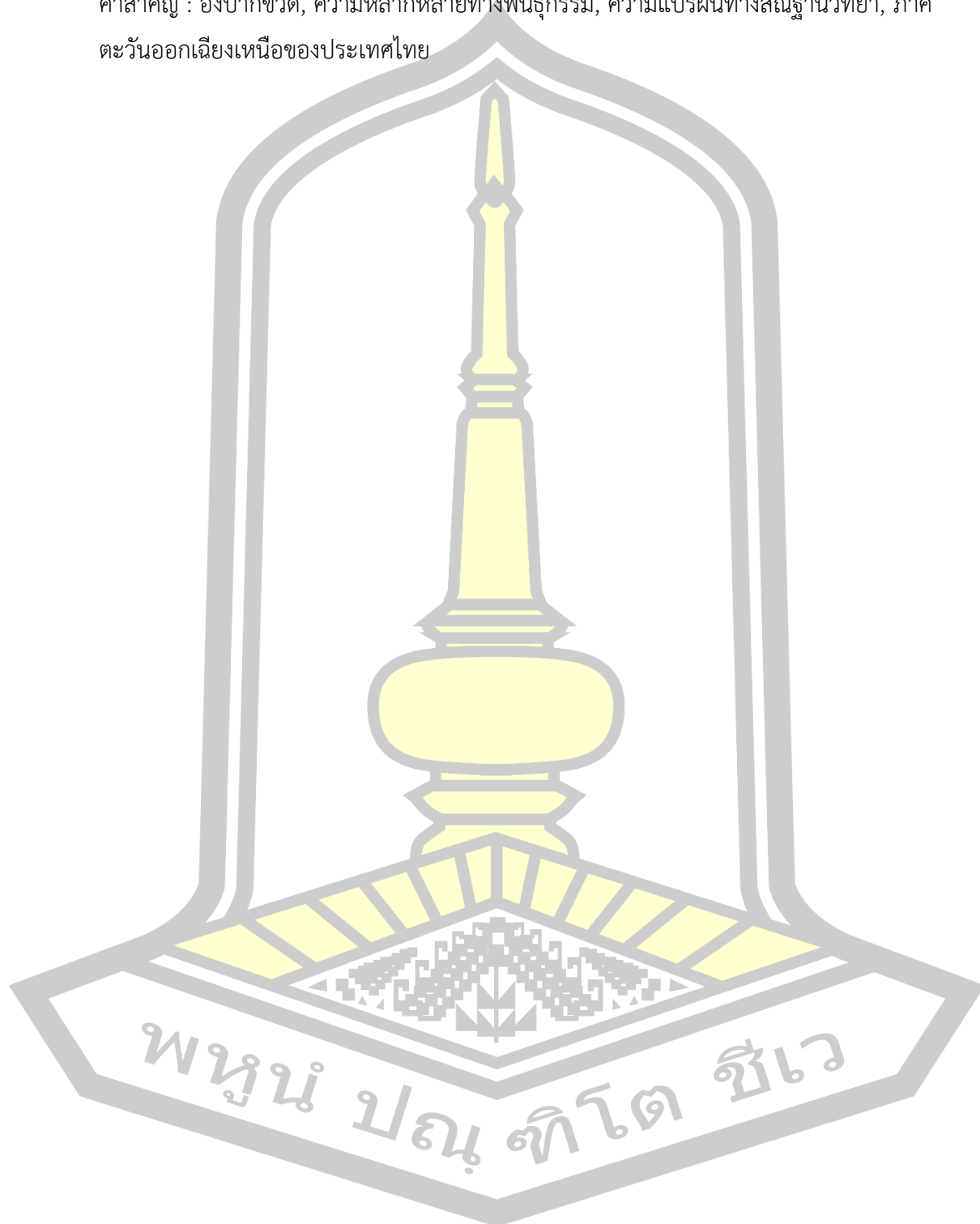
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างทางพันธุกรรม และความแปรผันทาง สัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวด (<i>Glyphoglossus molossus</i>) ในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย		
ผู้วิจัย	ธเนศ นนท์ศรีราช		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คมศร เล่าห์ประเสริฐ รองศาสตราจารย์ ดร. วัลยา สุทธิขำ		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

อึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) (วงศ์ Microhylidae) เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งได้ถูกองค์การสหภาพเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ ประเมินระดับความเสี่ยง (IUCN Red List) อยู่ในข่ายเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากการจับมาเพื่อจำหน่ายและบริโภคเป็นอาหารในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความแปรผันทางสัณฐานและความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งปากขวดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย จากยีน 16S rRNA และ Cyt-b ผลการศึกษาแสดงแฮพโลไทป์จำเพาะ (unique haplotype) 6 จากทั้งหมด 9 แฮพโลไทป์ ในขณะที่อีก 2 แฮพโลไทป์ มีความถี่สูงและการกระจายอยู่ในบริเวณเทือกเขาภูพาน ความหลากหลายของแฮพโลไทป์และนิวคลีโอไทด์อยู่ระดับต่ำ ($h = 0.718$, $\pi = 0.00464$) แสดงให้เห็นว่าเทือกเขาภูพานไม่สูงพอที่จะเป็นอุปสรรคทางภูมิศาสตร์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างที่ราบสูงแอ่งโคราชและสกลนคร อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ AMOVA และ phylogenetic tree ได้แสดงผลของ clades ที่แตกต่างกันทางพันธุกรรมสองกลุ่มใหญ่บริเวณแอ่งสกลนครรวมกับส่วนบนของแอ่งโคราช (clade A) และบริเวณส่วนล่างของแอ่งโคราช (clade B) ภายในประชากรอึ่งปากขวดในที่ราบสูงโคราช ทั้งสองกลุ่มถูกแยกออกจากกันโดยปัจจัยระยะทางภูมิประเทศซึ่งจะช่วยลดการไหลของยีน นอกจากนี้การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันทางภูมิศาสตร์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาขอพบความสัมพันธ์กับแนวเส้นละติจูดที่เปลี่ยนแปลง โดยขนาดของความยาวหัวและความยาวกระดูกขาหลังมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของข้อมูลทางสัณฐานวิทยาอึ่งปากขวดพบว่าสามารถแบ่งอึ่งปากขวด ออกเป็นกลุ่มตามแนวเส้นละติจูด

คำสำคัญ : อี้งปากขวด, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ความแปรผันทางสัณฐานวิทยา, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย



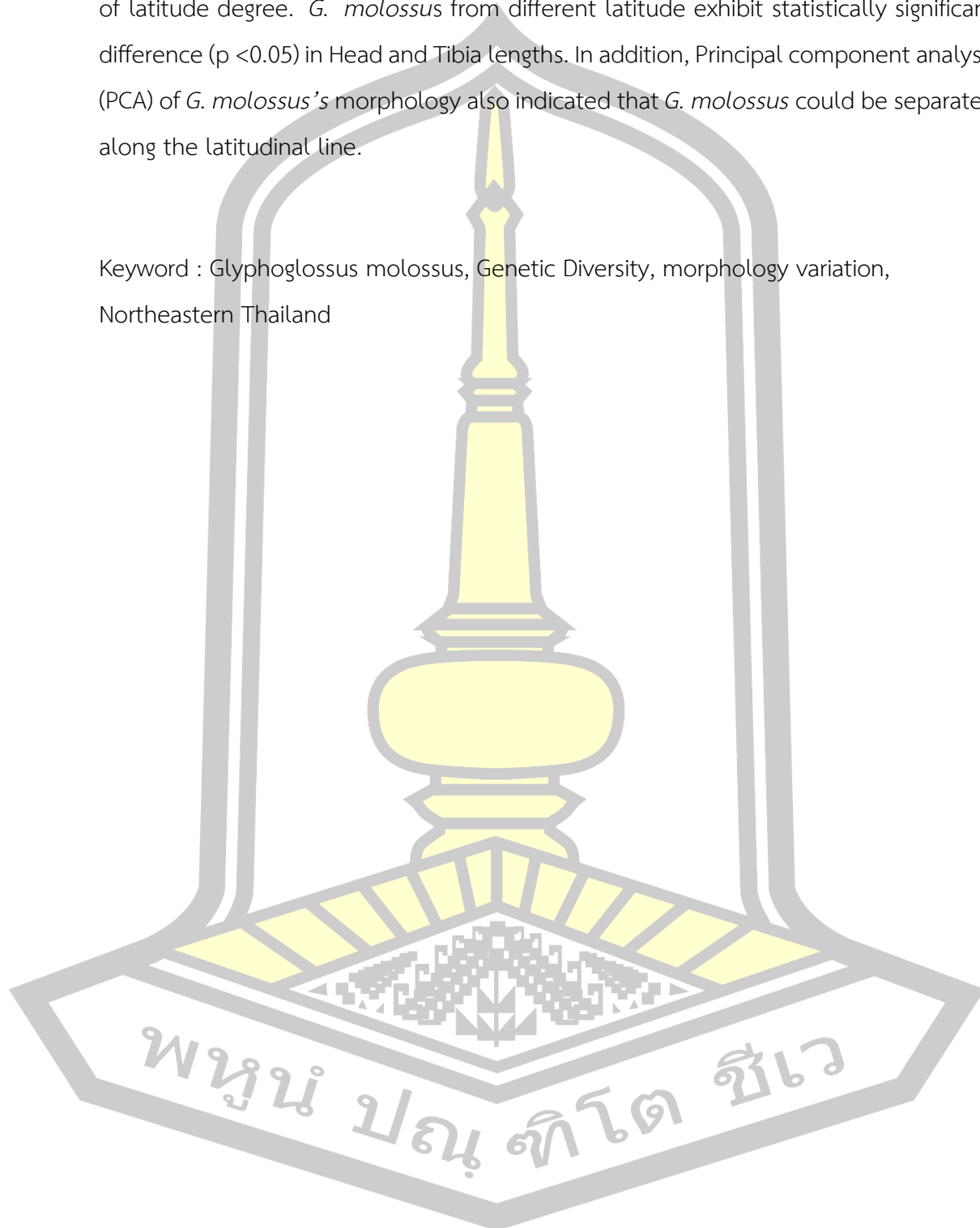
TITLE	Genetic Diversity, Genetic Structure and Morphological Variation of Truncate-snouted Burrowing Frog (<i>Glyphoglossus molossus</i>) in Northeastern Thailand		
AUTHOR	Thanade Nonsrirach		
ADVISORS	Assistant Professor Professor Komsorn Lauprasert , Ph.D. Associate Professor Vallaya Sutthikhum , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2019

ABSTRACT

The truncate- snouted burrowing frog, *Glyphoglossus molossus* (Family Microhylidae) is an economically important amphibian of Thailand, especially in northeastern part of the country. This frog is categorized as near treated species by IUCN due to over exploitation, it is a popular species that are affected of over harvesting for food and sale by Thai local people as well as distributed to other areas throughout Thailand, effected to their genetic diversity. In this study, the morphological variation and genetic diversity of *G. molossus* in northeastern Thailand. The genetic diversity were examined using partial sequences of mitochondrial 16S rRNA and Cyt-b gene from specimens representing eight localities. The sequence analysis revealed the presence of nine haplotypes, six unique haplotype, two of which are shared by two or more populations and highest frequency haplotype distributed by the Phu Phan mountain. The relatively low haplotype and nucleotide diversities ($h = 0.718$, $\pi = 0.00464$) indicated that the Phu Phan Mountain Range is not high enough for being an effective geographic barrier between Sakon Nakhon and Khorat Basins. However, AMOVA and phylogenetic analyses based on Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) strongly supported two genetically divergent clades, Sakon Nakhon Basin and upper part of Khorat Basin (clade A) and lower part of Khorat Basin (clade B) , within *G. molossus* candidate populations in the Khorat Plateau. These two lineages are separated by topographical distance, -resulting in reduction in gene flow. The

results show that morphological variation of Thai *G. molossus* related to the changing of latitude degree. *G. molossus* from different latitude exhibit statistically significant difference ($p < 0.05$) in Head and Tibia lengths. In addition, Principal component analysis (PCA) of *G. molossus*'s morphology also indicated that *G. molossus* could be separated along the latitudinal line.

Keyword : *Glyphoglossus molossus*, Genetic Diversity, morphology variation, Northeastern Thailand



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยงบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผศ.ดร.คมศร เล่าห์ประเสริฐ ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วัลยา จูวัฒน์ สำนายการ กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อัญชลี เออาผล ประธานกรรมการสอบ รศ.ดร.ไพโรจน์ ประมวล กรรมการสอบ และดร.ศักดิ์บวร ตุ่มปีสุวรรณ กรรมการสอบ

ขอขอบคุณนายพนมเทียน นาควิจิตร ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด จังหวัดลำพูน อาจารย์ ดร. ชัยวุฒิ กรุดพันธ์ นายอิทธิพล คนโท นายวาศิ ใจหาญ และนายภิรมย์ ผางจันทร์ดา ที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ต่างๆ ขอขอบคุณนางสาวศิริพร ยอดทอง นางสาวศิรินภา ผางจันทร์ดา และนางสาวปริยานุช ใจหาญ ที่ช่วยแนะนำการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ช่วยเหลือและอนุเคราะห์สถานที่ปฏิบัติการวิจัยครั้งนี้

ท้ายที่สุดนี้ ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและญาติพี่น้อง ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาและให้การสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

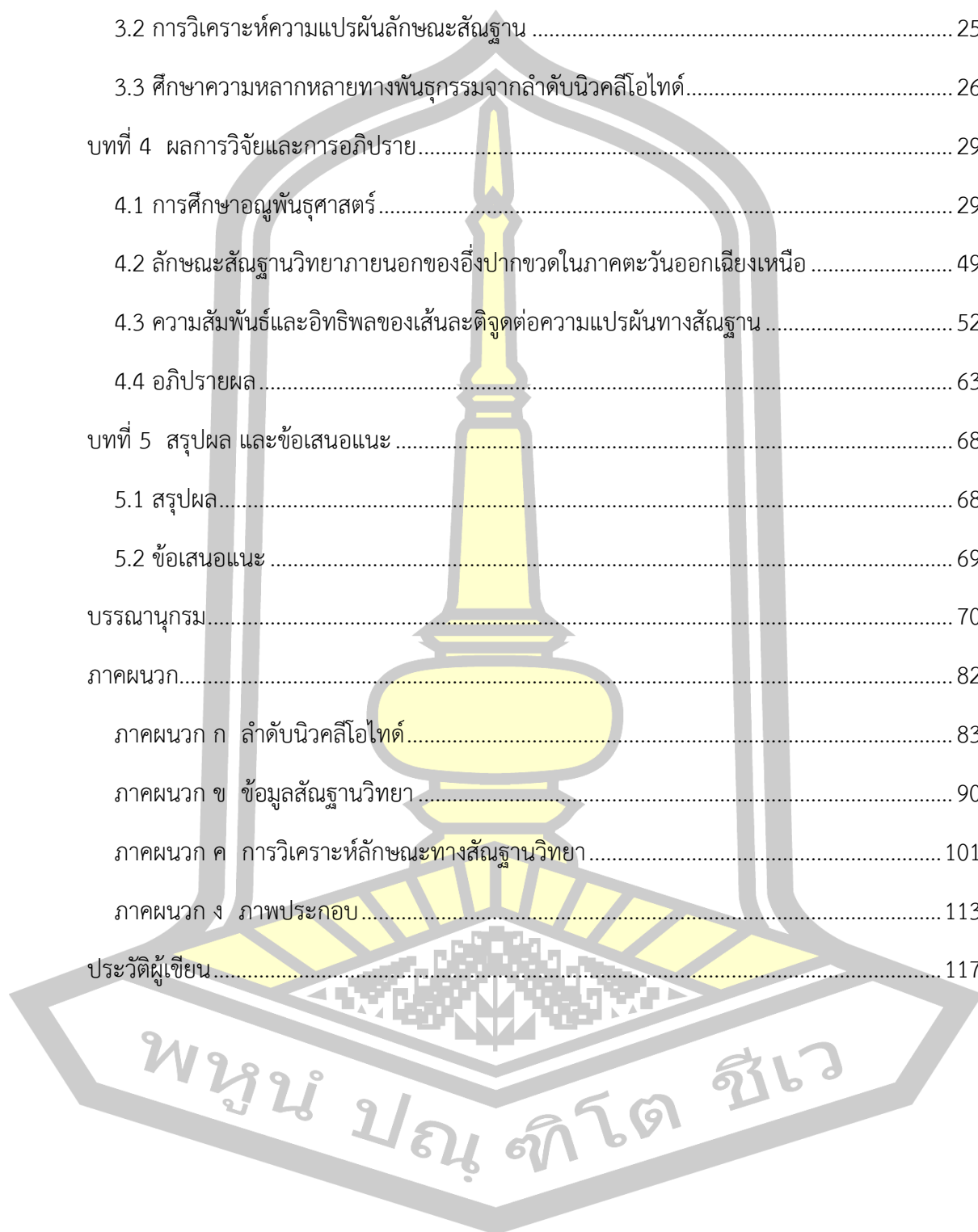
ธเนศ นนท์ศรีราช



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฌ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 หลักการและเหตุผล.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้.....	3
1.6 ระยะเวลาการทำวิจัย.....	4
บทที่ 2 ปรีทัศน์เอกสารข้อมูล.....	5
2.1 อนุกรมวิธานของอึ่งปากขวด.....	5
2.2 ชีววิทยาของอึ่งปากขวด (<i>Glyphoglossus molossus</i>).....	6
2.3 การแพร่กระจายของอึ่งปากขวดในประเทศไทย.....	8
2.4 สถานภาพและการจัดการอึ่งปากขวด.....	8
2.5 การศึกษาด้านอนุกรมวิธานของอึ่งปากขวด.....	9
2.6 เทคนิคในการตรวจสอบดีเอ็นเอ (DNA identification).....	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	23

3.1 การเก็บรวบรวมข้อมูล	23
3.2 การวิเคราะห์ความแปรผันลักษณะสัญญาณ	25
3.3 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์.....	26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย.....	29
4.1 การศึกษาอนุพันธุศาสตร์.....	29
4.2 ลักษณะสัญญาณวิทยายาภายนอกของอึ่งปากขวดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	49
4.3 ความสัมพันธ์และอิทธิพลของเส้นละติจูดต่อความแปรผันทางสัญญาณ	52
4.4 อภิปรายผล.....	63
บทที่ 5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ	68
5.1 สรุปผล.....	68
5.2 ข้อเสนอแนะ	69
บรรณานุกรม.....	70
ภาคผนวก.....	82
ภาคผนวก ก ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	83
ภาคผนวก ข ข้อมูลสัญญาณวิทยา.....	90
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ลักษณะทางสัญญาณวิทยา.....	101
ภาคผนวก ง ภาพประกอบ.....	113
ประวัติผู้เขียน.....	117



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 รายละเอียดกิจกรรมและระยะเวลาดำเนินงาน	4
ตาราง 2 พื้นที่เก็บตัวอย่าง 14 พื้นที่ในประเทศไทย	24
ตาราง 3 ความถี่ของแฮพโลไทป์ (Haplotype frequency) ในประชากรอึ่งปากขวด.....	33
ตาราง 4 ความหลากหลายของแฮพโลไทป์และความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRND.....	35
ตาราง 5 ความหลากหลายของแฮพโลไทป์และความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome b.....	36
ตาราง 6 ค่า genetic distance (%) ระหว่างประชากรอึ่งปากขวด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	43
ตาราง 7 ค่า pairwise F_{st} ระหว่างประชากรอึ่งปากขวด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	44
ตาราง 8 ค่า Analysis of molecular variance (AMOVA) ของประชากรอึ่งปากขวด	46
ตาราง 9 ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากร	47
ตาราง 10 ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาอึ่งปากขวด	51
ตาราง 11 ค่าทางสัณฐานวิทยาของลักษณะที่ศึกษาในอึ่งปากขวดในประเทศไทย	54
ตาราง 12 ค่าความสัมพันธ์ของค่าทดสอบสถิติต่อสัณฐานวิทยา.....	55

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 สัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวด.....	5
ภาพ 2 Partial karyotypes ของอึ่งปากขวด.....	15
ภาพ 3 Micrographs illustrating karyotypes ของอึ่งปากขวด	15
ภาพ 4 ลักษณะตัวแปรการวัดสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวด.....	25
ภาพ 5 แผนที่บริเวณเก็บตัวอย่างบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.....	30
ภาพ 6 สัดส่วนความถี่ของแฮพโลไทป์ ในประชากรอึ่งปากขวด	34
ภาพ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตัวอย่าง (N) และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (h) ของยีน Cytochrome b.....	37
ภาพ 8 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแฮพโลไทป์ด้วยวิธี Median-joining network ของยีน Cytochrome b.....	39
ภาพ 9 สายสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการต้นไม้ของยีน 16S rRNA	40
ภาพ 10 สายสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการต้นไม้ของยีน Cytochrome b.....	41
ภาพ 11 ค่า mismatch distribution ของประชากรอึ่งปากขวดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	48
ภาพ 12 กราฟ PCA แสดงลักษณะทางสัณฐานของอึ่งปากขวดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	50
ภาพ 13 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ SVL เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด.....	57
ภาพ 14 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ HW เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด.....	57
ภาพ 15 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ HL เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด	58
ภาพ 16 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ IND เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด	58
ภาพ 17 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ TL เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด.....	59
ภาพ 18 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ FL เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด.....	59
ภาพ 19 กราฟ PCA แสดงลักษณะทางสัณฐานของอึ่งปากขวดในประเทศไทย	61
ภาพ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในรอบปีและแนวละติจูด ประจำปี พ.ศ. 2559	62

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

การล่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเพื่อบริโภคในประเทศไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม (วีรยุทธ์ เลาหะจินดา, 2552) โดยเฉพาะอึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) ซึ่งไม่ได้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 จึงมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูง เนื่องจากชาวบ้านในท้องถิ่นนิยมจับมาเพื่อจำหน่ายและบริโภคเป็นอาหารในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก จากการสำรวจพบว่าวงจรชีวิตอึ่งปากขวดจะดำรงชีพใต้พื้นดิน ซึ่งจะออกมาผสมพันธุ์ในช่วงคืนฝนตกหนักครั้งแรกของปีบนพื้นดินเท่านั้น (ธัญญา จันอาจ, 2546) ชาวบ้านมักจับอึ่งปากขวดในฤดูกาลผสมพันธุ์ โดยไม่ได้คำนึงถึงอายุ และจำนวนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เกิดการค้าขายในช่วงเวลาสั้น ๆ สร้างรายได้สูงแก่ชาวบ้าน พ่อค้าและร้านอาหาร ทำให้อึ่งปากขวดที่พร้อมผสมพันธุ์มีแนวโน้มลดลง (วิเชษฐ คนชื่อ, 2553) นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ไม่เหมาะสม ผนวกกับพื้นที่อาศัยที่เป็นป่าธรรมชาติถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นพื้นที่เกษตรกรรม เกิดผลกระทบต่อความชุกชุมของอึ่งปากขวดในธรรมชาติ อีกทั้งยังมีศัตรูตามธรรมชาติคอยล่าเป็นอาหาร ทำให้ประชากรอึ่งปากขวดถูกคุกคาม นอกจากนี้การเพาะพันธุ์ก็ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก ในขณะนี้มีเพียงศูนย์วิจัยและการประมงน้ำจืดลำพูนและพะเยาได้ทดลองเพาะพันธุ์และอนุบาลปล่อยกลับสู่ธรรมชาติและสนับสนุนให้เลี้ยงเป็นสัตว์เศรษฐกิจ (Nakvijit, 2011; Soonthornvipat & Soonthornvipat, 2011) การค้าขายแบบขนส่งเสี่ยงต่อการหลุดโดยไม่ตั้งใจและสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงในปัจจุบันส่งผลกระทบต่อปริมาณอึ่งปากขวดและเกิดการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำให้เกิดช่องว่างและขาดข้อมูลทางด้านชีววิทยา ที่เป็นปัจจัยหลักที่เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอนุรักษ์ จึงจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและรูปแบบการกระจายตัวของประชากรอึ่งปากขวด จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิคออร์โฟเมตริกเชิงเรขาคณิต (Geometric morphometric) พบว่ามีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาระหว่างประชากรอึ่งปากขวดในประเทศไทย (Laojumpon, Suteethorn, & Komsorn Lauprasert, 2012) มีความเป็นไปได้ในการเกิดสปีชีส์เชิงซ้อน (species complex) ซึ่งมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึง ไม่สามารถแยกชนิดจากข้อมูลสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้ จึงต้องอาศัยเทคนิคการตรวจสอบอนุพันธุศาสตร์เพื่อช่วยสนับสนุนข้อมูลโครงสร้างสารพันธุกรรมของอึ่งปากขวดในแต่ละพื้นที่ ทำความเข้าใจรูปแบบการกระจาย ขอบเขตการกระจาย

ตลอดจนกลไกที่มีอิทธิพลต่อการกระจายของอึ่งปากขวดในประเทศไทย เพื่อช่วยในการวางแผนการจัดการและการอนุรักษ์ประชากรอึ่งปากขวดได้อย่างยั่งยืน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของอึ่งปากขวดในบริเวณพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทป์ (DNA sequencing) จากไมโทคอนเดรีย ในส่วนของยีน 16S rRNA และยีนไซโตโครมบี (Cytochrome b)

1.2.2 เพื่อศึกษาความแปรผันทางสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ต่ออิทธิพลต่อสภาพแวดล้อม

1.2.3 เพื่อให้ทราบถึงจำนวนประชากรย่อยและการกระจายตัว (Distribution) ของประชากรอึ่งปากขวดในบริเวณพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาอึ่งปากขวดด้วยเทคนิคมอร์โฟเมตริกเชิงเรขาคณิต (geometric morphometric) พบว่ามีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของกะโหลกในประชากรอึ่งปากขวดในประเทศไทย (Laojumpon et al., 2012) ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการเกิดสปีชีส์เชิงซ้อน (species complex) หรือจำแนกได้เป็น 2 ชนิด อย่างไรก็ตามเพื่อความชัดเจนควรจะต้องมีการศึกษาข้อมูลด้านโมเลกุลและหาความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของอึ่งปากขวดในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเก็บจากพื้นที่ธรรมชาติซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของอึ่งปากขวดเพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลจากการศึกษามอร์โฟเมตริกเชิงเรขาคณิตก่อนหน้านี้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยครั้งนี้

การศึกษาครั้งนี้จะทำให้ได้ข้อมูลด้านความหลากหลายทางด้านพันธุกรรม หากความสัมพันธ์ต่อถิ่นที่อยู่อาศัย เพื่อเป็นฐานข้อมูลและลดข้อผิดพลาดในการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน ต่อยอดไปสู่การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อแนวทางและแผนการจัดการสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในการอนุรักษ์และพัฒนาไปเป็นสัตว์เศรษฐกิจอย่างยั่งยืนต่อไป



1.6 ระยะเวลาการทำวิจัย

ตาราง 1 รายละเอียดกิจกรรมและระยะเวลาดำเนินงาน

ขั้นตอนการดำเนินงาน	เดือน												เป้าหมาย		
	2556	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8		9	
สำรวจเก็บข้อมูลพื้นที่และรวบรวมตัวอย่างในประเทศไทย															ได้ตัวอย่างสิ่งปฏิกูลครอบครัวคนในพื้นที่ประเทศไทย
ศึกษาลักษณะถิ่นฐานและสกัด DNA เพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม															ได้รับแบบของ DNA และเครื่องหมายทางพันธุกรรม
วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล															ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม และเครื่องหมายทางพันธุกรรม
จัดทำรายงานผลงานวิจัย															รายงานและตีพิมพ์

บทที่ 2

ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

2.1 อนุกรมวิธานของอึ่งปากขวด

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

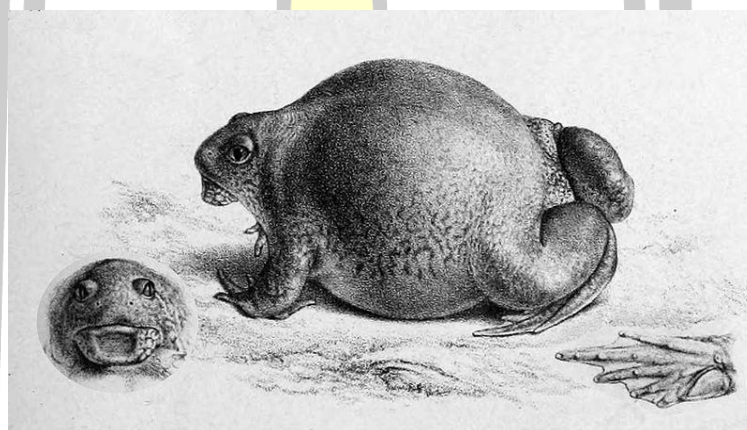
Class: Amphibia

Order: Anura

Family: Microhylidae

Genus: *Glyphoglossus*

Species: *Glyphoglossus molossus* (Günther, 1868)



ที่มา https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Glyphoglossus_molossus.jpg

ภาพ 1 สัตว์ฐานวิทยาของอึ่งปากขวด

ชื่อสามัญ : Truncate-snouted Burrowing Frog, Balloon Frog

ชื่อไทย : อึ่งปากขวด, อึ่งปากกระโถน, อึ่งเพ้า, อึ่งเฝ้า

อึ่งปากขวดอยู่ในสกุล *Glyphoglossus* และอันดับ Anura เป็นกลุ่มหนึ่งที่มีความหลากหลายทางพฤติกรรมและแหล่งอาศัยมาก สามารถอาศัยได้ทั้งบนบกและน้ำจืด มีวงชีวิต 2 รูปแบบ คือ ไข่และวัยแรกเกิดจะอาศัยอยู่ในน้ำ เมื่อตัวเต็มวัยมีพัฒนาขึ้นสู่บก มีขาหลังที่ยาวและพับได้สามารถกระโดดได้ไกล ดวงตามีลักษณะกลมโต หายใจโดยปอดและแลกเปลี่ยนก๊าซทางผิวหนัง ซึ่งต้องมีความชื้นตลอดเวลา มีการตอบสนองที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม และเป็นส่วนหนึ่งในห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศ สามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางระบบนิเวศได้

2.2 ชีววิทยาของอึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*)

อึ่งปากขวดมีลักษณะลำตัวขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าอึ่งชนิดอื่น หัวสั้น ปลายหัวตัดตรง ลำตัวสั้น ขาหน้าสั้นขาหลังยาวพับแนบลำตัว นิ้วตีนหน้าไม่มีพังผืด นิ้วตีนหลังมีแผ่นพังผืดและมีแผ่นสั้นแข็งใต้หลังตีน (shovel-shaped) (ภาพ 1) เพื่อใช้ในการขุดดิน ตามีขนาดเล็ก เปลือกตาหนาที่ยื่นโปนออกมา ปากอยู่มุมด้านล่างขนาดแคบมากและปากสั้นคล้ายปากขวด สีของลำตัวออกน้ำตาลอมเทาหรือสีดำ ท้องมีสีขาวหรือครีม ตามลำตัวมีจุดสีน้ำตาล ขาวกระจายอยู่

การดำรงชีวิตส่วนใหญ่อยู่ใต้ดิน กินสัตว์หน้าดินขนาดเล็กเป็นอาหาร เช่น มด ปลวก การผสมพันธุ์และวางไข่เริ่มในช่วงฝนแรกประมาณเดือนพฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน เริ่มวันที่ฝนตกหนักครั้งแรก ผสมพันธุ์และวางไข่ในช่วงเวลากลางคืนตามแหล่งน้ำขังชั่วคราว วงจรของอึ่งปากขวดมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานตามการเจริญเติบโต การผสมพันธุ์ส่วนใหญ่จะวางไข่ในน้ำหรือที่มีความชื้นมาก ตัวอ่อนไม่มีขาและใช้เหงือกในการหายใจ สุดท้ายจะมีการพัฒนาแขนขาและปอดเพื่อให้สามารถขึ้นมาดำรงชีวิตบนบกได้ ตัวเต็มวัยน้ำหนักประมาณ 30-97 กรัม ความยาวลำตัวประมาณ 40-85 มิลลิเมตร (Nakvijit, 2011)

2.2.1 ระบบนิเวศ

2.2.1.1 การขุดโพรง

การขุดโพรงของอึ่งปากขวดเป็นพฤติกรรมของตัวเต็มวัยและอาศัยอยู่บนบกแล้ว ขาหลังมีการพัฒนาแผ่นหลังตีนให้แข็งแรงและใหญ่เพื่อใช้ในการขุดโพรง ในการขุดจะถอยหลังลงไปบนดินลงไปทั้งตัวในบริเวณที่ดินร่วนซุย ใต้ต้นไม้ บริเวณที่มีเศษใบไม้หรือรากไม้ปกคลุมเป็นจำนวนมาก ช่วงชีวิตของอึ่งปากขวดส่วนใหญ่จะอยู่ในดินอาศัยกินมด ปลวก จะออกมาบนผิวดินในช่วงเวลาสั้นในฤดูผสมพันธุ์หลังฝนตกเท่านั้น (ธัญญา จันอาจ, 2546)

2.1.1.2 การป้องกันตัว

ลักษณะทางสัณฐานของอึ่งปากขวดไม่ได้ออกแบบมาเพื่อการต่อสู้ การป้องกันตัวจึงเป็นการข่มขู่สัตว์ที่จะเป็นอันตรายโดยการสูบอากาศเข้าปอด พองตัวให้มีขนาดใหญ่ ยืนด้วยขาหน้า เพื่อทำให้อูคูเหมือนว่ามีขนาดใหญ่ขึ้น

2.1.1.3 การเจริญเติบโตและวงจรชีวิต (life cycle)

พฤติกรรมอึ่งปากขวดจะเกี่ยวข้องกับสภาวะแวดล้อม เช่น ปริมาณน้ำฝนในการวางไข่และช่วงเวลาที่เหมาะสม รวมทั้งอุณหภูมิที่เกิดขึ้นในช่วงเวลากลางคืนซึ่งหากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมอึ่งจะฝังตัวอยู่ในดิน (วิเชษฐ คุนชื้อ, 2553) และเริ่มผสมพันธุ์เมื่ออายุ 2 ปี

การผสมพันธุ์จะเริ่มขึ้นหลังจากฝนตกหนักครั้งแรกของปีเวลาประมาณ 24.00-04.00 นาฬิกา โดยตัวผู้จะร้องเรียกตัวเมียเพื่อทำการจับคู่ เมื่อทำการจับคู่แล้วจะวางไข่ในน้ำโดยตัวผู้จะใช้ขาหน้ากอดหลังตัวเมียในลักษณะขี่หลัง จากนั้นตัวเมียจะปล่อยไข่และตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อแล้วใช้ขาหลังพัดไข่ออกไปเป็นแพลอยบนผิวน้ำ ไข่ของอึ่งปากขวดมีลักษณะกลมเล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 3.14 ± 0.07 มิลลิเมตร สีเทาหรือน้ำตาลเข้ม มีขี้หน่อหุ้มและมีเมือกหรือสารเหนียวบนผิวไข่เพื่อให้ไข่ยึดจับติดกันเป็นกลุ่ม ใช้เวลาในการฟักประมาณ 24 ชั่วโมง ลูกอ๊อดแรกฟักมีความยาวเฉลี่ย 3.26 ± 0.03 มิลลิเมตร

ระยะตัวอ่อนมีสีดำปนเหลือง ลักษณะลำตัวยาว หางแบนยาวในลักษณะตั้ง มีครีบสำหรับว่ายน้ำ และเหงือกสำหรับหายใจ พัฒนาขาขึ้นบริเวณตำแหน่งใต้เหงือก ต่อมาขนาดขากรรไกรที่ใหญ่ขึ้น เหงือกมีการลดรูปหายไป ตา ลิ้นและขาพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว ในระยะตัวอ่อนใช้ระยะเวลาประมาณ 36 ถึง 38 วัน พฤติกรรมการกินส่วนใหญ่จะกินพืชและสาหร่าย และบางชนิดจะกินตัวอ่อนของสัตว์ชนิดอื่น โดยจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ลอยอยู่บนผิวน้ำ จากการศึกษการพัฒนาตัวอ่อนระหว่างช่วงเวลาและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานเป็นดังนี้ (Nakvijit, 2011)

- อายุ 1 วัน ตัวกลม ไม่มีจุดสี มีขี้เหงือก ลำตัวสั้น หางยาว
- อายุ 12 วัน ลำตัวกลม ท้องมีสีขาว มีการพัฒนาปากอยู่ด้านล่างของหัว
- อายุ 17-20 วัน มีขาหลังได้โคนหาง จุดสีกระจายทั่วตัวและมีแถบสีดำพาดกลางแผ่นหลังไปถึงหาง
- อายุ 24-26 วัน มีขาหน้าได้คาง ส่วนหัวมีการเปลี่ยนรูปร่างออกจากลำตัว
- อายุ 30-32 วัน ขางอกครบสี่ขาสมบูรณ์ ว่ายน้ำลอยตัวที่ผิวน้ำ
- อายุ 33-35 วัน หางเริ่มหด ที่หลังมีลาย
- อายุ 36-38 วัน มีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย มีสีขา ไม่มีหาง

2.3 การแพร่กระจายของอิงปากขวดในประเทศไทย

อิงปากขวดพบแพร่กระจายบริเวณประเทศกัมพูชา ลาว พม่า เวียดนามและในประเทศไทย พบแพร่กระจายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนบน สังเกตเห็นได้ง่ายในช่วงฤดูผสมพันธุ์หรือฤดูฝน ส่วนในช่วงฤดูอื่นๆ จะอาศัยหลบซ่อนในซอกโพรงในดิน (ธัญญา จันอาจ, 2546)

รูปแบบการกระจายตัวของอิงขึ้นอยู่กับพืชพันธุ์ ภูมิศาสตร์ ฤดูกาล และปริมาณของฝน (Khonsue & Thirakhupt, 2001) นอกจากนี้ยังมีความชื้นและอุณหภูมิส่งผลต่อพฤติกรรมและการปรับตัว (วรรณวิภา คงเจริญ และจารุจินต์ นกิตะภัก, 2550) แหล่งที่อยู่อาศัยของอิงปากขวดพบทั้งในบริเวณที่ใกล้แหล่งน้ำลำธาร ซึ่งการกระจายตัวมีความสัมพันธ์กับความกว้างของลำธาร (Phochayavanich, Thirakhupt, & Voris, 2008) และพบบนภูเขาสูงที่ห่างไกลจากความชื้นอาศัยเพียงน้ำค้างหลังฝนตกในการผสมพันธุ์ สามารถอยู่ได้ในป่าหลากหลายรูปแบบทั้งป่าชื้น ป่าเขตร้อน หรือทุ่งหญ้า ปัจจุบันยังขาดข้อมูลงานวิจัยเกี่ยวกับการกระจายตัวของอิงปากขวดอยู่มาก จึงควรเร่งทำการศึกษาอย่างเร่งด่วน (Thy & Eastoe, 2010)

2.4 สถานภาพและการจัดการอิงปากขวด

อิงปากขวดไม่ได้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 สำหรับสถานภาพเพื่อการอนุรักษ์ แต่มีสถานภาพเป็นสัตว์ป่าใกล้ถูกคุกคามและถูกใช้เป็นตัวเศรษฐกิจมากขึ้น ต่อมาสหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ หรือ The International Union for Conservation of Nature (IUCN) จึงได้ประกาศ "ปีแห่งกบ" ในปี พ.ศ. 2551 และได้จัดอิงปากขวดให้อยู่ในกลุ่มเสี่ยงที่มีผลกระทบจากการโดนคุกคาม (Red list threats) เพื่อให้เกิดการกระตุ้นให้มีการอนุรักษ์และการใช้ทรัพยากรสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอย่างมีคุณค่า

ปัจจุบันอิงปากขวดมีจำนวนลดลงเป็นอย่างมากอันเนื่องมาจากหลายปัจจัยสำคัญได้แก่ การใช้ทรัพยากรทางชีวภาพของมนุษย์ มีการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ป่าเพื่อไปทำการเกษตรส่งผลโดยตรงต่อแหล่งที่อยู่อาศัย การใช้สารเคมีส่งผลทางอ้อมต่อการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ (Phochayavanich et al., 2008) และการล่าเพื่อใช้เป็นอาหารและการค้าส่งออกส่งผลต่อการลดลงอย่างรวดเร็ว (Allen, Smith, & Darwall, 2012) ซึ่งในขณะนี้มีการค้าเพื่อส่งออกนอกประเทศผ่านทางชายแดนไทย-กัมพูชาเป็นจำนวนมากโดยมีพ่อค้าคนกลางมารับซื้อจากเกษตรกรในท้องถิ่น (Thy & Eastoe, 2010) เพื่อส่งขายไปที่ฮ่องกงและเวียดนาม ในประเทศไทยเองก็ได้รับความนิยมนอกจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือเป็นอย่างมาก จากการค้าในแต่ละปีเกิดขึ้นในช่วงที่ฝนตกหนักครั้ง

แรกของปี จึงมีปริมาณความต้องการที่สูงมาก พบว่าอึ่งอ่างหลังขีด (*Kaloula mediolineata*), อึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra*) และอึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) กำลังลดลงอย่างต่อเนื่อง (Anurukpongson, 2010) ทั้งนี้ยังพบว่าคนไทยส่วนมากนิยมบริโภคอึ่งปากขวดตัวเมียที่มีไข่ เกิดการขัดขวางการผสมพันธุ์ตามฤดูกาลผนวกกับพฤติกรรมการผสมพันธุ์ปีละครั้ง นอกจากนี้สภาพแวดล้อมและป่าตามธรรมชาติ ถูกคุกคามอย่างหนักจากการขยายตัวของเมืองและมนุษย์ ส่งผลต่อการซื้อขายที่สะดวก ผนวกกับการส่งออกและการนำเข้าของสัตว์กลุ่มนี้ยังส่งผลต่อการเกิดโรคระบาดของเชื้อราบาทราคโคโคเทรียม เดนโดบาทีดิส (*Batrachochytrium dendrobatidis*) ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคไคทริดีโอไมโคซิส (Chytridiomycosis) ส่งผลต่อตัวเต็มวัยของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Anura ตายอย่างเฉียบพลัน (Sommanustweechai et al., 2010)

ในประเทศไทยได้การสนับสนุนการเพาะเลี้ยง พัฒนาเป็นสัตว์เศรษฐกิจ และบางพื้นที่ เช่น ลำพูน ได้ออกกฎหมายห้ามล่า เพื่อกันเป็นพื้นที่การอนุรักษ์ ในขณะนี้สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง ได้ทำการศึกษาวิจัยและจัดให้มีการฝึกอบรมให้ความรู้แก่เกษตรกรเพื่อพัฒนาเป็นสัตว์เลี้ยงเพื่อบริโภค รวมทั้งพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงต่างๆ เช่น การใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ช่วยให้แม่พันธุ์ตกไข่พร้อมกัน กระตุ้นการวางไข่ มีการวางไข่ 100 เปอร์เซ็นต์ (Nakvijit, 2011) และการทดลองเลี้ยงในความหนาแน่นระดับต่างกันพบว่าความหนาแน่น 2,000 ตัวต่อตารางเมตร มีความเหมาะสมต่อการอนุบาล การเพาะเลี้ยงเป็นฟาร์มอีกด้วย (Soonthornvipat & Soonthornvipat, 2011)

2.5 การศึกษาด้านอนุกรมวิธานของอึ่งปากขวด

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นอีกกลุ่มที่ประสบความสำเร็จทางวิวัฒนาการเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถปรับตัวให้ดำรงชีวิตได้ทั้งในน้ำและบนบก จากการที่มีแหล่งอาศัยแตกต่างกันและมีความหลากหลายสายพันธุ์ ทำให้การจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธานต้องใช้ข้อมูลจำนวนมากในการระบุชนิดแต่ละชนิด เพื่อบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogeny tree)

การจัดจำแนกของสิ่งมีชีวิตมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เริ่มต้นจากการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยพิจารณาลักษณะภายนอก ต่อมามีการศึกษาลักษณะธรรมชาติ พฤติกรรมและระบบนิเวศ และได้มีการพัฒนาการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและการมีบรรพบุรุษร่วมกัน (phylogenetic system) นอกจากนี้ยังอาศัยลักษณะทางชีวเคมี จำนวนโครโมโซม รวมทั้งสภาวะแวดล้อมและซากดึกดำบรรพ์ มาเป็นเกณฑ์ประกอบการพิจารณาอีกด้วย

2.5.1 การศึกษาทางด้านลักษณะสัณฐานวิทยาของอิงปากขวด

2.5.1.1 การจัดจำแนกกลุ่มประชากรด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในปัจจุบัน จำแนกจากรูปร่างโครงสร้าง ขนาด และรูปแบบที่แตกต่างกัน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างด้านลักษณะสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางสัณฐานวิทยากับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมในแหล่งอาศัย ทำให้เข้าใจรูปแบบพื้นฐานของความหลากหลายสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Liedtke Maiditsch, I., Ng'wava, J., 2011)

การศึกษาส่วนใหญ่อาศัยการจำแนกจากรูปร่างที่มีความแตกต่างกันมาก แต่บางสายพันธุ์มีลักษณะคล้ายกันมาก ซึ่งอาจแยกออกเป็น 2 ประชากร จากสภาพแวดล้อมที่มีความแตกต่างกันหรือความซับซ้อนและความหลากหลายของภูมิประเทศ ส่งผลให้สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน ทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันมีการเปลี่ยนแปลง เช่น การแยกหรือการเชื่อมต่อกันของภูเขาในประเทศเวียดนามส่งผลให้เกิดการแยกกันของชนิด *Polypedates leucomystax* เป็นชนิดเชิงซ้อน (species complex) (Ngo, 2008) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสัตว์ (Tryjanowski, Sparks, Rybacki, & Berger, 2006) และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในช่วงการพัฒนาจากตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัยส่งผลต่อรูปร่างสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไป (Leary, Fox, Shepard, & Garcia, 2005) จากการสำรวจงานวิจัยในการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อศึกษาความแตกต่างของประชากรในแต่ละท้องถิ่นยังมีน้อยมากอาจส่งผลต่อข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานที่ผิดพลาดได้

การจัดจำแนกและระบุกลุ่มประชากรด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นการศึกษาเกี่ยวกับความแปรผันและการเปรียบเทียบรูปแบบ (form) ขนาด (size) และรูปร่าง (shape) (อนันต์ เคนท้าว และพรพิมล เจียรนัยปริเปรม, 2553) ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการศึกษาทางชีววิทยา เพื่อทำความเข้าใจความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตและมีความสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อม ซึ่งได้มีการพัฒนารูปแบบในการศึกษาโดยใช้วิธีการทางสถิติที่อาศัยข้อมูลเชิงปริมาณมาช่วย เรียกว่า morphometric เป็นการศึกษาวัดเชิงปริมาณและการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่าง หาความคล้ายคลึงและความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในรูปร่างและขนาดตามทฤษฎีสถิติ วิธีการนี้ถูกใช้รวมกับการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปรเชิงปริมาณเช่น ความยาว ความกว้างและความสูง จากการใช้ตัวแปรอิสระหาความสำคัญทางทฤษฎี เช่น มวลน้ำหนัก พื้นที่หน้าตัด อย่างไรก็ตามการวัดเหล่านี้มีข้อจำกัดที่สำคัญคือไม่สามารถอธิบายการกระจายเชิงพื้นที่ของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของสิ่งมีชีวิตได้อย่างชัดเจน จึงได้มีการนำองค์ความรู้ด้านพิกัดเรขาคณิตของรูปร่างเข้ามาประยุกต์ด้วยเรียกว่าการศึกษามอร์โฟเมตริกเชิงเรขาคณิต

(geometrics morphometric) เป็นการกำหนดจุดบนสิ่งมีชีวิตทางชีวภาพและระบุพิกัด (x, y, z) หรือตำแหน่งทางกายวิภาคที่ไม่ต่อเนื่องที่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างต่อการกระจายตัวของพื้นที่ หาความสัมพันธ์ทางนิเวศวิทยาและวิวัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงในทางภูมิศาสตร์ได้ ซึ่งสามารถเปลี่ยนข้อมูลตัวเลขให้เป็นรูปร่างได้

ในปัจจุบันการศึกษาทางด้านลักษณะสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดในประเทศไทย มีดังนี้ Danaisawat, Pradatsundarasan, & Khonsue (2010) ศึกษาลักษณะโครงสร้างปากลูกอืดอึ่งปากขวด พบว่าปากอยู่ปลายสุดของหัวและเปิดออกทางด้านหน้า ไม่มีตุ่มหนังรอบช่องปาก ไม่มีซี่ฟันและจะงอยปาก ริมฝีปากบนนูนขึ้นเป็นขอบโค้งตื้นๆ และริมฝีปากล่างนูนขึ้นเป็นขอบคล้ายอักษรภาษาอังกฤษตัว U

Laojumpon et al. (2012) ได้ศึกษาความแปรผันทางสัณฐานวิทยากับที่อยู่อาศัยและสภาพแวดล้อมในพื้นที่ต่างกัน โดยใช้เทคนิคมอร์โฟเมตริกเชิงเรขาคณิต จากการศึกษาในภาคเหนือภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาระหว่างประชากรอึ่งปากขวดในประเทศไทย จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างกลุ่มประชากรจาก 3 ภูมิภาค โดยพบว่าภาคเหนือและภาคกลางมีความแตกต่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาก ในขณะที่ภาคเหนือและภาคกลางมีความแตกต่างน้อย ซึ่งเป็นผลมาจากลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่มีเทือกเขาขวางกั้น รวมทั้งปัจจัยของปริมาณน้ำฝนและความชื้นที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับขนาดร่างกาย โดยรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงอาจมาจากอุปสรรคทางภูมิศาสตร์ที่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยสภาพภูมิอากาศ

2.5.1.2 ความแปรผันทางภูมิศาสตร์ (geographic variation)

สิ่งมีชีวิตในธรรมชาติมีรูปแบบการกระจายที่หลากหลาย เนื่องจากความหลากหลายทางภูมิศาสตร์ซึ่งส่งผลให้เกิดสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ชีวภูมิศาสตร์ (biogeography) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อรูปแบบการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตเพื่อตอบสนองการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม (Liedtke Maiditsch, I., Ng'wava, J., 2011) การกระจายของสายพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ซึ่งสัมพันธ์กับภูมิอากาศ ส่งผลต่อการแพร่หลายของพืชและสัตว์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไป (Khonsue & Thirakhupt, 2001; Leary et al., 2005; Tryjanowski et al., 2006) ละติจูด (latitude) และระดับความสูง เป็นปัจจัยที่สำคัญซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต ทฤษฎีที่ได้รับความสนใจมากทฤษฎีหนึ่งคือ Bergmann's rule ซึ่งกล่าวถึงแนวโน้มของขนาดร่างกายที่เพิ่มขึ้นตามระดับความสูงในกลุ่มของสัตว์ที่มีอุณหภูมิในร่างกายคงที่ (endotherms) โดยมีสมมุติฐานว่าขนาดของร่างกายจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อการปรับตัวในภูมิอากาศหนาวเย็น เนื่องจากต้องการผลิตความร้อนในร่างกายให้น้อยลงและรักษาอุณหภูมิร่างกายให้สูงกว่าอุณหภูมิสิ่งแวดล้อม (พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและนก) (Meiri & Dayan,

2003) อย่างไรก็ตามพบว่ามีการนำทฤษฎีนี้ไปใช้อธิบายในสัตว์ที่มีอุณหภูมิร่างกายแปรผันตามอุณหภูมิสิ่งแวดล้อม ซึ่งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางกลุ่ม (ectotherms) พบว่ามีบางชนิดที่มีขนาดร่างกายใหญ่ขึ้นเมื่อภูมิอากาศหนาวเย็นลง (Feng, Chen, Hu, & Jiang, 2015) และสามารถนำมาอธิบายการปรับตัวเพื่อลดการสร้างความร้อนให้น้อยลง และรักษาอุณหภูมิในร่างกายให้อยู่รอด ในภูมิอากาศที่หนาวเย็นตามฤดูกาลที่กินระยะเวลายาวนาน เช่น การจำศีลเพื่อการเก็บพลังงานที่มากขึ้น (Ashton, 2001)

อึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) จัดเป็นพวก ectotherms ที่ไม่สามารถผลิตความร้อนภายในร่างกายให้เพียงพอที่จะรักษาอุณหภูมิของร่างกายคงที่ได้ ทำให้ร่างกายต้องเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิไปตามอุณหภูมิของสภาพแวดล้อม ด้วยเหตุนี้ความแตกต่างของภูมิศาสตร์ตามเส้นละติจูดที่เปลี่ยนแปลงไปจึงน่าจะมีอิทธิพลโดยตรงต่ออึ่งปากขวดในด้านต่างๆ เช่น อุณหภูมิที่ต่ำทำให้กิจกรรมลดลง (Ryser, 1996) รวมทั้งวงจรชีวิตมีผลต่อระยะเวลาการพักไข่ การเปลี่ยนแปลงลักษณะตัวอ่อน และการเลือกเพศ (Leary et al., 2005; Miaud, Guyetant, & Elmerberg, 1999) ความแปรผันทางภูมิศาสตร์ จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการกำหนดรูปแบบการกระจายตัว โครงสร้างประชากร หรืออาจรวมถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ช่วยอธิบายรูปแบบการกระจายตัวของอึ่งปากขวด และช่วยในการวางแผนจัดการพื้นที่สำหรับการใช้ประโยชน์อึ่งชนิดนี้อย่างยั่งยืน

2.5.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและเทคนิคระดับโมเลกุล

การระบุชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันได้รับการพัฒนาขึ้นเรื่อยๆ เพื่อความชัดเจนในการจัดจำแนกอนุกรมวิธาน ซึ่งการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร เป็นอีกทางที่มีความสำคัญมากขึ้น จากเดิมที่อาศัยการศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอกเพียงอย่างเดียว ในบางกรณีสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายกันมากจนไม่สามารถแยกชนิด

ปัญหาสำคัญในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานคือ ชนิดเชิงซ้อน (species complex) หรือชนิดที่ซ่อนเร้น (cryptic species) ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวในการจำแนก เช่น สิ่งมีชีวิตที่มีการจัดกลุ่มเป็นชนิดเดียวทั้งที่มีการแพร่กระจายทั่วทุกภูมิภาคทั้งที่จริงอาจเกิดการแตกแขนงของสปีชีส์ จากปัญหานี้สามารถตรวจสอบได้จากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เพื่อหาความแตกต่างในระดับยีน ซึ่งอาจแยกเป็นชนิดใหม่จากเดิมที่เป็นชนิดเดียวกันได้ (Bickford et al., 2006) ยกตัวอย่างเช่น Tanaka-Ueno, Matsui, Chen, Takenaka, & Ota (1998) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลโดยเทคนิค DNA sequence จากยีนไมโทคอนเดรียไซโตโครมบี ของสกุล *Rana* หรือ brown frog ในไต้หวันและประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมใน *R. longicrus* และ *R. japonica* ต่อมาการศึกษาแพร่หลายในทวีปยุโรป (Palo &

Merilä, 2003) ใช้เทคนิค RFLP ศึกษาถิ่นไมโทคอนเดรียไซโตโครมบีของ *R. arvalis* และ *R. temporaria* และงานวิจัยของ Patrelle et al. (2010) ใช้เทคนิค PCR-RFLP จากยีน ITS2 ของสายพันธุ์ *Pelophylax lessonae* และ *P. ridibundus* พบว่ามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแตกต่างกัน Babik et al. (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ mtDNA ของสายพันธุ์ *R. Arvalis* จากเทือกเขา Carpathians ในทวีปยุโรปพบว่ามี ความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสายพันธุ์ Kurabayashi et al. (2011) ศึกษาถิ่นนิวเคลียสและไมโทคอนเดรียของวงศ์ Microhylinae ในเอเชีย โดยใช้เทคนิค DNA sequence พบว่าเกิดสปีชีส์เชิงซ้อน ในสกุล *Phrynella* จากงานวิจัยที่ยกตัวอย่างเป็นรูปแบบการเกิดสปีชีส์ใหม่ที่เป็นผลมาจากการแบ่งแยกทางภูมิศาสตร์ เช่น แม่น้ำ ภูเขา ทะเลทราย ส่งผลต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variability) และเกิดแนวกันของยีนโฟลว (gene flow) เพิ่มโอกาสสำหรับการแบ่งแยกทางพันธุกรรมได้ อย่างไรก็ตามการกระจายตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกก็ไม่ได้ขึ้นกับลักษณะทางภูมิศาสตร์เสมอไป ซึ่งอาจมาจากความสำเร็จในการวิวัฒนาการ และการปรับตัวให้มีการแพร่กระจายและสามารถดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น Pfeiler & Markow (2008) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยเทคนิค DNA sequence จากยีนไมโทคอนเดรียและ 12S rRNA พบว่าสายพันธุ์ *Rana pipiens complex* ในประเทศซีเรียมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *R. magnaocularis* ในประเทศเม็กซิโกซึ่งเป็นหลักฐานสำคัญเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ไม่มีผลจากการแบ่งแยกทางภูมิศาสตร์

การศึกษาอนุพันธุศาสตร์สามารถอธิบายโครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอความคล้ายคลึงหรือแยกจากกันของชนิดพันธุ์และประชากรจากการที่มีการเปลี่ยนแปลงภูมิศาสตร์และการกระจายตัวได้ เหมาะสำหรับการศึกษาของสิ่งมีชีวิตที่มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิด (Bowsher, 2000) สามารถประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น ด้านการอนุรักษ์ การปรับปรุงพันธุ์ และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยระบุได้จากเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (บังอร แฉวโนนงิ้ว อภิเดช แสงดี และสัณญา สุภจันทร์, 2549)

2.5.2.1 การศึกษาคาร์ิโอไทป์ (karyotype)

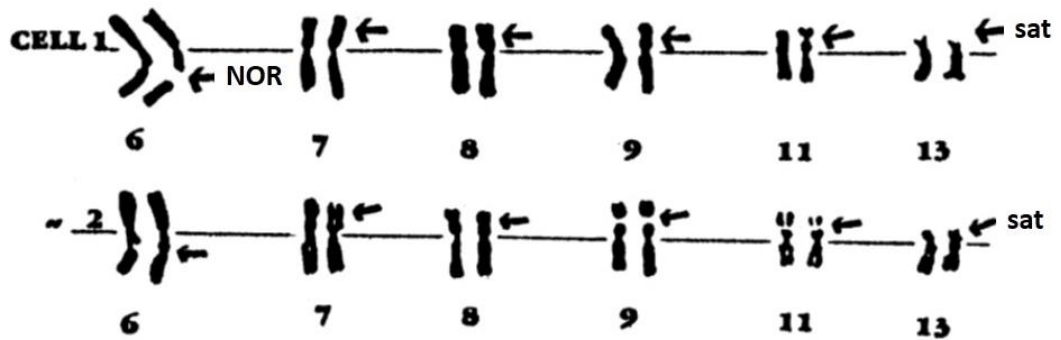
ปัจจุบันได้มีการนำความรู้ด้านพันธุศาสตร์ของเซลล์ โดยเฉพาะเครื่องหมายของโครโมโซม มาช่วยศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และเป็นประโยชน์ด้านเซลล์อนุกรมวิธาน (ธวัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รังษิรุจิ, 2548) นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลสำคัญในการคัดเลือกพันธุ์และการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณภาพมากขึ้น

การศึกษาโครโมโซม เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนก และช่วยในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ ซึ่งสามารถศึกษาได้หลายวิธี เช่น การเตรียมโครโมโซมโดยตรงบนแผ่นสไลด์ (Directly chromosome preparation) การเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง (*In vitro* cell หรือ tissue culture) การถ่ายภาพโครโมโซมจากกล้องจุลทรรศน์ การวัดขนาดและความยาวของโครโมโซม การทำคาริโอ-ไทป์ (ถาวร สุภาพรม วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร, 2535)

คาริโอไทป์ (karyotype) เป็นการศึกษารายละเอียดของโครโมโซมแต่ละแท่ง โดยการนับจำนวน รูปร่างของโครโมโซมและโครงสร้างต่างๆ ซึ่งศึกษาจากโครโมโซมในระยะเมตาเฟส เพราะโครโมโซมมีขนาดใหญ่ และมีการหดตัว (contraction) มากที่สุด การจัดคาริโอไทป์นิยมจัดเป็นกลุ่มตามชนิดหรือแบบโครโมโซม โดยจัดเรียงคู่โครโมโซมที่มีขนาดยาวที่สุดไปถึงสั้นที่สุด หรือจากโครโมโซมแบบเมตาเซนตริกไปเป็นสับเมตาเซนตริก สับทีโลเซนตริก และอะโครเซนตริก (ทีโลเซนตริก) ตามลำดับ (อนันต์ พุทธิยาสถาพร และธวัช ดอนสกุล, 2544) เพื่อช่วยต่อการสังเกต ช่วยให้เข้าใจวิวัฒนาการ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตที่มีความเกี่ยวข้องกันในสายวิวัฒนาการจะมีความสัมพันธ์กันทางคาริโอไทป์

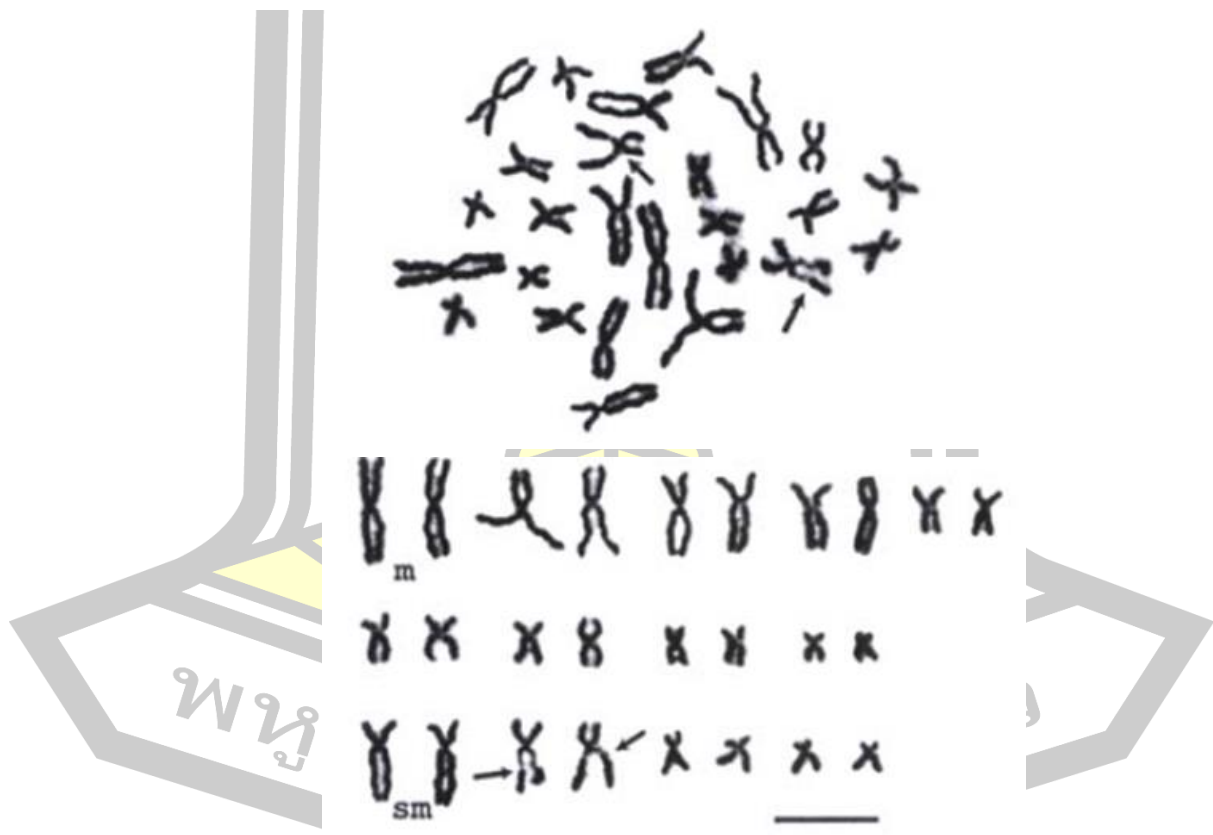
การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของอึ่งปากขวดในไทยยังมีงานวิจัยน้อยมาก จากรายงาน ถาวร สุภาพรม วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร (2535) ได้นับจำนวนโครโมโซมและศึกษาคาร์ิโอไทป์ โดยศึกษาจากเซลล์ไขกระดูก พบโครงสร้างพิเศษ ที่บริเวณแขนยาวใต้เซนโตรเมียร์ (centromere) ของโครโมโซมคู่ที่ 6 โดยมีลักษณะเป็นบริเวณที่สร้างนิวคลีโอลัส (Nucleolar organizer region) (ภาพ 2) สอดคล้องกับการพบโครโมโซมแบบสับเมตาเซนตริกคู่ที่ 2 มีรอยคอดทุติยภูมิที่แขนข้างยาวของโครโมโซม (ธวัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รังษิรุจิ, 2548) ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางโครโมโซม (chromosome marker) ได้ (ภาพ 3) จากการศึกษาพบว่าอึ่งปากขวดมีโครโมโซม $2n = 26$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริก 9 คู่ และสับเมตาเซนตริก 4 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 52 และได้พัฒนาการเตรียมเซลล์จากไขกระดูกเป็นเซลล์ต้นแทน เนื่องจากอึ่งปากขวดมีตัวขนาดใหญ่ช่วยต่อการศึกษา

พูน ปณ ภิโต ชีเว



ทีมา ถาวร สุภาพรม วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร (2535) ลูกศรชี้แสดงลักษณะรอยคอด secondary constriction หรือ nucleolar organizer region (NOR) และลักษณะ small satellite (sat) หรือ knob-like structure บนโครโมโซมคู่ที่ 13

ภาพ 2 Partial karyotypes ของอึ่งปากขวด



ทีมา รัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รังษิรุจิ (2548) Scale bars = 10 μ m, m = metacentric, sm = submetacentric)

ภาพ 3 Micrographs illustrating karyotypes ของอึ่งปากขวด

2.5.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการอธิบายความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจงหรือความเป็นเอกลักษณ์ของลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอบนโครโมโซม นิวเคลียส หรือในออร์แกเนลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย หรือคลอโรพลาสต์ เป็นต้น (Kate-ngam, 2003) เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณที่เท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากทุกเนื้อเยื่อ ทุกระยะการเจริญเติบโตและไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) ซึ่งลำดับเบสของของดีเอ็นเอทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันแต่ละชนิด มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพื่อใช้ในการระบุสายพันธุ์ ความหลากหลาย และการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์และระหว่างกลุ่มประชากร ความสัมพันธ์ทางภูมิศาสตร์และลักษณะประชากรที่แตกต่างกัน (Bowsher, 2000)

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอเหมาะแก่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆและได้รับการพัฒนาและนำมาประยุกต์ใช้เกิดเป็นเทคนิคใหม่ เช่น PCR (Polymerase Chain Reaction) หรือ based markers เช่น RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), PCR-SSR (Simple Sequence Repeat หรือ microsatellites), PCR-SSCP (Single Stranded Confirmation Polymorphisms), PCR-RELP และการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA sequencing) โดยตรงจาก PCR products (สุจิตรา จางตระกูล, 2551) ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแยกออกเป็น 2 ประเภทคือ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

1) เทคนิค PCR-based marker เป็นการศึกษาหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่จำเพาะกับช่วงดีเอ็นเอ โดยต้องทราบลำดับเบสดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนแล้วจึงเริ่มกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction technique)

2) เทคนิคไฮบริไดเซชัน (Hybridization-based marker) เป็นการศึกษาโดยเข้าสู่ของลำดับเบส เป็นคู่ประสมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ นำมาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ และแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส ถ่ายดีเอ็นเอลงสู่แผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ แล้วไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดสารกัมมันตรังสีจะปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายแถบมีลักษณะจำเพาะกับสายพันธุ์

2.5.2.2.1 ความแตกต่างของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism)

หมายถึงลำดับเบสของสายดีเอ็นเอมีความแตกต่างกัน เกิดจากการเรียงตัวของเบส 4 ชนิด บนสายดีเอ็นเอสั้นๆ มีความแตกต่างกัน ซึ่งเบสที่พบทั่วไปในดีเอ็นเอ มี 4 ชนิด คือ ไซโทซีน (Cytosine: C) ไธมีน (Thymine: T) อะดีนีน (Adenine: A) และกัวนีน (Guanine: G) พบได้ในระหว่างสายพันธุ์หรือภายในตัวสิ่งมีชีวิต เกิดได้จากหลายปัจจัยคือ

1) ความผิดพลาดของการจำลองตัวของดีเอ็นเอ โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวเดียว เช่น การเพิ่มหรือหายไปและการแทนที่ของเบสตัวอื่นเพียง 1 ตัว

2) การสอทดแทรกของดีเอ็นเอส่วนมากเกี่ยวข้องกับการกระจายตัวของเบส เกิดขึ้นในกระบวนการรีคอมบิเนชัน (recombination)

3) การขาดหายไปหรือการขยายจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอในกระบวนการรีคอมบิเนชัน เกิดจากการเรียงตัวของลำดับเบสที่เหมือนหรือคล้ายกันทำให้มีการไขว้เปลี่ยนของซิสเตอร์โครมาทิดที่ไม่เท่ากัน เป็นผลให้ชิ้นดีเอ็นเอขาดหายไป หรือขยายจำนวนขึ้น

4) การขยายจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการเลื่อนของเบส เกิดจากเบสแกนขนาดเล็กเรียงตัวกันหลายหน่วยซ้ำๆ จึงเกิดการเลื่อนของเบสทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอได้

การศึกษาความแตกต่างของดีเอ็นเอ ตรวจสอบได้จากเทคนิค RFLP เป็นการศึกษาจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วจำแนกจากขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

2.5.2.2.2 การศึกษาดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA)

ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอจากการถ่ายทอดจากทางแม่ ซึ่งดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย มีรูปร่างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ และมีอัตราการกลายพันธุ์ค่อนข้างสูงในสัตว์ โดยยีนมีการเข้ารหัสโปรตีนที่มีความจำเพาะ และพบว่ามีหลากหลายสูงจากการถ่ายทอดสู่รุ่นลูกบริเวณยีน Displacement loop (D-loop) และยีน cytochrome b (Thongtip et al., 2003) ซึ่งสามารถใช้ศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรม การหาความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ รวมทั้งศึกษาระบบนิเวศ เช่น การกระจายตัวของสิ่งมีชีวิตได้

ยีนไมโทคอนเดรียไซโตโครมบี (cytochrome b) เป็นหนึ่งใน 37 ยีน โดยจะแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะ (Bowsher, 2000) สามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมเนื่องจากมีการกลายพันธุ์สูงและทำหน้าที่ร่วมในการขนส่งอิเล็กตรอนและการสร้าง ATP มีบทบาทสำคัญในเซลล์ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมนิยมตรวจสอบจากยีนไซโตโครม บี ที่อยู่ใน ไมโทคอนเดรียเนื่องจากมีลำดับเบสค่อนข้างอนุรักษ์ สามารถเปรียบเทียบลำดับเบสได้ง่าย และมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิต (Thongtip et al., 2003)

2.6 เทคนิคในการตรวจสอบดีเอ็นเอ (DNA identification)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมและการวิเคราะห์ข้อมูลพันธุศาสตร์เชิงประชากรที่หลากหลายเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมและประยุกต์ให้เข้ากับงานวิจัยเฉพาะทางมากขึ้น ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ ได้แก่

- PCR: Polymerase Chain Reaction
- RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms
- PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms
- RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
- AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphisms
- DNA sequence

2.6.1 เทคนิค PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณปริมาณดีเอ็นเอให้มากขึ้น หรือเรียกว่า *In vitro enzymatic gene amplification* (บังอร แถวโนนจิว อภิเดช แสงดี และสัญญา สุภจันทรา, 2549) โดยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลอง ให้มีปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งอาศัยหลักการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ เป็นเทคนิคพื้นฐานในการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้น หรือไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ และส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA), DNA polymerase, Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), oligonucleotide primers, บัฟเฟอร์ เป็นต้น สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

- 1) ขั้นตอน denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ โดยอาศัยความร้อนสลายพันธะไฮโดรเจนที่ยึดสายดีเอ็นเอ 2 สาย ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 92-95 องศาเซลเซียส
- 2) ขั้นตอน annealing เป็นขั้นตอนที่ทำให้ลำดับเบสเป็นเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กันโดยลดอุณหภูมิลงอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส
- 3) ขั้นตอน extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของไพรเมอร์ ในอุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส

จากการทำสามขั้นตอนนี้เป็นจำนวน 1 รอบ (cycle) ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (DNA Complementary) เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ จะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของทุกๆรอบแบบทวีคูณ ซึ่งเทคนิค PCR สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยทางอณูพันธุกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing)

2.6.2 เทคนิค RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms

RFLP ใช้หลักการในการจำแนกความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกันบริเวณที่จำเพาะ

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีการจำลองดีเอ็นเอและสามารถถ่ายทอดไปสู่เซลล์รุ่นลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิม แต่บางครั้งเกิดลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่เปลี่ยนไป อาจเป็นผลจากการกลายพันธุ์ (mutation) ตามธรรมชาติจากสภาพแวดล้อมหรือจากกระบวนการที่ผิดพลาดของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันส่งผล มีการจัดเรียงตัว การเพิ่มขึ้น (insertion) หรือหายไป (deletion) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) ทำให้ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะเปลี่ยนแปลงไป เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้จำนวน และขนาดของท่อนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของเอนไซม์ เรียกว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ตรวจสอบได้โดยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (Kate-ngam, 2003) ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตและเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน

การศึกษา RFLP เป็นเทคนิคที่ใช้ DNA probe เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดเล็กนำมาทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตเป้าหมายที่เป็นเส้นเดี่ยว นำไปตัดย่อยด้วยเอนไซม์จำเพาะ โดยดีเอ็นเอตรวจสอบจะจับกับสายดีเอ็นเอเป้าหมายตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (DNA hybridization) ตรวจสอบได้จากการทำปฏิกิริยาของสารกัมมันตรังสีบนชิ้นดีเอ็นเอตรวจสอบ จะพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันที่เกิดจากการเข้าคู่ระหว่างชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งเกิดจากมาจากความหลากหลายของตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จุดเด่นของเทคนิค RFLP คือข้อมูลที่ได้ไม่เกี่ยวข้องกับปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม การชมของยีน และการแสดงออกของยีนในระยะต่างๆ (บังอร แถวโนนจิว อภิเดช แสงดี และสัญญา สุภจันทรา, 2549)

การตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RFLP มีขั้นตอนดังนี้ (Kate-ngam, 2003)

- 1) สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ แล้วนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน
- 2) จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอมาแยกออกจากกันโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส
- 3) ถ่ายดีเอ็นเอจากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ลงไปบนแผ่นเมมเบรนฟลเตอร์ที่มีคุณสมบัติจับกับกรดนิวคลีอิก ได้ดีโดยใช้เทคนิค Southern blotting
- 4) นำแผ่นฟลเตอร์มาไฮบริดเชกกับดีเอ็นเอตรวจสอบหรือโพรบจำเพาะ (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลดรังสีบางชนิด เช่น ฟลูออเรสเซนต์
- 5) ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอโพรบที่ใช้ตรวจสอบ

ประโยชน์ของการศึกษา RFLP

- 1) หาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ขึ้นกับการแสดงออกของยีนในระยะใด และไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม
- 2) ศึกษาลักษณะเฉพาะโดยใช้ RFLP ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นมาก การถ่ายทอดยีนที่จำเพาะจากพันธุ์พ่อแม่มายังลูก
- 3) ประโยชน์ด้านการปรับปรุงสายพันธุ์

2.6.3 เทคนิค PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms

PCR-RFLP เป็นเทคนิคการตรวจสอบ RFLP จากผลผลิต PCR โดยไม่ผ่านการทำไฮบริดเชกชัน จึงทำได้รวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นปริมาณน้อย เนื่องจากการทำ RFLP เพียงเทคนิคเดียวมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน ต้องทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ก่อน จึงได้พัฒนาการตรวจพอลิมอร์ฟิซึมด้วยเทคนิค PCR

เริ่มต้นจากใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้น เมื่อจบปฏิกิริยา PCR ในกรณีมีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนดีเอ็นเอภายในชิ้นดีเอ็นเอจะพบว่าดีเอ็นเอจะมีขนาดไม่เท่ากัน และในกรณีขนาดของดีเอ็นเอมีความแตกต่างของเบสภายในเท่ากันจะต้องตรวจสอบโดยนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ กอนนำไปแยกขนาดด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

2.6.4 เทคนิค RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

เทคนิคตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้หลักการคล้ายกับเทคนิค PCR แต่แตกต่างกันที่ใช้ไพเมอร์แบบสุ่ม (บังอร แกลวโนนังว อภิเดช แสงดี และสัญญา สุภจันทรา, 2549) หรือไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากใช้ไพเมอร์ชนิดไม่จำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนม (arbitrary primer) และมีขนาดสั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อให้เกาะกับตำแหน่งบนดีเอ็นเอในจีโนมแบบสุ่ม โดยไพเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศ (5' --> 3') ในลักษณะสุ่มทำให้ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแต่ละครั้งผลไม่เหมือนเดิมและไม่สามารถทำซ้ำได้

อย่างไรก็ตามจากความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ เหมาะสำหรับศึกษาตัวอย่างได้จำนวนมากต่อครั้ง สะดวกรวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อย

2.6.5 เทคนิค AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphisms

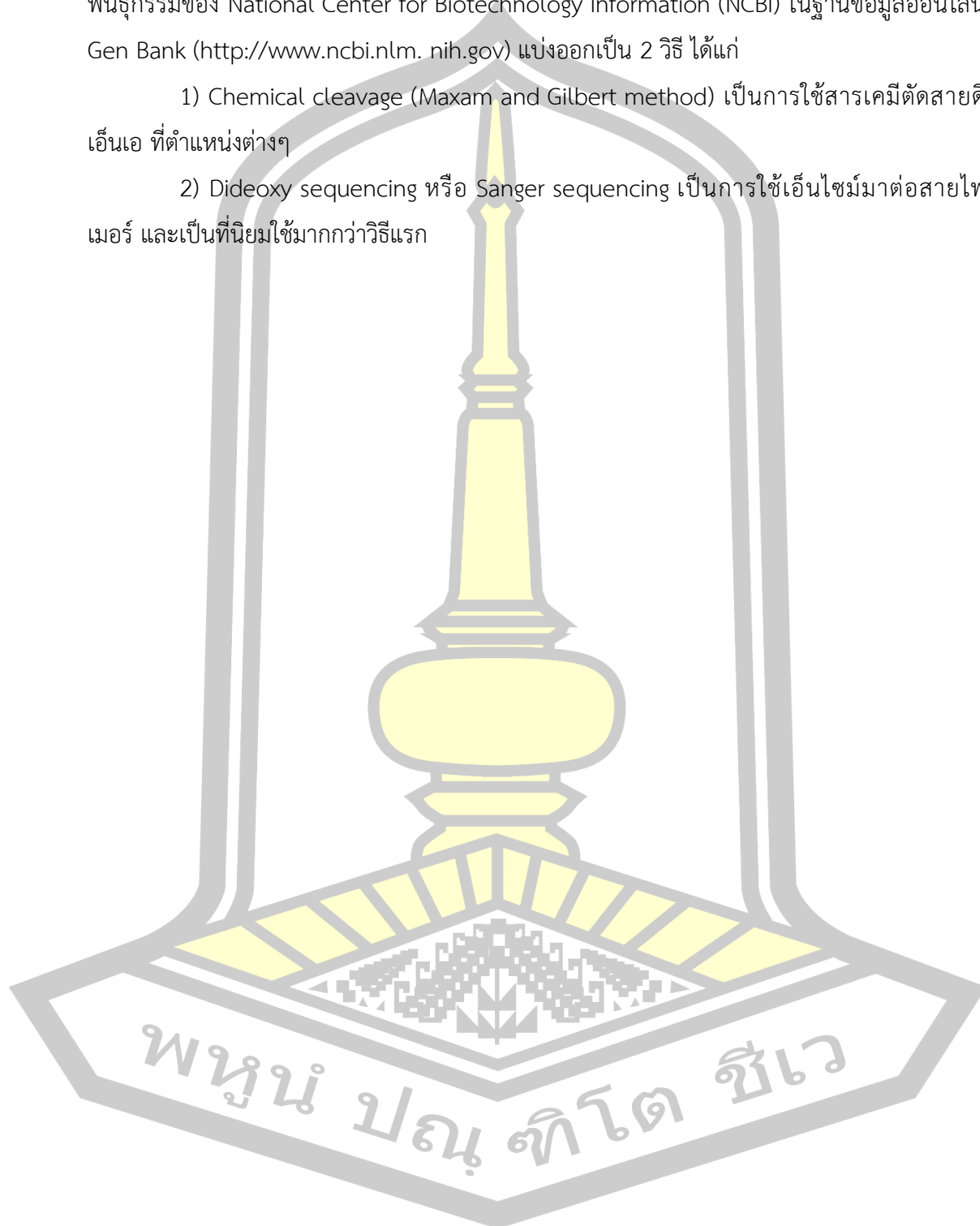
เทคนิค AFLP หรือตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จากนั้นตัดสายดีเอ็นเอโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ แล้วเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอ (adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้นๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ) (บังอร แกลวโนนังว อภิเดช แสงดี และสัญญา สุภจันทรา, 2549) โดยต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์และเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอ ที่ตัดไว้ได้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และเป็นตำแหน่งที่จับของไพเมอร์ (primer) ในการทำเทคนิค PCR โดยใช้ไพเมอร์ที่มีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter และเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วนำไปแยกโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยติดฉลากด้วย probe จะได้ขนาดและจำนวนของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในสัต์แต่ละสายพันธุ์

2.6.6 เทคนิค DNA sequence

เทคนิค DNA sequence ใช้สำหรับการหาลำดับเบสของสายดีเอ็นเอเป็นการถอดรหัสพันธุกรรมจะเริ่มจากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งสามารถนำมาจากส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีน (gene) หรือเป็นส่วนที่ไม่ได้กำหนดการสร้างโปรตีนก็ได้ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และมีการเพิ่มสารเคมี (dideoxynucleotides, ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) เพื่อไปยับยั้งการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งของ base (A, C, G หรือ T) อย่างจำเพาะ แล้วนำไปแยกขนาดในสนามกระแสไฟฟ้าเพื่อหาความสัมพันธ์ของรหัสพันธุกรรมบนสายดีเอ็นเอตามขนาดความยาวของแถบดีเอ็นเอ เป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน สามารถเปรียบเทียบลำดับของเบสของดีเอ็นเอของ

สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน โดยข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปเก็บไว้ที่ฐานข้อมูลออนไลน์ทางพันธุกรรมของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ในฐานข้อมูลออนไลน์ Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) แบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่

- 1) Chemical cleavage (Maxam and Gilbert method) เป็นการใช้สารเคมีตัดสายดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่งต่างๆ
- 2) Dideoxy sequencing หรือ Sanger sequencing เป็นการใช้เอ็นไซม์มาต่อสายไฟเมอร์ และเป็นที่นิยมใช้มากกว่าวิธีแรก



บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บตัวอย่างอึ่งปากขวดและเก็บตามแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติ บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนกรกฎาคม หรือช่วงต้นฝนแรกของปี ตามพื้นที่ที่มีฝนตกหรือมีแหล่งน้ำขังที่เกิดจากฝนตกใหม่ ตามบริเวณพื้นที่ที่มีความชื้น ในเวลากลางคืน โดยใช้ไฟฉายส่องเพื่อให้แสงไฟสะท้อนกับดวงตาของอึ่งเป็นสีแดง ทำให้สังเกตได้ง่ายขึ้น (อนุสรณ์ ปานสุข, 2548) ได้ตัวอย่างทั้งหมด 185 ตัวอย่าง ซึ่งได้นำมาศึกษาข้อมูลพื้นฐานวิทยาเพื่อหาความสัมพันธ์และความแปรผันทางสัณฐาน และสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอึ่งปากขวดทั้งหมด 70 ตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกการุณยฆาต โดยการแช่ใน 3-amino benzoic acid ethyl ester methanesul- fonate salt (MS-222) ระบุหมายเลขภาคสนาม ถ่ายรูป จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ใน 95% Ethanol alcohol เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง และนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการ เก็บข้อมูลปัจจัยทางกายภาพและพิกัดพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ขั้นตอนการดำเนินการดังกล่าวข้างต้นนั้น ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับและส่งเสริมการดำเนินการต่อสัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (คกส. มมส) ใบรับรองหมายเลข 0010/2559

พูน ปณ ทิโต ชีเว



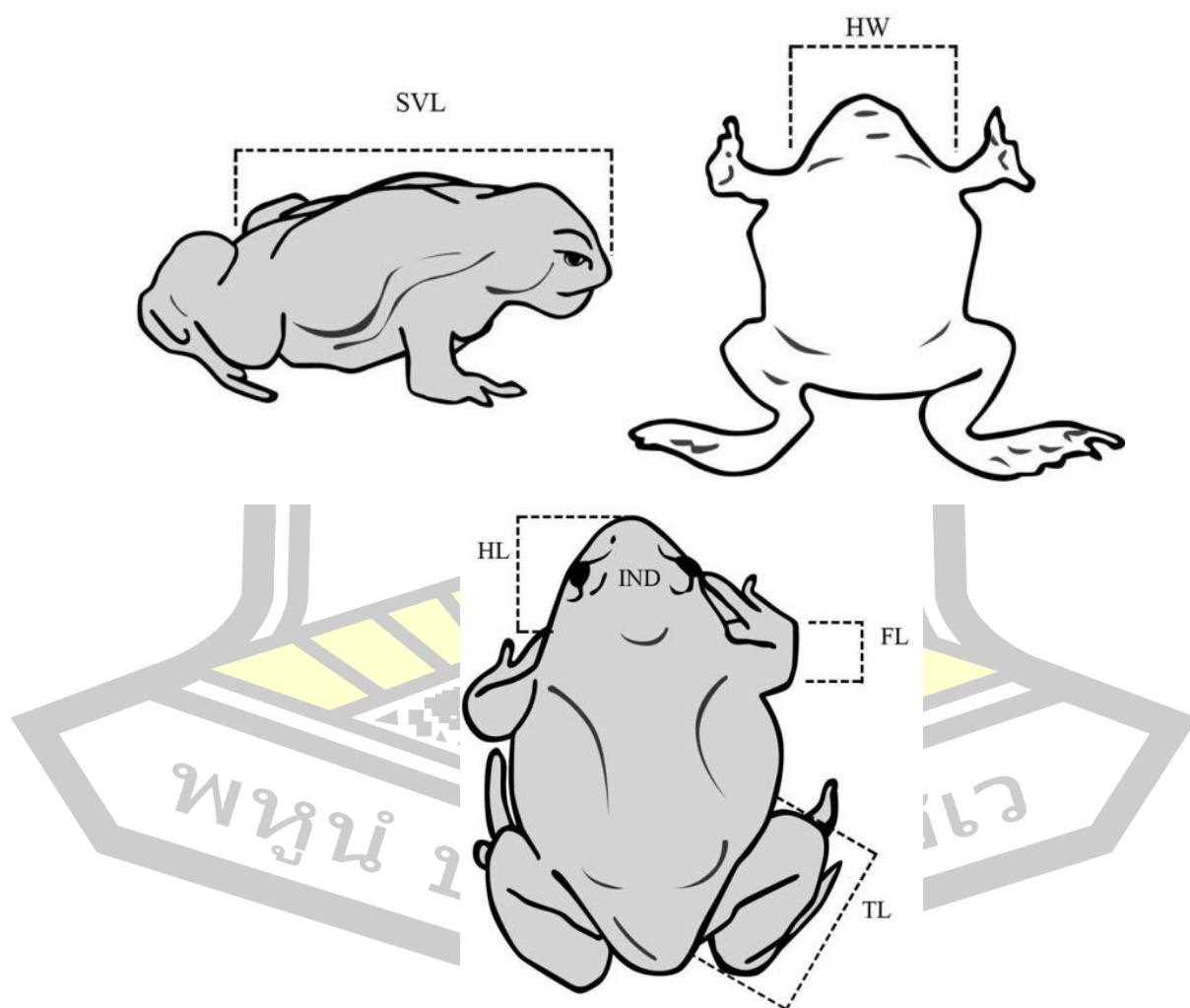
ตาราง 2 พื้นที่เก็บตัวอย่าง 14 พื้นที่ในประเทศไทย

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	Latitude (N)	Longitude (E)	Altitude (m)	จำนวนตัวอย่าง	
				สถานี	อยู่พื้นฐาน
1. ต.ท่าวังทอง อ.เมือง จ.พะเยา (PY)	19°12'01"	99°56'18"	430	17	-
2. ศูนย์วิจัยและพัฒนาน้ำจืดลำพูน (LP)	18°29'46"	99°00'46"	317	13	-
3. จังหวัดสังขะของ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (LA)	18°08'00"	102°31'00"	165	10	-
4. ต.พระพุทธบาท อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย (NK)	17°59'26"	102°24'48"	170	13	-
5. วัดคำประมง อ.พรหมามิคม จ.สกลนคร (PMR 2)	17°22'18"	104°19'09"	200	30	20
6. บ้านตองลาน อ.สามแวง จ.ตาก (TK)	17°17'08"	99°08'28"	165	32	8
7. ภูน้อย อ.ภูพาน จ.สกลนคร (PMR3)	16°58'59"	103°46'33"	488	10	12
8. ห้วยวังปลาตุก อ.คำม่วง จ.กาฬสินธุ์ (PMR1)	16°56'32"	103°44'98"	318	12	5
9. พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติเวียง อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น (KK)	16°40'42"	102°16'01"	236	4	5
10. อ.เมือง จ.กาฬสินธุ์ (KS)	16°26'51"	103°31'47"	160	10	5
11. อ.ชนแดน จ.เพชรบูรณ์ (PB)	16°11'57"	100°50'36"	127	2	-
12. บ้านน้ำจั้น ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม (MK)	16°01'58"	130°17'52"	120	10	9
13. อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี (UB)	15°10'58"	104°52'05"	135	17	6
14. อ.เมือง จ.กาญจนบุรี (KN)	13°59'17"	99°28'37"	36	25	-
รวมตัวอย่างทั้งหมด				185	70

3.2 การวิเคราะห์ความแปรผันลักษณะสัณฐาน

นำตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 185 มาวัดด้วย Venire Caliper ความละเอียด 0.02 มิลลิเมตร บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา 6 ลักษณะสำคัญดังนี้ (Laojumpon et al., 2012) (ภาพที่ 4)

- 1) ความยาวจากปลายปากถึงทวาร (Snout-vent length; SVL)
- 2) ความกว้างหัว (Head width; HW)
- 3) ความยาวหัว (Head length; HL)
- 4) ค่ารูปร่างรูจมูก (Internarial distance; IND)
- 5) ความยาวกระดูกขาคู่หน้า (Forelimb length; FL)
- 6) ความยาวกระดูกขาหลัง (Tibia length; TL)



ภาพ 4 ลักษณะตัวแปรการวัดสัณฐานวิทยาของอิงปากขวด

ข้อมูลขนาดสัณฐานวิทยาถูกนำมาทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences, SPSS เวอร์ชัน 11.5 ดังนี้

- 1) ทดสอบการแจกแจงของข้อมูล โดยใช้สถิติ Shapiro-Wilk test หรือ W test (Shapiro & Wilk, 1965) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- 2) ทดสอบความเป็นเอกพันธ์ของความแปรปรวน (Homogeneity of variance) โดยใช้ Levene's F-Test (Levene, 1960)
- 3) หากข้อมูลมีการแจกแจงที่ไม่ต่างจากการแจกแจงแบบปกติ ($p < 0.05$) และข้อมูลทุกชุดมีความแปรปรวนที่เป็นเอกพันธ์ ($p < 0.05$) ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ในทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย หรือในกรณีที่ข้อมูลไม่เป็นไปตามข้อตกลงเบื้องต้น จะใช้ค่าสถิติของ Brown-Forsythe (Brown & Forsythe, 1974) ซึ่งเป็นสถิติแบบไม่อิงพารามิเตอร์ (non-parametric statistics) ในการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย
- 4) การเปรียบเทียบเชิงพหุคูณ (multiple comparisons) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดทีละคู่พื้นที่ภูมิศาสตร์ โดยใช้การทดสอบแบบ Dunnett's test (Dunnett, 1955) หากชุดข้อมูลแต่ละชุดมีความแปรปรวนไม่เท่ากัน
- 5) การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis; PCA) โดยอาศัยการสร้างสเกลตัวแปรใหม่ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกันกับชุดของตัวแปรหลายตัวที่มีอยู่ โดยอิงความแปรปรวนเดิม และสร้าง PCA Biplot บนระนาบเพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพื้นที่ทางภูมิศาสตร์

3.3 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์

3.3.1 การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ทำสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) จากเนื้อเยื่อหรือตับอึ่งปากขวด ตัดเนื้อเยื่อประมาณ 20 ไมโครกรัม (Palo & Merilä, 2003) นำเนื้อเยื่อมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอแล้วทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) จากไมโตรคอนเดรียในส่วนของยีน Cytochrome b และ 16S rRNA โดยใช้คู่อิมเมอร์ ดังนี้

ยีน Cytochrome b (Matsui et al., 2005)

Forward: L14883: 5'-TCTGCTTAATTGCTCAAATCG C-3'

Reverse: H15548: 5'-AATAGGAAGTAGCACTCTGGTTTAAT3'.

ยีน 16S rRNA (Moriarty & Cannatella, 2004; Yodthong, Siler, Prasankok, & Aowphol, 2014)

Forward: 16SC: 5'- GTRGGCCTAAAAGCAGCCAC-3'

Reverse: 16SD 5'- CTCCGGTCTGAACTC AGATCACGTAG-3'

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสที่ประกอบด้วยส่วนผสมปริมาตร 30 μ l ประกอบด้วย 10XPCR บัฟเฟอร์ ((NH₄)₂SO₄) ปริมาตร 3 μ l, แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5 mM, ไพรมเมอร์ forward และ reverse ความเข้มข้น 1 mM, ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟส (dNTP) ความเข้มข้น 0.2 mM, เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 0.5 Unit โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	} 35 รอบ
	อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที	1 รอบ

จากนั้นนำไปตรวจผลด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปย้อมด้วยสี ethidium bromide แล้วจึงนำไปตรวจสอผลใต้แสง UV และบันทึกผล จากนั้นนำผลผลิตการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสส่งสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Oligonucleotide Synthesis Service) ที่บริษัท Macrogen Inc. สาขาประเทศเกาหลี เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ศึกษาแล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank ของหน่วยบริการ National Center for Biotechnology Information (NCBI); U.S. National Library of Medicine และวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

พหุ ประถมศึกษา

3.3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

1) การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นใช้โปรแกรม Biological Sequence Alignment Editor, BioEdit 7.25 (Hall, 1999) ทำการแก้ไข ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequence editing) และจัดเรียงของมูล (Alignment) โดยใช้รูปแบบ Clustal W

2) การคำนวณค่าความหลากหลายของความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น จำนวน polymorphic sites (S) ความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (haplotype diversity: h) ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity: π) โดยใช้โปรแกรม DNA sp 5.0 (Librado & Rozas, 2009)

3) การวิเคราะห์ความแปรผันระหว่างประชากร (F_{st}) และการทดสอบความแปรปรวนของพันธุกรรมประชากร (AMOVA) เพื่อทดสอบการแยกทางภูมิศาสตร์ของประชากร นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรด้วยสถิติ จำลองการขยายตัวของประชากรในอดีต Tajima D (Tajima, 1989) และสถิติ Fu's F_s (Fu, 1997) และสร้างกราฟจากการทดสอบ mismatch distribution (Rogers & Harpending, 1992) โดยใช้ Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier, Laval, & Schneider, 2005)

4) การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มแฮพโลไทป์ด้วยวิธีการ Median joining network (MJN) ใช้โปรแกรม Network 5.0 (Bandelt, Peter Forster, & Ihl, 1999)

5) วิเคราะห์สายวิวัฒนาการของต้นไม้ที่ (phylogenetic tree) สร้างความสัมพันธ์จากตัวอย่างทั้งหมดและความสัมพันธ์แฮพโลไทป์ โดยการจัดแบบ Maximum Likelihood (ML) ค่าความน่าเชื่อถือ (Bootstrap) 1,000 replications ใช้โมเดล Kimura-2-parameter ใช้โปรแกรม MEGA 6.0 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ Bayesian analysis เพื่อเปรียบเทียบกับ Maximum Likelihood ด้วยวิธีการ Bayesian inference (BI) จากสถิติ Akaike information criterion (AIC) ใช้โปรแกรม Mr. Bayes package 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) โดยใช้โมเดล GTR+I+R เป็นโมเดลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทั้ง 2 ยีน จากการวิเคราะห์จาก JModelTest 2.1.4 (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012) และใช้สปีชีส์ *Kaloula pulchra* เป็น outgroup (Hasan et al., 2014) โดยใช้ข้อมูลจาก Genbank AB530639.1 และ AB819033.1 สำหรับยีน 16S rRNA และ Cytochrome b ตามลำดับ

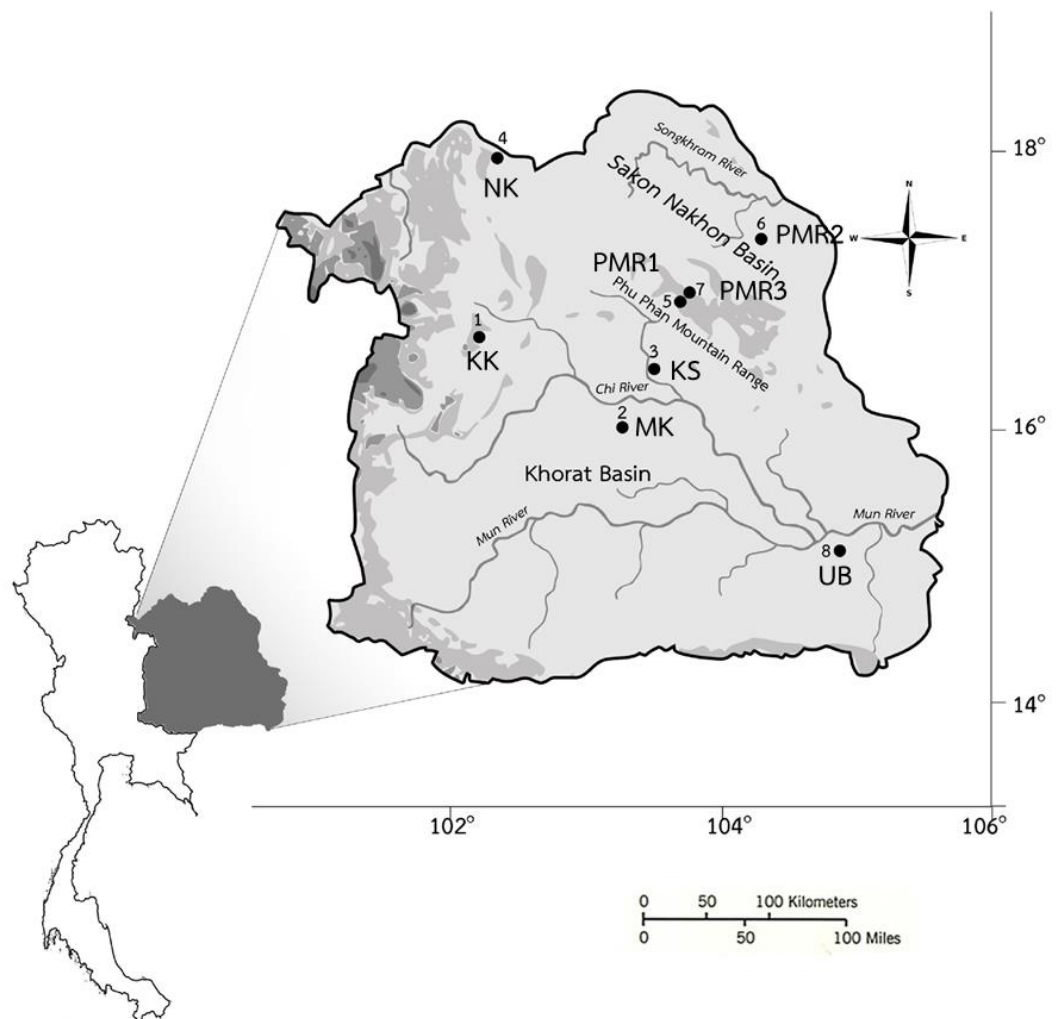
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปราย

4.1 การศึกษาอนุพันธุศาสตร์

จากตัวอย่างประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 8 พื้นที่ เพื่อศึกษาอนุพันธุศาสตร์ทั้งหมด 70 ตัวอย่าง โดยแบ่งพื้นที่ออกเป็น 3 กลุ่มตามสภาพภูมิประเทศ คือ กลุ่มที่ 1 บริเวณพื้นที่ราบตอนบน ประกอบด้วยจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม (MK) หนองคาย (NK) และอำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ (KS) มีระดับความสูง 120 ถึง 236 เมตร ลักษณะพื้นที่ราบทุ่งหญ้า ต้นไม้โปร่ง แหล่งน้ำเป็นลักษณะบ่อน้ำและแหล่งน้ำขังชั่วคราว กลุ่มที่ 2 บริเวณเทือกเขาภูพาน ประกอบด้วยอำเภอคำม่วง จังหวัดกาฬสินธุ์ (PMR1) อำเภอพรรณานิคม (PMR2) และอำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร (PMR3) มีระดับความสูง 200 ถึง 488 เมตร ลักษณะเป็นเทือกเขา พื้นที่เป็นป่าสูง มีใบไม้ปกคลุมพื้นดิน มีลำธารกระแสน้ำไหลแรงช่วงหน้าฝน และแห้งเมื่อหมดช่วงหน้าฝน กลุ่มที่ 3 พื้นที่ราบตอนล่าง ประกอบด้วยจังหวัดอุบลราชธานี (UB) มีระดับความสูง 135 เมตร ลักษณะพื้นที่ราบ ทุ่งหญ้าและมีแหล่งน้ำขังชั่วคราวในช่วงหน้าฝน (ภาพ 5)





ภาพ 5 แผนที่บริเวณเก็บตัวอย่างบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อศึกษาอนุพันธุศาสตร์



4.1.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การศึกษาวិเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยใช้ยีน Cytochrome b ซึ่งมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทป์ 634 เบส จากจำนวนตัวอย่าง 70 ตัวอย่าง และ ยีน 16S rRNA มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทป์ 800 เบส จากจำนวนตัวอย่าง 58 ตัวอย่าง โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทป์ ตำแหน่งยีน Cytochrome b มีตำแหน่ง Polymorphic site (S) จำนวน 18 ตำแหน่ง (ตาราง 5) และเมื่อนำไปวิเคราะห์จัดรูปแบบแฮพลอไทป์ (Haplotype distribution) ปรากฏรูปแบบแฮพลอไทป์ทั้งสิ้นจำนวน 9 แฮพลอไทป์ โดยมีความถี่และการกระจายของแฮพลอไทป์ ในแต่ละประชากรแตกต่างกัน (ตาราง 3) และพบว่ากลุ่มตัวอย่างประชากรอิงปากขวดจาก อำเภอพรรณานิคม จังหวัดสกลนคร (PMR 2) มีจำนวนแฮพลอไทป์ (N_h) มากที่สุดคือ 4 รูปแบบ รองลงมาคือกลุ่มตัวอย่างประชากรจากจังหวัดขอนแก่น (KK) ซึ่งมีจำนวนแฮพลอไทป์ 3 รูปแบบ ส่วนกลุ่มตัวอย่างจากจังหวัดหนองคาย (NK) และอำเภอกุพาน จังหวัดสกลนคร (PMR3) มีจำนวนแฮพลอไทป์น้อยที่สุดเพียง 1 รูปแบบเท่านั้น อย่างไรก็ตาม 2 กลุ่มประชากรนี้มีรูปแบบแฮพลอไทป์ที่แตกต่างกัน (NK มีแฮพลอไทป์ที่ 1 และ PMR3 มีแฮพลอไทป์ที่ 4) จากการวิเคราะห์ความถี่ของแฮพลอไทป์พบว่ารูปแบบแฮพลอไทป์ที่ 4 (H4) มีความถี่สูงและกระจายในตัวอย่างอิงปากขวดถึง 31 ตัวอย่าง จาก 70 ตัวอย่าง (44%) รองลงมาคือรูปแบบแฮพลอไทป์ที่ 1 (H1) พบในตัวอย่างอิงปากขวด 20 ตัวอย่าง (28%) และรูปแบบแฮพลอไทป์ที่พบความถี่น้อยที่สุดคือ รูปแบบแฮพลอไทป์ที่ 5 และ 8 (H5 และ H8) พบเพียงอย่างละ 1 ตัวอย่าง โดยรูปแบบแฮพลอไทป์ที่ H5 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอคำม่วง จังหวัดกาฬสินธุ์ (PMR1) และรูปแบบแฮพลอไทป์ที่ H8 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอพรรณานิคม จังหวัดสกลนคร (PMR 2) ในการศึกษาแฮพลอไทป์จำเพาะ (unique haplotype; N_u) พบจำนวน 6 รูปแบบ คือ แฮพลอไทป์ที่ H2, H5, H6, H7, H8 และ H9 โดยที่กลุ่มประชากรจากอำเภอพรรณานิคม จังหวัดสกลนคร (PMR 2) พบแฮพลอไทป์จำเพาะ 2 รูปแบบ ($N_u=2$) และมีถึง 3 กลุ่มประชากรที่ไม่มีแฮพลอไทป์จำเพาะเลยคือ จังหวัดมหาสารคาม (MK) จังหวัดหนองคาย (NK) และอำเภอกุพาน จังหวัดสกลนคร (PMR3)

นอกจากนี้ความหลากหลายของแฮพลอไทป์ (haplotype diversity, h) เฉลี่ยในประชากรทั้งหมดมีค่า $h = 0.718$ โดยมีค่า h สูงสุดเท่ากับ 0.749 ซึ่งพบในตัวอย่างประชากรจากอำเภอพรรณานิคม จังหวัดสกลนคร (PMR 2) ส่วนค่าความหลากหลายของแฮพลอไทป์ต่ำสุดมีค่า 0.000 พบในกลุ่มตัวอย่างประชากรจากจังหวัดหนองคาย (NK) และ อำเภอกุพาน จังหวัดสกลนคร (PMR3) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการพบรูปแบบแฮพลอไทป์ (Haplotype distribution) ที่มีค่าต่ำสุดในประชากรทั้งคู่ และพบว่าจำนวนตัวอย่างจากประชากรทั้งหมด 70 ตัวอย่าง ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (ภาพ 7) จากข้อมูลพบว่า จังหวัดขอนแก่น (KK) มีจำนวน

ประชากร 5 ตัวอย่างมีค่า $h = 0.700$ ซึ่งสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับอำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร (PMR3) มีจำนวนประชากร 12 ตัวอย่างที่มีปรากฏความหลากหลายในกลุ่มประชากร

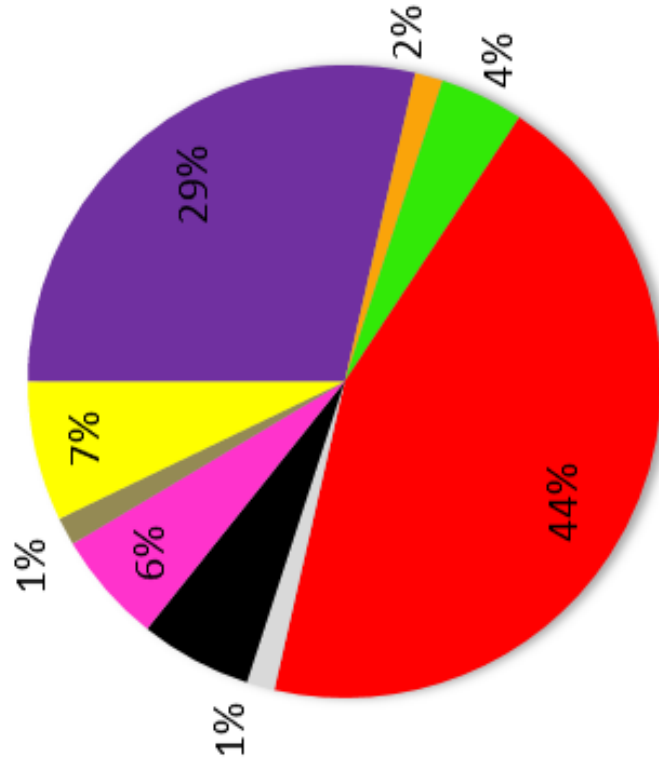
ค่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide diversity, π) เฉลี่ยประชากรทั้งหมดมีค่า $\pi = 0.00464$ โดยมีค่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดเท่ากับ 0.04630 ซึ่งพบในตัวอย่างประชากรจากจังหวัดอุบลราชธานี (UB) และค่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำสุดเท่ากับ 0.00000 ซึ่งพบในตัวอย่างประชากรจากจังหวัดหนองคาย (NK) และ อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร (PMR3)



ตาราง 3 ความถี่ของแฮพโลไทป์ (Haplotype frequency) ในประชากรอึ่งปากขวด

Haplotype	No.	KK	MK	KS	NK	PMR1	PMR2	PMR3	UB
H1	20	3		1	8		8		
H2	1	1							
H3	3	1	2						
H4	31		7		4	7	12		1
H5	1				1				
H6	4			4					
H7	4						4		
H8	1						1		
H9	5								5

-
 H1
-
 H2
-
 H3
-
 H4
-
 H5
-
 H6
-
 H7
-
 H8
-
 H9



ภาพ 6 สัดส่วนความถี่ของแฮชแท็กโซเชียลมีเดียในประเทศไทย ในประชากรอีเจนส์

ตาราง 4 ความหลากหลายของแฮพโทไทป์และความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRND

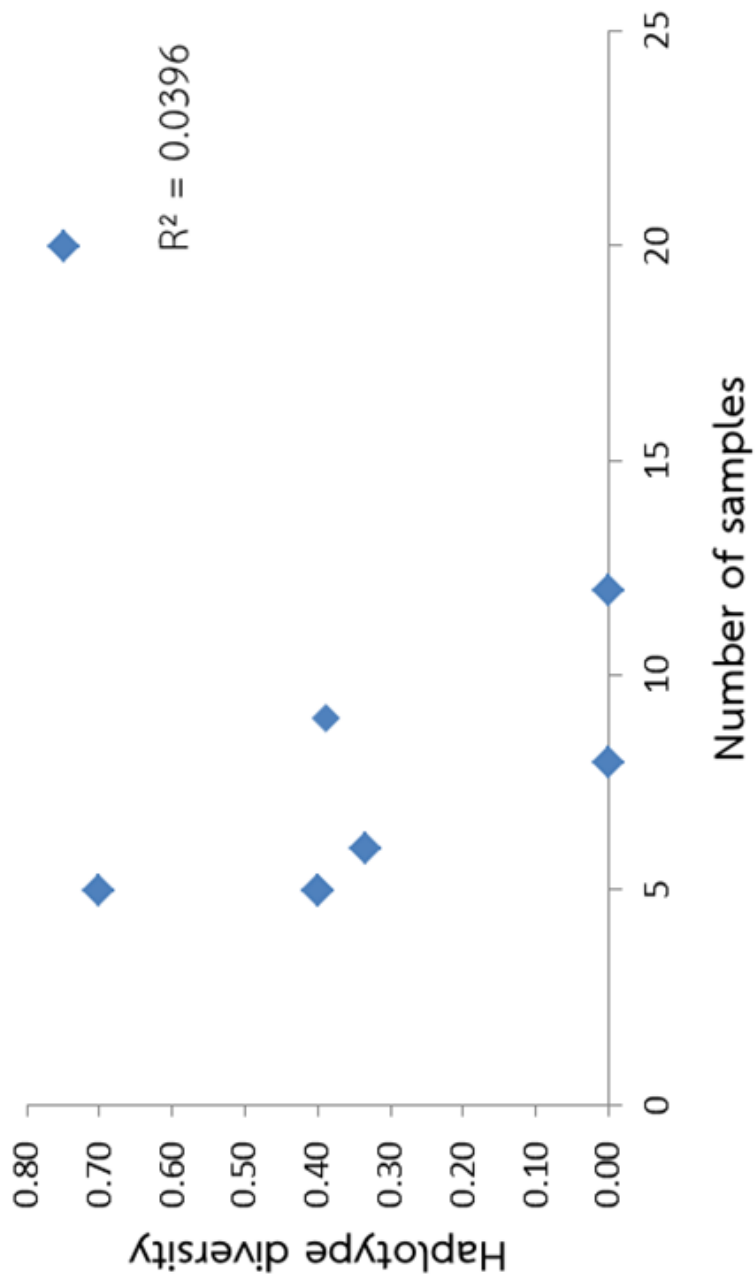
Location	N	N _h	N _u	S	Haplotype distribution	Haplotype diversity (<i>h</i> ± SD)	Nucleotide diversity (<i>π</i> ± SD)
KK	6	3	1	2	H2, H4, H5	0.600 ± 0.215	0.00108 ± 0.000
MK	9	2	1	1	H1, H2	0.500 ± 0.128	0.00063 ± 0.000
KS	5	1	-	-	H2	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.000
NK	8	1	-	-	H4	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.000
PMR1	2	1	-	-	H2	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.000
PMR2	23	10	8	11	H2, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13	0.794 ± 0.077	0.00352 ± 0.000
UB	5	1	1	-	H3	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.000
All	58	19	13	12		0.752 ± 0.042	0.00240 ± 0.000

หมายเหตุ Number of sample (N), Number of haplotype (N_h), Number of unique haplotype (N_u), Number of polymorphic site (S)

ตาราง 5 ความหลากหลายของแฮพโลไทป์และความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome b

Location	N	N _h	N _u	S	Haplotype distribution	Haplotype diversity (h ± SD)	Nucleotide diversity (π ± SD)
KK	5	3	1	6	H1, H2, H3	0.700 ± 0.218	0.00377 ± 0.001
MK	9	2	-	1	H3, H4	0.389 ± 0.164	0.00061 ± 0.000
KS	5	2	1	7	H1, H6	0.400 ± 0.237	0.00440 ± 0.002
NK	8	1	-	-	H1	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.000
PMR1	5	2	1	1	H4, H5	0.400 ± 0.237	0.00063 ± 0.000
PMR2	20	4	2	8	H1, H4, H7, H8	0.749 ± 0.058	0.00409 ± 0.001
PMR3	12	1	-	-	H4	0.000 ± 0.000	0.00000 ± 0.000
UB	6	2	1	9	H4, H9	0.333 ± 0.215	0.04630 ± 0.046
All	70	17	6	18		0.718 ± 0.039	0.00464 ± 0.001

หมายเหตุ Number of sample (N), Number of haplotype (N_h), Number of unique haplotype (N_u), Number of polymorphic site (S)



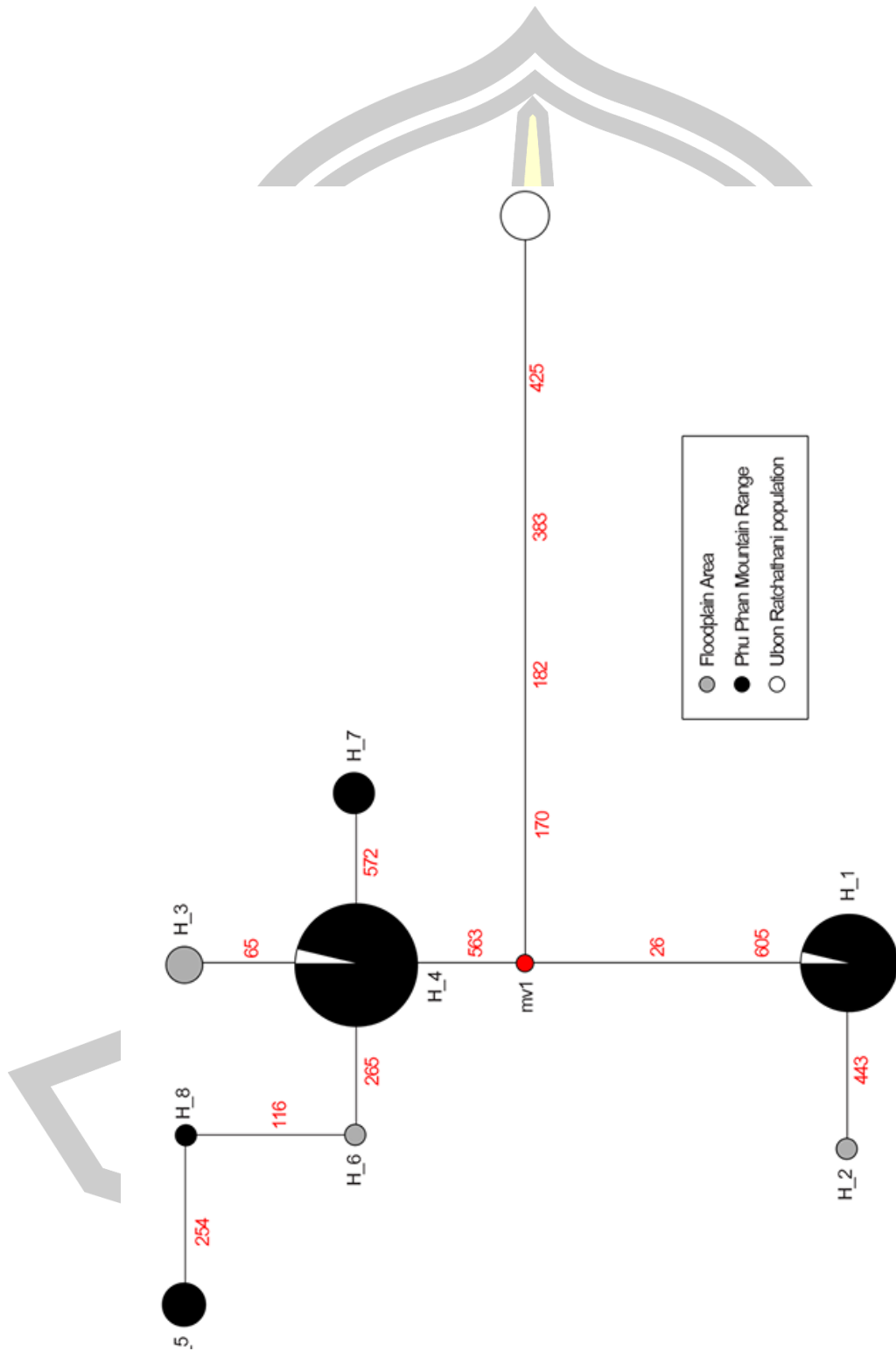
ภาพ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตัวอย่าง (N) และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (h) ของยีน Cytochrome b

4.1.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอึ่งปากขวด

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจากแฮพโลไทป์ ด้วยวิธี Median-joining network (MJ) (ภาพ 8) โดยการจัดกลุ่มทั้งสามกลุ่มดังนี้ 1.พื้นที่ราบตอนบน 2. บริเวณเทือกเขาภูพาน 3.พื้นที่ราบตอนล่าง พบว่าลักษณะสายสัมพันธ์ของแฮพโลไทป์เป็นแบบซับซ้อน (complicated MSN) ไม่พบการแบ่งแยกกลุ่ม หรือไม่มีความสัมพันธ์กับกลุ่มประชากรตามลักษณะภูมิศาสตร์ พบว่ามี 2 แฮพโลไทป์ที่มีความถี่ของ Haplotype distribution ในประชากรมากที่สุด จากทั้งหมด 9 แฮพโลไทป์ (ภาพ 6) โดยแฮพโลไทป์ที่ใหญ่ที่สุดคือแฮพโลไทป์ที่ 4 (H4) มีการกระจายในประชากรมากที่สุด (common haplotype) มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงระหว่างแฮพโลไทป์ที่อื่นสูง และพบประชากรจากทั้งสามกลุ่มที่ได้ทำการแบ่งข้างต้น และแฮพโลไทป์ที่มีความถี่รองลงมาคือแฮพโลไทป์ที่ 1 (H1) มีการกระจาย ซึ่ง 2 แฮพโลไทป์นี้เป็นพื้นที่ราบตอนบนและบริเวณเทือกเขาภูพานที่มีความใกล้ชิด ถึงแม้ว่าแต่ละพื้นที่มีความสูงทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน ในขณะที่แฮพโลไทป์ที่ 9 (H9) ที่มีการแยกสายวิวัฒนาการแบบ long genealogy ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างประชากรจากจังหวัดอุบลราชธานี (UB) หรือพื้นที่ราบตอนล่าง

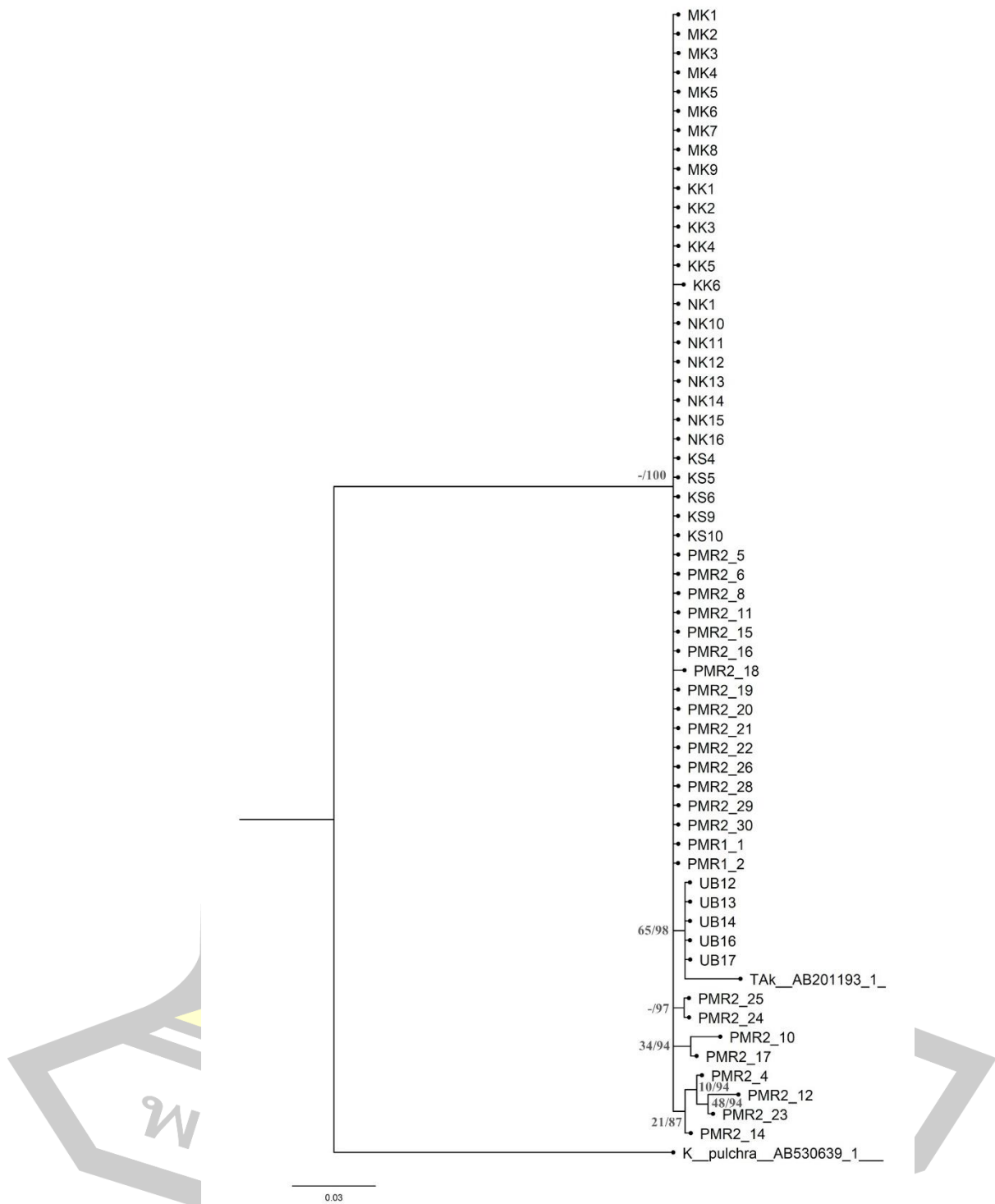
การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการต้นไม้ของยีนของยีน 16S rRNA มีความแปรผันทางพันธุกรรมน้อยทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่แยกกันชัดเจน (ภาพ 9) ในขณะที่ ยีน Cytochrome b แสดงสายวิวัฒนาการแบบ monophyly แยกออกจากกันอย่างน้อยสอง clades ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของอึ่งปากขวด แสดงให้เห็นประชากรในที่ราบสูงโคราช โดย Clade A (Bootstrap: 63% / posterior probability [PP]: 100%) ประกอบด้วย 7 กลุ่มประชากร ได้แก่ KK MK KS NK PMR1 PMR2 และ PMR3 กระจายอยู่ที่แอ่งสกลนครและตอนบนของแอ่งโคราช ในขณะที่ Clade B (Bootstrap: 99% / PP: 100%) จากประชากร UB ซึ่งกระจายอยู่ทั่วส่วนล่างของแอ่งโคราช (ภาพ 10)

พหุบัน ปณ ทิโต ชีเว



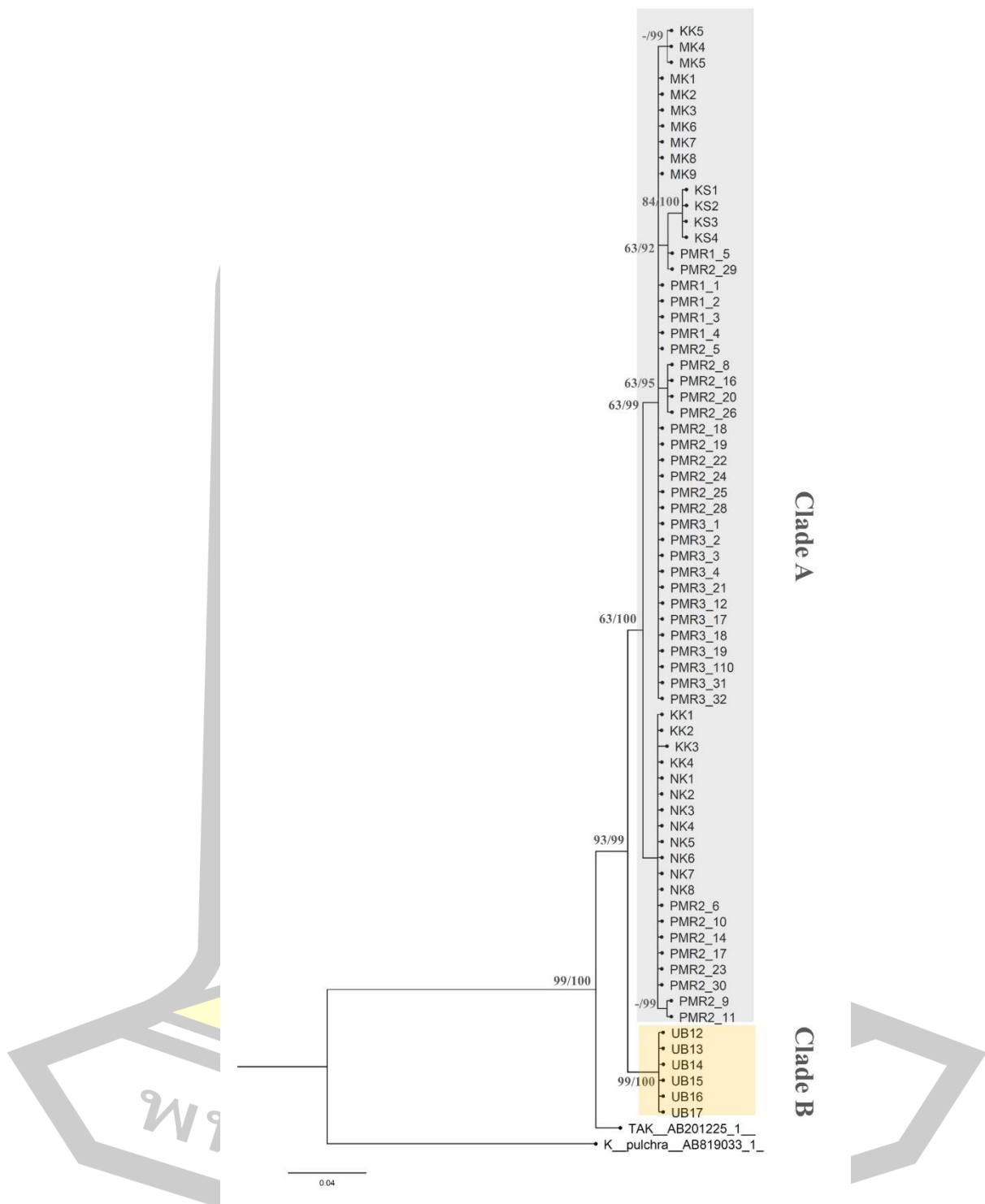
ภาพ 8 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแฮพโทไทป์ด้วยวิธี Median-joining network ของยีน Cytochrome b

หมายเหตุ การจัดกลุ่มทั้งสามกลุ่มดังนี้ 1) พื้นที่ราบตอนบน (สีเทา), 2) บริเวณเทือกเขาภูพาน (สีดำ), 3) พื้นที่ราบตอนล่าง (สีขาว)



ภาพ 9 สายสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการต้นไม้ของยีน 16S rRNA

หมายเหตุ แสดงค่า node จากค่า bootstrap values จากวิธีการ maximum likelihood และค่า Bayesian posterior probability จากวิธีการ Bayesian ตามลำดับ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทป์ *Kaloula pulchra* (AB530639.1) (Hasan et al., 2014) เป็น outgroup



ภาพ 10 สายสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการต้นไม้ของยีน *Cytochrome b*

หมายเหตุ แสดงค่า node จากค่า bootstrap values จากวิธีการ maximum likelihood และค่า Bayesian posterior probability จากวิธีการ Bayesian ตามลำดับ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทป์ *Kaloula pulchra* (AB819033.1) (Hasan et al., 2014) เป็น outgroup

4.1.3 รูปแบบโครงสร้างประชากร

จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของอึ่งปากขวด ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างประชากรทั้ง 8 กลุ่ม (ตาราง 5) มีค่าระหว่าง 0.0% ถึง 1.8% และมีค่าเฉลี่ย 1.5% เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างพื้นที่ราบตอนบน (กลุ่มที่ 1) กับกลุ่มตัวอย่างบริเวณเทือกเขาภูพาน (กลุ่มที่ 2) พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.1% ถึง 0.5% ขณะที่กลุ่มตัวอย่างบริเวณเทือกเขาภูพานแต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างพื้นที่ราบตอนล่าง (กลุ่มที่ 3) พบว่าค่า genetic distance มีค่าที่สูงขึ้น โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0.6% ถึง 0.7% และการเปรียบเทียบกลุ่มที่มีค่า genetic distance สูงที่เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.7% ถึง 1.1% คือ กลุ่มตัวอย่างพื้นที่ราบตอนบน (กลุ่มที่ 1) และกลุ่มตัวอย่างพื้นที่ราบตอนล่าง (กลุ่มที่ 3) โดยค่ามากที่สุดพบในคู่ของจังหวัดหนองคาย (NK) เทียบกับจังหวัดอุบลราชธานี (UB) เฉลี่ยคือ 1.5% ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างพื้นที่ราบตอนล่าง เป็นกลุ่มประชากรที่มีระยะทางภูมิศาสตร์ห่างไกลมากที่สุด

จากค่า F_{st} พบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0.000 ถึง 1.000 (ตาราง 6) และในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรพบว่ามีประชากรถึง 20 คู่ จากการเปรียบเทียบทั้งหมด 28 คู่ (คิดเป็น 71%) ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ โดยเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างพื้นที่ราบตอนล่างหรือจังหวัดอุบลราชธานี (UB) กับประชากรพื้นที่อื่นๆ พบว่ามีความแตกต่างระหว่างคู่ประชากรมากที่สุดถึง 5 คู่ และมีค่า F_{st} ที่ค่อนข้างสูงมีความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางภูมิศาสตร์และความแตกต่างทางพันธุกรรม นอกจากนี้พบว่าค่า genetic distance ในประชากรจังหวัดหนองคาย (NK) และประชากรจากอำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร (PMR3) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด ($F_{st} = 1.000$; $p > 0.05$) เนื่องจากมี Haplotype distribution เพียงรูปแบบเดียว (NK = H1, PMR3 = H4) สอดคล้องกับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแฮพลไทป์ด้วยวิธี Median-joining network (MJ) ที่พบการแยกกลุ่มของแฮพลไทป์ที่ 1 (H1) และแฮพลไทป์ที่ 4 (H4) จึงมีความแตกต่างกันมากในสองประชากรนี้

พหุบัน ปณฺ ทิโต ชีเว

ตาราง 6 ค่า genetic distance (%) ระหว่างประชากรอึ่งปากขวด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

	KK	MK	NK	KS	PMR1	PMR2	PMR3	UB
KK	0.4 (0.0-0.8)							
MK	0.4 (0.0-0.8)	0.1 (0.0-0.2)						
NK	0.3 (0.0-0.6)	0.3 (0.0-0.6)	0 (0.0-0.0)					
KS	0.5 (0.0-1.1)	0.3 (0.0-0.6)	0.05 (0.0-1.0)	0.5 (0.0-1.0)				
PMR1	0.6 (0.2-1.1)	0.1 (0.0-0.2)	0.5 (0.5-0.6)	0.4 (0.3-0.5)	0.1 (0.0-0.2)			
PMR2	0.4 (0.0-0.8)	0.3 (0.0-0.6)	0.4 (0.0-0.8)	0.5 (0.0-1.0)	0.3 (0.0-0.6)	0.8 (0.0-1.6)		
PMR3	0.5 (0.5-0.6)	0.1 (0.0-0.3)	0.5 (0.5-0.5)	0.5 (0.5-0.5)	0.1 (0.0-0.2)	0.2 (0.0-0.5)	0 (0.0-0.0)	
UB	0.9 (0.2-1.6)	0.7 (0.0-1.5)	1.5 (1.5-1.5)	1.1 (0.5-1.8)	0.7 (0.0-1.5)	0.4 (0.0-0.8)	0.6 (0.0-1.3)	0.6 (0.0-1.3)

หมายเหตุ ค่าด้านบนแสดงค่าเฉลี่ย (%) ในแต่ละประชากร, ค่าด้านล่างแสดงช่วงน้อยที่สุดถึงมากที่สุดในแต่ละประชากร



ตาราง 7 ค่า pairwise F_{st} ระหว่างประชากรร้องปากขวด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

	KK	MK	NK	KS	PMR1	PMR2	PMR3	UB
KK								
MK	0.662							
NK	0.101	0.936*						
KS	0.545	0.645*	0.809*					
PMR1	0.600*	0.063	0.954*	0.514				
PMR2	0.783*	0.170	1.000*	0.753*	0.189			
PMR3	0.146	0.223*	0.399*	0.440*	0.155*	0.252*		
UB	0.709*	0.811*	0.858*	0.727*	0.761*	0.867*	0.704*	

หมายเหตุ * แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติจากการปรับค่า Bonferroni correction



การวิเคราะห์ AMOVA (analyses of molecular variance) พบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร เมื่อวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 3 กลุ่มทางภูมิศาสตร์ พบว่ามีค่าที่น้อย โดยมีค่า $\Phi_{CT} = 0.242$ และมีความแปรปรวนภายใน 24.24% เมื่อวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็นประชากร 8 พื้นที่ พบว่ามีความแตกต่างโดยมีค่า $\Phi_{ST} = 0.440$ และมีความแปรปรวนภายใน 33.36% ขณะที่ความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรหนึ่งๆ นั้น มีค่า $\Phi_{SC} = 0.576$ และมีความแปรปรวนภายใน 42.39% (ตาราง 8) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในประชากร ประชากรมีความแตกต่างพันธุกรรมในระดับปานกลางอย่างมีนัยสำคัญ

จากการทดสอบการเบี่ยงเบนไปจาก neutral population (ตาราง 9) พบว่าค่า Tajima's D-values (D statistic) มีค่าเฉลี่ย -0.45710 ($p=0.508$) และค่า Fu's F_s (F_s statistic) มีค่าเฉลี่ย 1.22473 ซึ่งเบี่ยงเบนไปจาก neutral population และสอดคล้องกับการทดสอบ mismatch distribution พบว่ารูปแบบกราฟของประชากรทั้งหมดเป็นแบบ multimodal distribution (ภาพ 11) ซึ่งหมายถึงประชากรมีรูปแบบ Demographic equilibrium



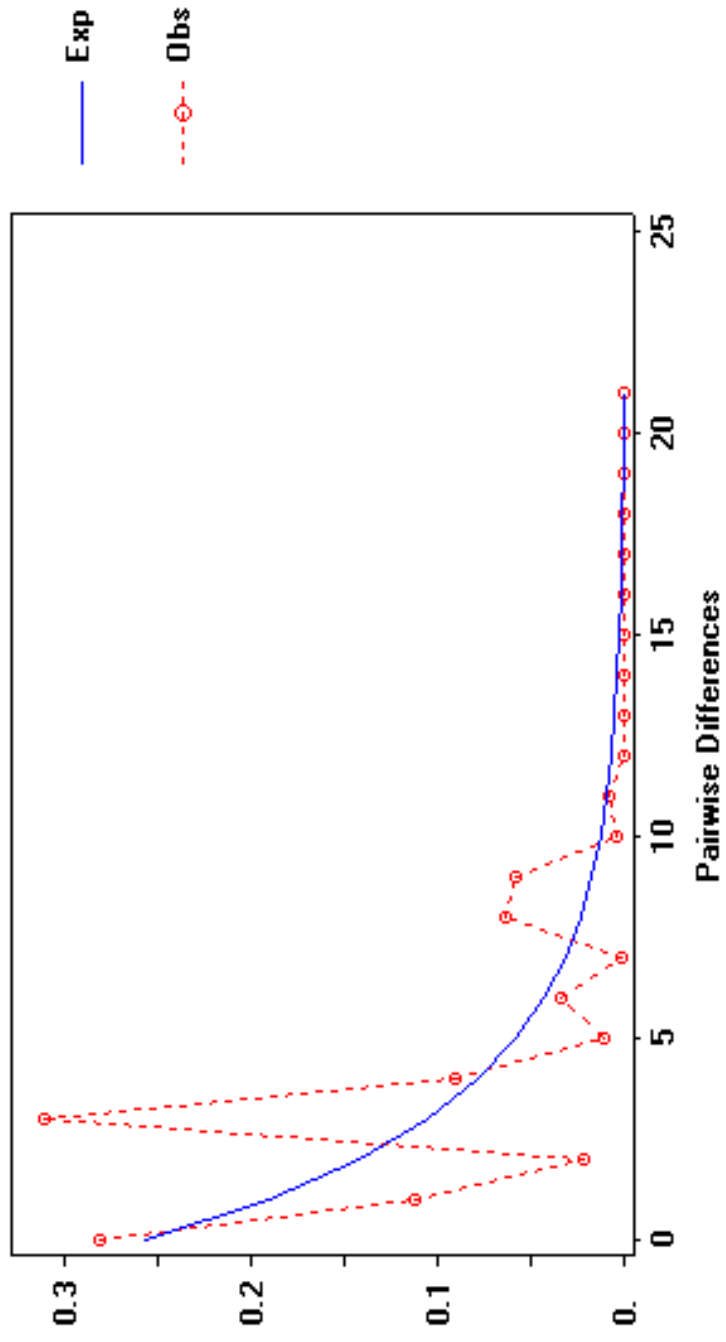
ตาราง 8 ค่า Analysis of molecular variance (AMOVA) ของประชากรอึ่งปากขวด

Variation source	d.f.	SSD	Percentage of variation	Variance components	F-statistic
Among groups	2	33.787	31.25	0.55533	$F_{CT} = 0.24242^*$
Among populations within groups	5	28.662	34.87	0.61962	$F_{ST} = 0.44044^*$
Within populations	62	37.322	33.88	0.60197	$F_{SC} = 0.57609^*$
All	69			2.25204	

หมายเหตุ * แสดงค่าýสำคัญทางสถิติที่ (p -values<0.05)

ตาราง 9 ค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ประวัติประชากร

Location	Tajima's D			Fu's Fs		
	test	p-value	Pi	test	p-value	Pi
KK	-1.124	0.083	2.000	0.644	0.610	2.000
MK	0.156	0.788	0.3888	0.477	0.407	0.3888
NK	-	-	0.000	-	-	-
KS	-1.146	0.076	2.400	3.022	0.918	2.400
PMR1	-0.817	0.321	0.400	0.090	0.289	0.400
PMR2	0.681	0.761	2.052	1.868	0.846	2.052
PMR3	-	-	-	-	-	-
UB	-1.408	0.035	2.666	3.696	0.943	2.666
Total	-0.457	0.508	1.235	1.225	N.A.	1.238
S.D.	0.760	0.423	1.141	1.461	N.A.	1.141



ภาพ 11 ค่า mismatch distribution ของประชากรอิงปากชาติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของอึ่งปากขวดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

4.2.1 การศึกษาการแปรผันทางสัณฐานวิทยา

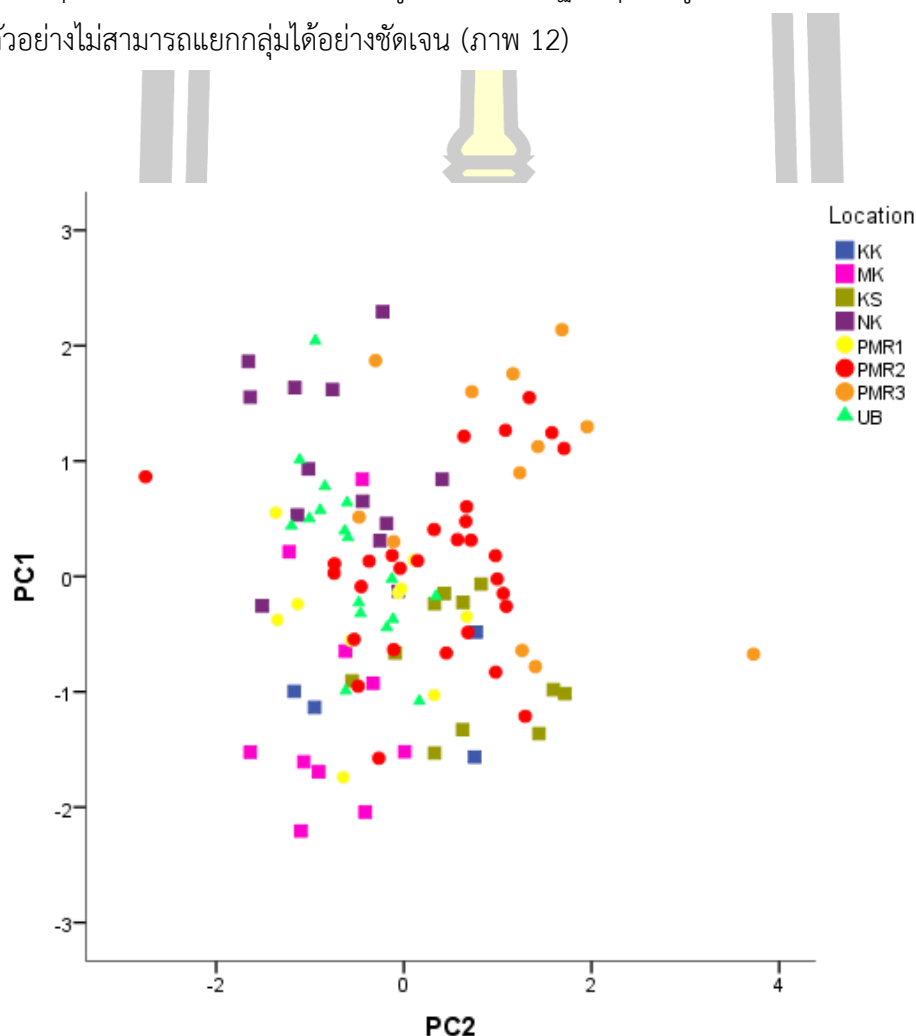
อึ่งปากขวด จำนวน 107 ตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ถูกนำมาวัดลักษณะลักษณะสัณฐานวิทยาจำนวน 6 ลักษณะ ได้ข้อมูลดังนี้ ค่าความยาวจากปลายปากถึงทวารร่วม หรือค่า Snout-vent length (SVL) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 59.88 มิลลิเมตร ค่าความกว้างของหัว หรือค่า Head width (HW) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 21.52 ค่าความยาวของหัว หรือค่า Head length (HL) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 18.07 มิลลิเมตร ค่าระยะห่างระหว่างรูจมูก หรือค่า Internarial distance (IND) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.14 มิลลิเมตร ค่าความยาวรยางค์ขาหน้า หรือค่า Forelimb length (FL) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.12 มิลลิเมตร ค่าความยาวรยางค์ขาหลัง หรือค่า Tibia length (TL) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.57 มิลลิเมตร (ตาราง 10)

ผลการศึกษาค่าความยาวจากปลายปากถึงทวารร่วม (SVL) มีค่าเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากเทือกเขาภูพาน PMR3 มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 69.36 มิลลิเมตร ค่าความกว้างของหัว (HW) มีค่าเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากเทือกเขาภูพาน PMR3 เท่ากับ 27.77 มิลลิเมตร ค่าความยาวของหัว (HL) มีค่าเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากเทือกเขาภูพาน PMR2 เท่ากับ 23.53 มิลลิเมตร ค่าระยะห่างระหว่างรูจมูก (IND) ต่ำสุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากเทือกเขาภูพาน PMR3 เท่ากับ 5.77 มิลลิเมตร ค่าความยาวรยางค์ขาหน้า (FL) มีค่าเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากเทือกเขาภูพาน PMR3 เท่ากับ 17.39 มิลลิเมตร ค่าความยาวรยางค์ขาหลัง (TL) มีค่าเฉลี่ยมากที่สุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากมหาสารคามและอุบลราชธานีเท่ากับ 21.10 มิลลิเมตร

สำหรับค่าความยาวจากปลายปากถึงทวารร่วม (SVL) ต่ำสุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากจังหวัดขอนแก่น มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 54.02 มิลลิเมตร ค่าความกว้างของหัว (HW) ต่ำสุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากจังหวัดกาฬสินธุ์เท่ากับ 17.58 มิลลิเมตร ค่าความยาวของหัว (HL) ต่ำสุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากจังหวัดขอนแก่นเท่ากับ 16.93 มิลลิเมตร ค่าระยะห่างระหว่างรูจมูก (IND) ต่ำสุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากจังหวัดหนองคายเท่ากับ 4.91 มิลลิเมตร ค่าความยาวรยางค์ขาหน้า (FL) ต่ำสุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากเทือกเขาภูพาน PMR1 เท่ากับ 12.70 มิลลิเมตร ค่าความยาวรยางค์ขาหลัง (TL) ต่ำสุดอยู่ที่ตัวอย่างประชากรจากจังหวัดกาฬสินธุ์เท่ากับ 21.10 มิลลิเมตร

4.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสัญญาณวิทยา

จากการวิเคราะห์หาความเหมาะสมของตัวอย่างด้วยค่าสถิติ KMO ได้ค่าเท่ากับ 0.739 ($p < 0.05$) ซึ่งมีความเหมาะสม สอดคล้องกับค่าสถิติ Bartlett's test ($p < 0.05$) ที่แสดงถึงตัวแปรแต่ละตัวมีความอิสระจากกันอย่างสมบูรณ์ แต่แต่ละลักษณะมีค่า Eigenvectors ที่เกิน 1 พบว่ามี 2 องค์ประกอบ โดยองค์ประกอบที่ 1 (PC1) สามารถอธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวแปรได้ 44% และองค์ประกอบที่ 2 (PC2) อธิบายได้ 16% ซึ่ง 2 องค์ประกอบนี้สามารถ อธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวแปรได้ 60% พบว่าข้อมูลลักษณะสัญญาณชุดข้อมูลมีการกระจายหรือปะปนของกลุ่มตัวอย่างไม่สามารถแยกกลุ่มได้อย่างชัดเจน (ภาพ 12)



ภาพ 12 กราฟ PCA แสดงลักษณะทางสัญญาณของอิงปากขวดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตาราง 10 ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาอึ่งปากขวด

พื้นที่ ลักษณะ	Mean \pm SD Min-Max.									
	KK n=4	MK n=10	KS n=11	NK n=13	PMR1 n=10	PMR2 n=30	PMR3 n=12	UB n=17		
SVL	54.02 \pm 2.52 48.46-60.41	59.50 \pm 2.01 41.38-64.22	57.42 \pm 1.37 48-68-63.41	61.98 \pm 1.53 52.92-69.51	56.57 \pm 1.32 50.25-64.28	60.26 \pm 0.87 53.05-71.27	69.36 \pm 1.58 58.98-76.59	59.50 \pm 1.07 53.43-67.40		
HW	17.70 \pm 1.21 15.01-20.27	21.04 \pm 0.66 15.74-22.72	17.580.51 15.41-20.16	21.84 \pm 0.40 20.04-24.77	19.83 \pm 0.95 16.17-24.15	25.21 \pm 0.43 21.51-30.09	27.77 \pm 0.91 18.07-28.06	21.04 \pm 0.40 17.21-23.46		
HIL	16.930.83 15.05-18.21	18.15 \pm 0.61 13.58-20.58	18.07 \pm 0.67 14.43-22.54	18.70 \pm 0.56 14.83-21.64	18.50 \pm 0.97 13.42-22.71	23.53 \pm 0.42 13.37-22.15	19.13 \pm 0.65 15.61-22.43	18.15 \pm 0.43 15.80-21.50		
IND	5.05 \pm 0.21 4.65-5.48	4.98 \pm 0.94 4.29-5.25	5.45 \pm 0.14 4.71-6.04	4.91 \pm 0.11 4.12-5.63	4.94 \pm 0.15 4.21-5.74	5.23 \pm 0.11 3.29-6.18	5.77 \pm 0.19 4.76-7.21	4.98 \pm 0.04 4.53-5.35		
FL	13.41 \pm 0.66 12.33-15.02	13.26 \pm 0.38 9.96-14.14	14.56 \pm 0.37 12.69-16.28	14.45 \pm 0.48 11.56-17.44	12.70 \pm 0.16 11.62-13.34	14.61 \pm 0.27 10.51-17.24	17.39 \pm 0.44 15.45-19.83	13.26 \pm 0.30 11.50-15.46		
TL	21.53 \pm 0.49 20.28-22.48	23.76 \pm 0.72 18.46-25.24	21.10 \pm 0.564 19.26-23.97	25.76 \pm 0.36 24.07-28.10	22.15 \pm 0.34 20.13-23.55	21.78 \pm 0.35 18.59-26.04	23.44 \pm 0.78 19.23-26.85	23.76 \pm 0.55 20.41-30.61		

4.3 ความสัมพันธ์และอิทธิพลของเส้นละติจูดต่อความแปรผันทางสัณฐาน

4.3.1 ความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดในประเทศไทย

จากการศึกษานี้เพื่อหาความแปรผันทางภูมิศาสตร์ (geographic variation) จึงเลือกดูความสัมพันธ์ระหว่างอึ่งปากขวดซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีการกระจายอยู่เกือบทุกภาคของประเทศไทย เทียบกับความแปรผันทางภูมิศาสตร์ตามเส้นละติจูด โดยทำการเก็บข้อมูลการวัดสัณฐานวิทยา 6 ลักษณะของอึ่งปากขวดจำนวน 185 ตัวอย่าง ซึ่งได้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตัวอย่างคือ กลุ่มที่ 1 แนวละติจูดต่ำกว่า 15 องศาเหนือ (n=25) ประกอบไปด้วยจังหวัดกาญจนบุรี กลุ่มที่ 2 แนวเส้นละติจูด 15-18 องศาเหนือ (n=120) ประกอบไปด้วยจังหวัดอุบลราชธานี มหาสารคาม กาฬสินธุ์ ขอนแก่น หนองคาย สกลนคร เพชรบูรณ์และตาก ส่วนกลุ่มที่ 3 แนวเส้นละติจูดตั้งแต่ 18 องศาเหนือขึ้นไป (n=40) ประกอบไปด้วยจังหวัดลำพูน พะเยาและสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (ตาราง 11) จากการจัดกลุ่มของอนุกรมวิธานในพื้นที่เก็บตัวอย่างที่มีค่าใกล้เคียงกัน ให้ผลข้อมูลลักษณะสัณฐาน SVL มีขนาดเฉลี่ย 56.36, HW มีขนาดเฉลี่ย 21.99, HL มีขนาดเฉลี่ย 17.99, IND มีขนาดเฉลี่ย 5.68, FL มีขนาดเฉลี่ย 13.14 และ TL มีขนาดเฉลี่ย 22.00 โดยกลุ่มที่ 3 พบลักษณะสัณฐาน มีค่าเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มอื่น 4 ลักษณะ คือ HW (23.27), HL (21.37), IND (7.16) และ FL (14.07) และกลุ่มที่ 1 แนวละติจูดน้อยกว่า 15 องศา พบลักษณะสัณฐานมีค่าเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มอื่น 4 ลักษณะ คือ HW (18.33), HL(14.73), FL (9.13) และ TL (16.67) ในขณะที่กลุ่มที่ 2 แนวเส้นละติจูด 15-18 องศาเหนือ พบ 2 ลักษณะสัณฐาน มีค่าเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มอื่นมีค่ามากที่สุดคือ SVL (57.35) และ TL (22.48) รวมทั้งมีค่าสัณฐาน มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มอื่นคือ IND (5.09) (ตาราง 12)

ข้อมูลที่ได้จากการวัดสัณฐานวิทยา ถูกนำมาทดสอบข้อตกลงเบื้องต้นพบว่า มีการแจกแจงต่างจากการแจกแจงแบบปกติ (Shapiro-Wilk test) และการทดสอบความแปรปรวน (Homogeneity of Variances) มีค่าความแปรปรวนของแต่ละกลุ่มประชากรไม่เท่ากัน สถิติอินอนพารามетริกจึงถูกนำมาใช้ในการทดสอบจากค่าของ Brown-Forsythe (Robust Test of Equality of Means) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดมีความแตกต่างกันที่พื้นที่ภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน (ตาราง 12)

การทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบพหุคูณ (Multiple Comparison) ใช้สถิติ Dunnett's T3 เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทีละคู่ ผลการทดสอบตัวแปรตามแต่ละกลุ่มนั้นแสดงผลของค่าสัญญาณวิทยา มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ ($p = 0.05$) (ภาพ 13-18) โดยลักษณะสัญญาณตัวแปร HL และ TL แสดงถึงความแตกต่างของขนาดที่มีผลมาจากแนวเส้นละติจูด ทั้งสามกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 15 และ 17) กลุ่มที่ 1 แนวละติจูดน้อยกว่า 15 องศาเหนือ มีขนาดลักษณะเล็ก ขณะที่กลุ่มที่ 2 แนวเส้นละติจูด 15-18 องศาเหนือและ กลุ่มที่ 3 แนวเส้นละติจูดมากกว่า 18 องศาเหนือขึ้นไป มีขนาดลักษณะใหญ่ขึ้นตามลำดับ ในขณะที่ลักษณะตัวแปร SVL, HW และ FL พบว่าขนาดของกลุ่มที่ 1 มีความแตกต่างอย่างจากกลุ่มอื่นชัดเจน แต่ในกลุ่มที่ 2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และมีค่าเฉลี่ยของขนาดใกล้เคียงกัน (ภาพ 13, 14 และ 18) นอกจากนี้ ลักษณะ ตัวแปร IND กลับไม่แสดงความสัมพันธ์กับแนวเส้นละติจูด (ภาพ 16)



ตาราง 11 ค่าทางสถิติฐานวิทยาของลักษณะที่ศึกษาในอึ่งปากขวดในประเทศไทย

Latitude	Mean \pm SD								N
	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	Min-Max.		
>18°	56.36 \pm 5.94	23.27 \pm 3.32	21.37 \pm 3.03	7.16 \pm 0.82	14.07 \pm 2.13	21.26 \pm 1.82	40		
15-18°	40.05-69.12	15.68-28.55	12.00-29.19	5.1-9.37	7.47-17.30	19.66-27.80	120		
<15°	57.35 \pm 7.54	22.39 \pm 3.35	17.79 \pm 2.39	5.09 \pm 0.67	13.68 \pm 1.85	22.48 \pm 2.34	25		
Total	23.60-71.34	15.01-30.36	12.52-23.72	3.29-7.94	9.26-19.44	17.86-30.61	185		

ตาราง 12 ค่าความสัมพันธ์ของค่าทดสอบสถิติต่อสถานีฐานวิทยา

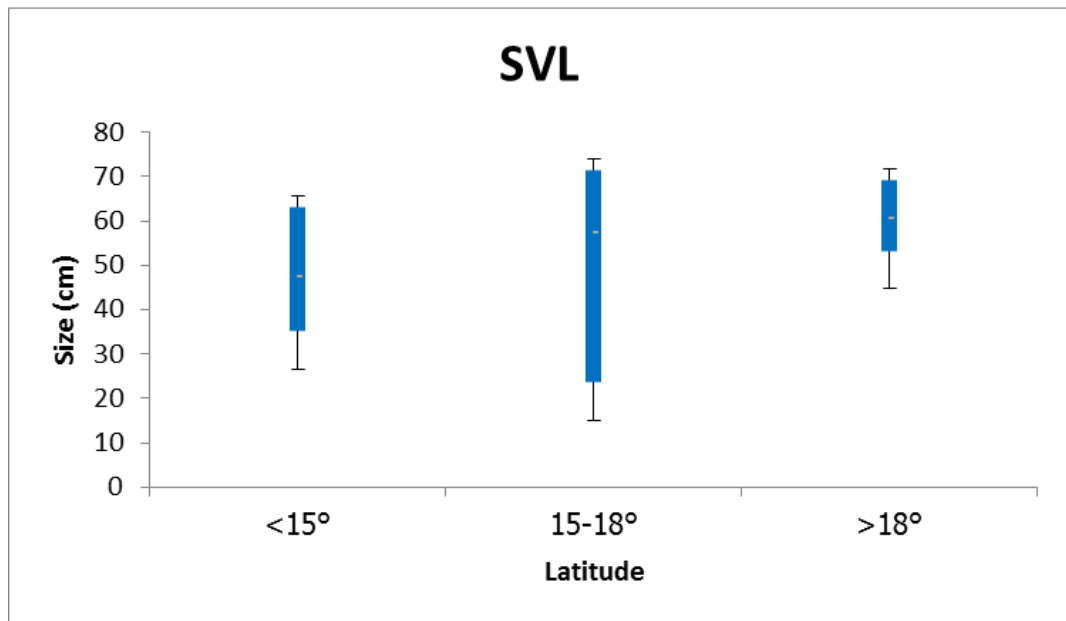
Character	Latitude	Test of Normality			Test of Homogeneity of variance			Robust Test of Equality of Means				
		W-test	df	p	F-test	df1	df2	p	F-test	df1	df2	p
SVL	<15°	0.108	25	0.565								
	15-18°	0.115	130	< 0.0005*	2.898	2	182	0.058	37.384	2	74.367	< 0.0005*
	>18°	0.129	30	0.12								
HW	<15°	0.119	25	0.96								
	15-18°	0.409	130	0.301	1.461	3	183	0.235	26.374	3	81.63	< 0.0005*
	>18°	0.112	30	0.119								
HL	<15°	0.111	25	0.825								
	15-18°	0.384	130	< 0.0005*	0.246	4	184	0.782	7.221	4	171.99	0.001*
	>18°	0.116	30	0.043							2	

หมายเหตุ * แสดงค่าสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

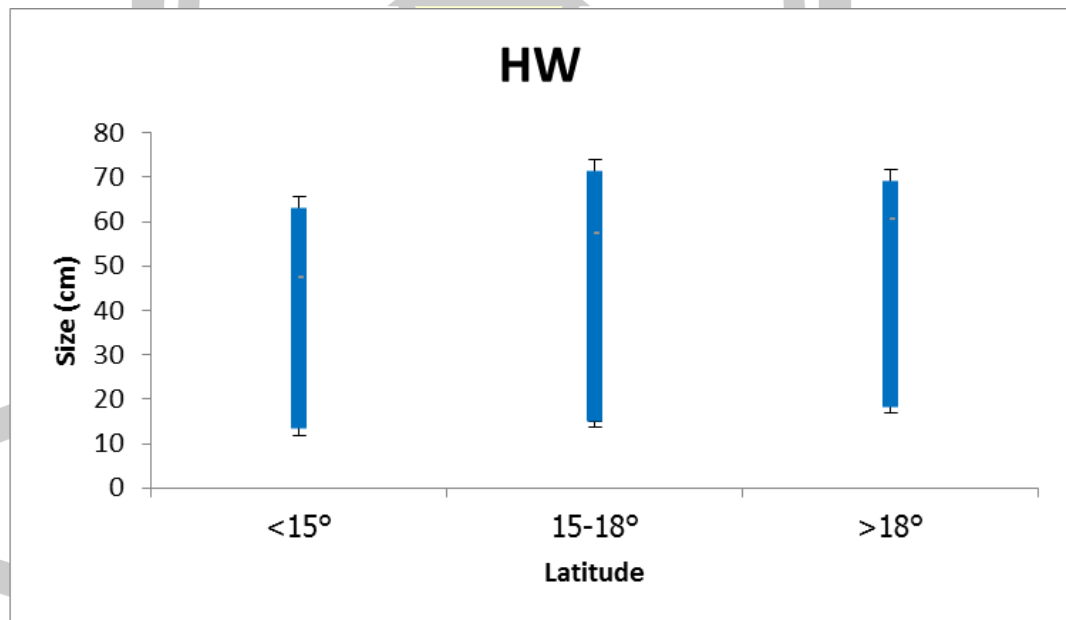
ตาราง 11 ค่าความสัมพันธ์ของค่าทดสอบสถิติต่อสิ่งแวดล้อมวิทยา (ต่อ)

Character	Latitude	Test of Normality			Test of Homogeneity of variance			Robust Test of Equality of Means				
		W-test	df	p	F-test	df1	df2	p	F-test	df1	df2	p
IND	<15°	0.117	25	0.788								
	15-18°	0.125	130	< 0.0005*	2.885	5	185	0.58	79.2	5	57.008	< 0.0005*
	>18°	0.106	30	0.642								
FL	<15C	0.092	25	0.867								
	15-18°	0.051	130	0.381	0.731	6	186	0.483	52.884	6	66.446	< 0.0005*
	>18°	0.111	30	0.044*								
TL	<15°	0.14	25	0.159								
	15-18°	0.063	130	0.035*	1.685	7	187	0.188	85.268	7	54.569	< 0.0005*
	>18°	0.109	30	0.549								

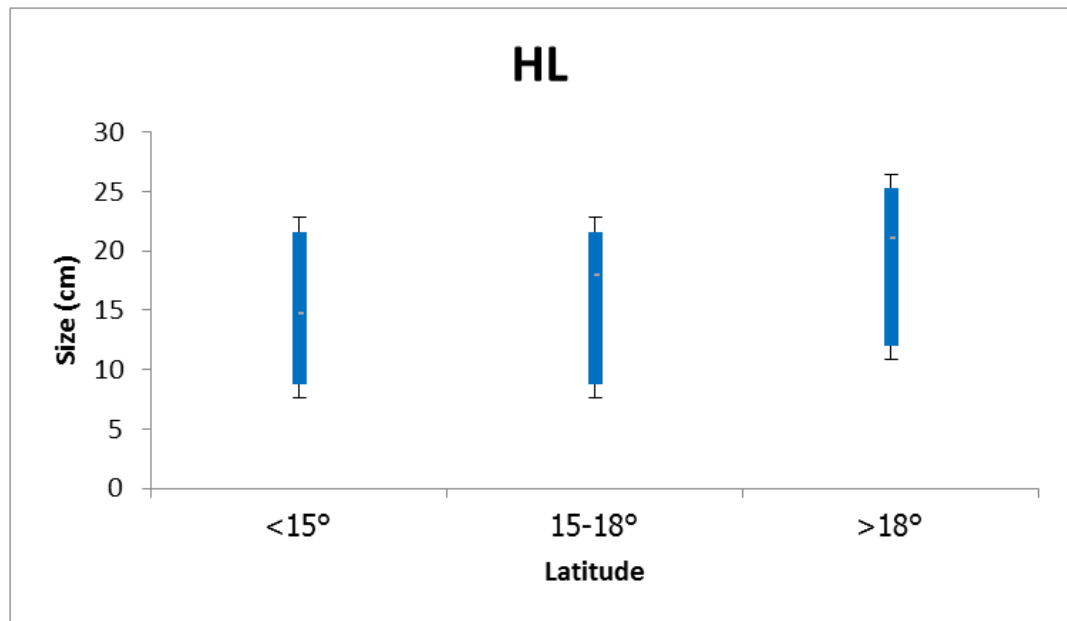
หมายเหตุ * แสดงค่าสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



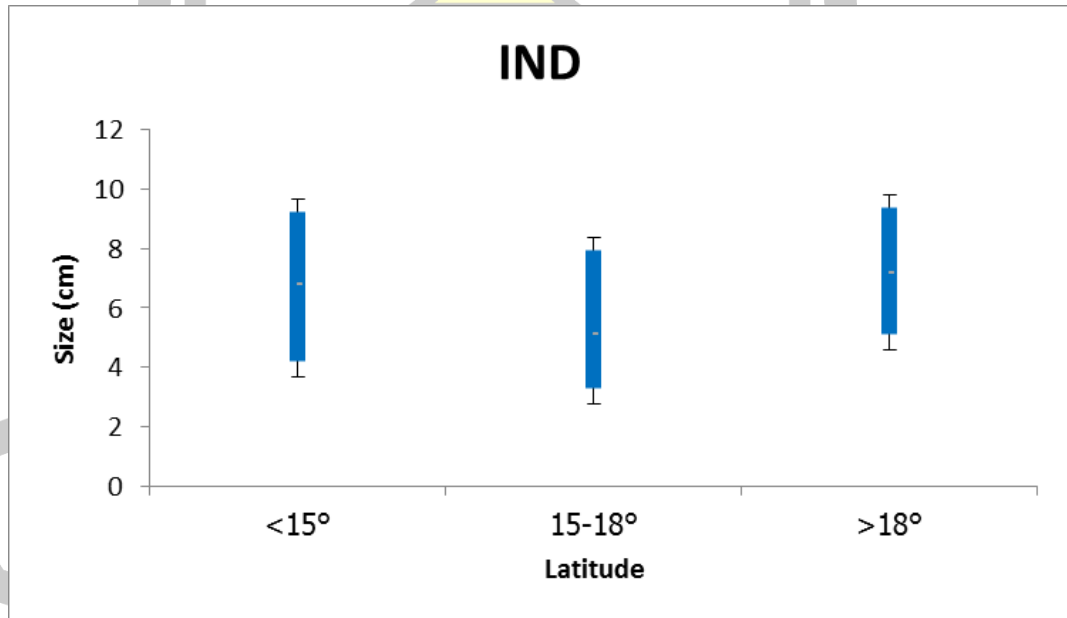
ภาพ 13 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ SVL เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด



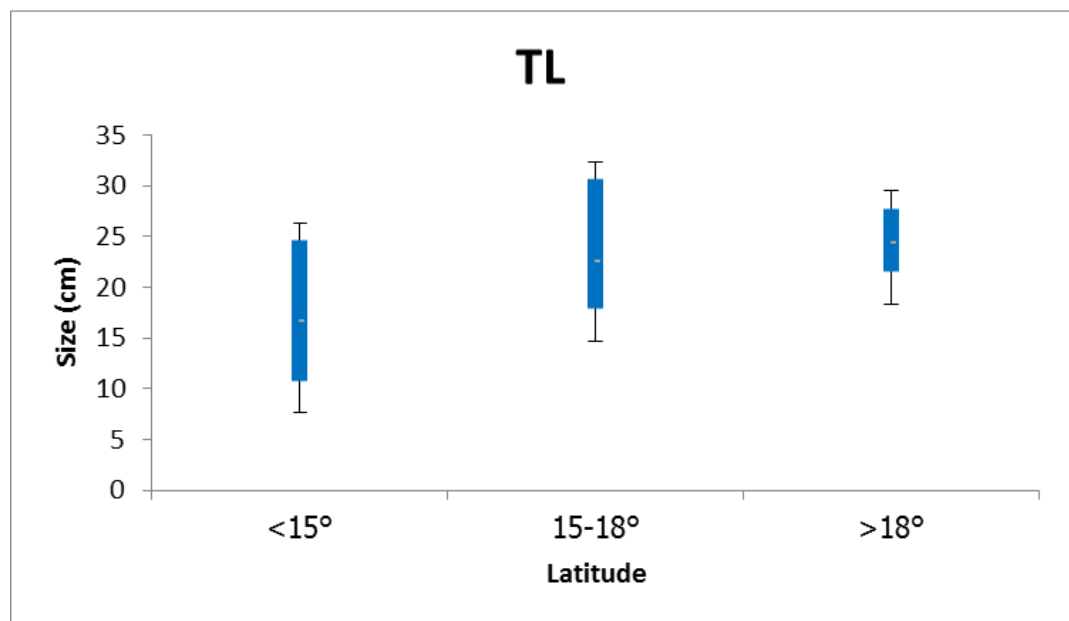
ภาพ 14 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ HW เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด



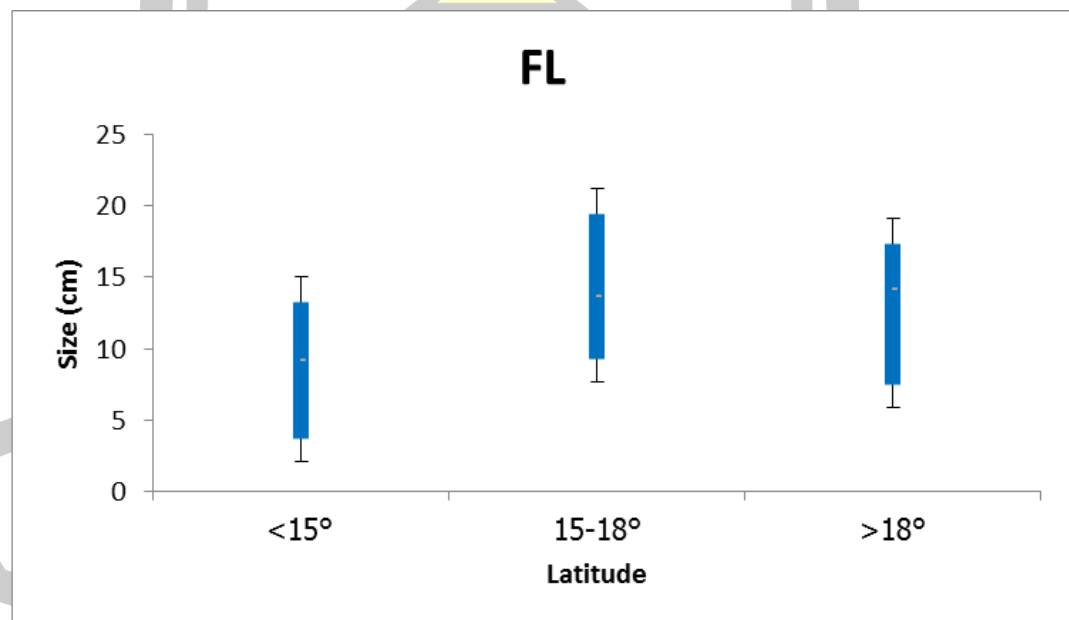
ภาพ 15 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ HL เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด



ภาพ 16 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ IND เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด



ภาพ 17 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ TL เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด



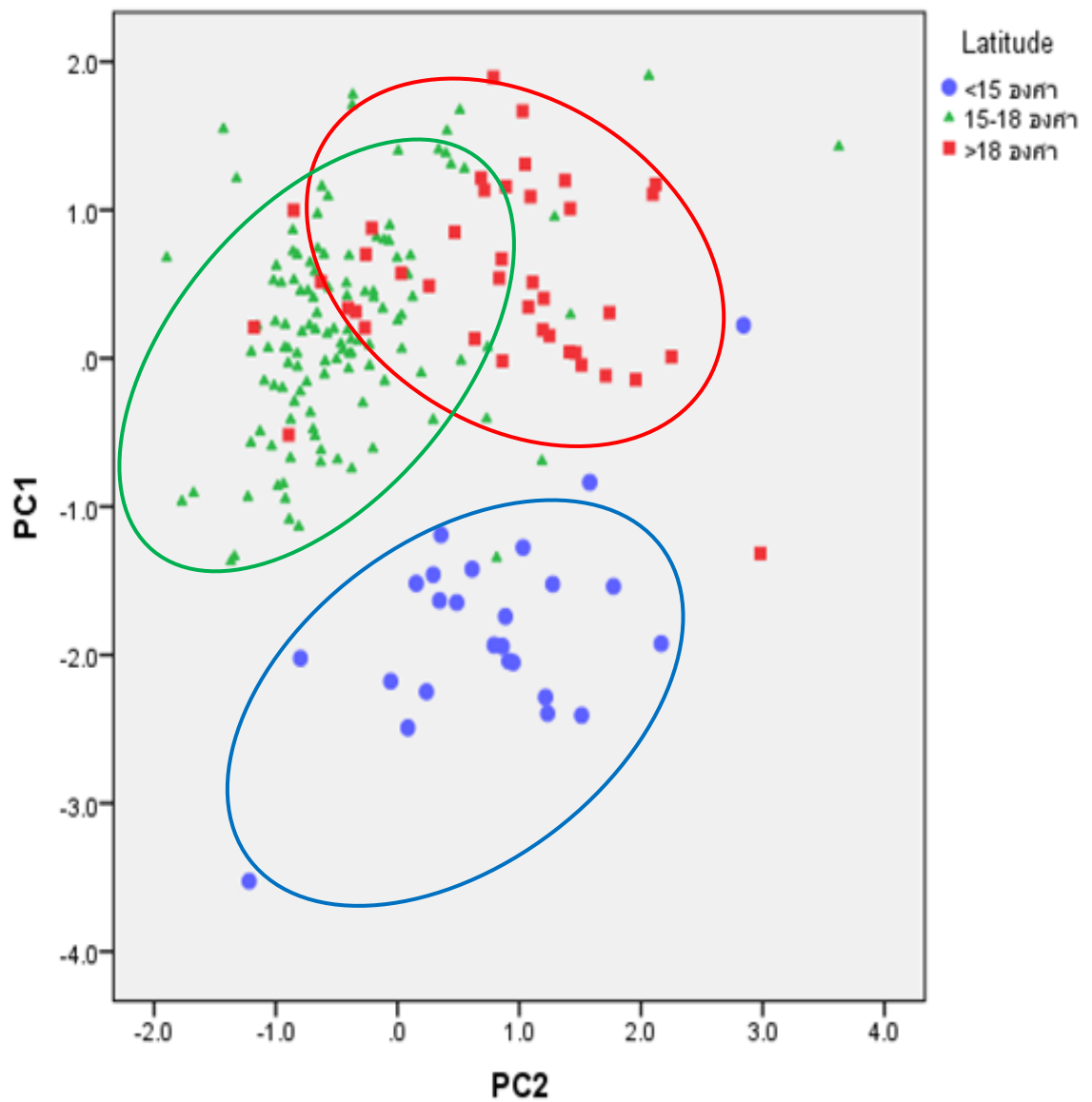
ภาพ 18 ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะ FL เปรียบเทียบกับช่วงเส้นละติจูด

4.3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสัญญาณวิทยา

จากการวิเคราะห์หาความเหมาะสมของตัวอย่างด้วยค่าสถิติ KMO ได้ค่าเท่ากับ 0.698 ($p < 0.05$) ซึ่งมีความเหมาะสม สอดคล้องกับค่าสถิติ Bartlett's test ($p < 0.05$) ที่แสดงถึงตัวแปรแต่ละตัวมีความอิสระจากกันอย่างสมบูรณ์ แต่ละลักษณะมีค่า Eigenvalues ที่เกิน 1 พบว่ามี 2 องค์ประกอบ โดยองค์ประกอบที่ 1 สามารถอธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวแปรได้ 43% และองค์ประกอบที่ 2 อธิบายได้ 17% ซึ่ง 2 องค์ประกอบนี้สามารถ อธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวแปรได้ 60%

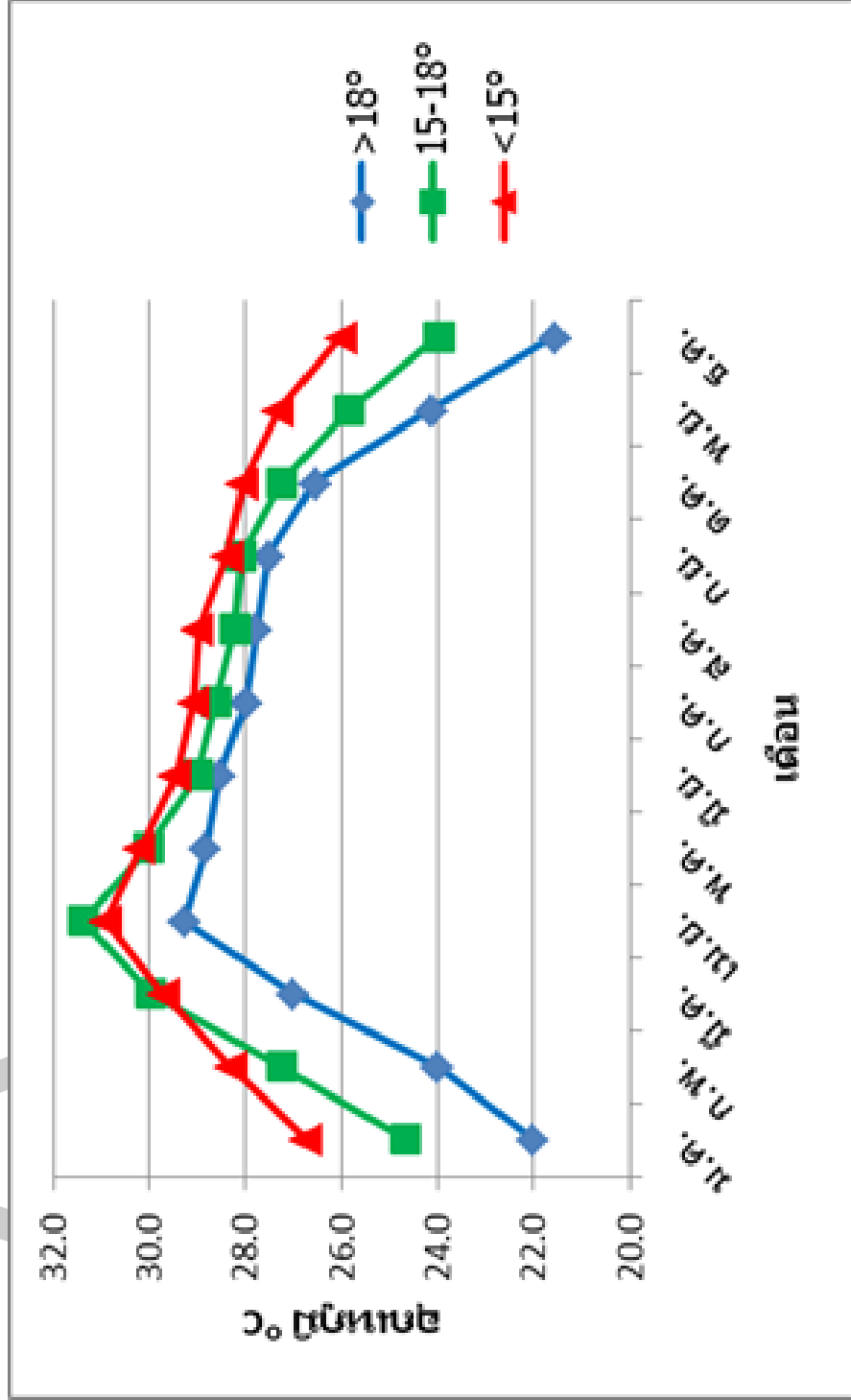
กราฟการกระจายของข้อมูลทางสัญญาณวิทยา ซึ่งจากการวิเคราะห์ PCA ตามกลุ่มแนวเส้นละติจูด โดยใช้ 6 ตัวแปร สามารถแยกองค์ประกอบหลักได้ 2 Factor คือ Factor ที่ 1 มี 5 ตัวแปร SVL, HW, HL, FL, TL และ Factor ที่ 2 มี 1 ตัวแปร คือ IND จากการวิเคราะห์หาความเหมาะสมของตัวอย่างด้วยค่าสถิติ KMO ได้ค่าเท่ากับ 0.68 ($p < 0.05$) ซึ่งมีความเหมาะสม สอดคล้องกับค่าสถิติ Bartlett's test ($p < 0.05$) ที่แสดงถึงตัวแปรแต่ละตัวมีความอิสระจากกันอย่างสมบูรณ์ แต่ละลักษณะมีค่า Eigenvalues ที่เกิน 1 พบว่ามี 2 องค์ประกอบ โดยองค์ประกอบที่ 1 สามารถอธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวแปรได้ 43% และองค์ประกอบที่ 2 อธิบายได้ 17% ซึ่ง 2 องค์ประกอบนี้สามารถ อธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวแปรได้ 60% เมื่อนำข้อมูลไปสร้างกราฟความสัมพันธ์การกระจายตัวของข้อมูลทางสัญญาณวิทยาอึ่งปากขวด พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (ภาพ 19) โดยที่กลุ่มตัวอย่างแนวละติจูดต่ำกว่า 15 องศาเหนือมีการกระจายตัวออกห่างจากอีก 2 กลุ่มอย่างชัดเจน ในขณะที่อีก 2 กลุ่มมีความคล้ายคลึงกันและประชากรบางส่วนมีการกระจายทับซ้อนกัน





ภาพ 19 กราฟ PCA แสดงลักษณะทางสัณฐานของอึ่งปากขวดในประเทศไทย





ภาพ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในรอบปีและแนวละติจูด ประจำปี พ.ศ. 2559

ที่มา เฉลี่ยจากข้อมูลอุณหภูมิจังหวัด (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2559)

4.4 อภิปรายผล

4.4.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งปากขวด

งานวิจัยนี้ได้ให้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งปากขวด *G. molossus* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยตั้งสมมติฐานเกี่ยวกับความสามารถในการกระจายตัวที่จำกัดทางภูมิศาสตร์ ซึ่งมีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญต่อการกำหนดการไหลยีนของประชากร (Funk et al., 2005) โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จากยีน Cytochrome b และยีน 16S rRNA พบว่าความแปรผันของยีนทั้งสองไม่เท่ากัน โดยยีน Cytochrome b มีความแปรผันทางพันธุกรรมมากกว่ายีน 16S rRNA ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Matsui et al. (2005) ซึ่งศึกษายีน 12S rRNA and 16S rRNA และ Cytochrome b ในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่ม Microhylidae พบว่า Cytochrome b มีความแปรผันทางพันธุกรรมมากที่สุด

การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรจากยีน Cytochrome b พบว่ามีความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (π) และค่าแฮพโลไทป์ (h) ค่าค่อนข้างต่ำและค่าเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ามีเพียงความแตกต่างเล็กน้อยระหว่างประชากรตัวอย่างในที่สูงราบโคราช ซึ่งค่าความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในระดับที่ต่ำ (ตาราง 5) ซึ่งมีการศึกษาในกลุ่ม anurans บางชนิด เช่น North African Green Frog *Pelophylax saharicus* ในประเทศตูนิเซีย ($\pi = 0.2\%$, $h = 0.7$) (Farjallah, Amor, Merella, & Said, 2012) และ Asian Grass Frog, *Fejevaryia limnocharis* ในประเทศมาเลเซีย ($\pi = 0.0-0.6\%$, $h = 0.0-0.8$) (Hasan et al., 2014) เมื่อเทียบกับที่มีรายงานในกบสปีชีส์อื่น เช่น *Rana pretiosa* (Blouin, Phillipsen, & Monsen, 2010) ซึ่งมีงานวิจัยระบุว่าอาจเป็นผลมาจากการขยายตัวของประชากรที่เป็นประชากรกลุ่มเล็ก ๆ เมื่อไม่นานมานี้ (Farjallah et al., 2012; Hasan et al., 2014) การค้นพบนี้สอดคล้องกับสมมติฐานของ Grant & Bowen (1998) ที่กล่าวว่าค่านิวคลีโอไทด์และค่าแฮพโลไทป์ ($\pi \leq 0.5\%$, $h < 0.5$) ที่ต่ำเป็นเกิดจากปรากฏการณ์คอขวด (bottleneck population) หรือการก่อตั้งของประชากรเมื่อไม่นานจากประชากรขนาดเล็ก (event founded) ซึ่งเป็นไปได้ว่าประชากรของอึ่งปากขวด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยอาจเป็นผลมาจากการขยายตัวของประชากรเมื่อไม่นานมานี้ เป็นผลจากกลุ่มประชากรบรรพบุรุษที่มีขนาดเล็ก ตลอดจนค่า Haplotype distribution ที่ปรากฏเพียง 9 รูปแบบ อาจเนื่องจากอึ่งปากขวดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีการกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย รวมทั้งภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วย นอกจากนี้ยังเป็นสัตว์เศรษฐกิจซึ่งเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคตามต่างจังหวัดจึงเกิดการขนส่งทำให้อึ่งปากขวดเกิดการไหลยีน (gene flow) อย่าง

ไม่ตั้งใจด้วยกิจกรรมของมนุษย์ มีโอกาสแลกเปลี่ยนยีนส่งผลต่อค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมและรูปแบบการกระจายของแฮพโลไทป์น้อยลง คล้ายกับการศึกษาในกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ในประเทศไทยที่พบ Haplotype distribution เพียง 12 แฮพโลไทป์ (Pansook, Khonsue, Piyapattanakorn, & Pariyanonth, 2012) ในขณะที่สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีแหล่งอาศัยจำเพาะ และไม่เป็นสัตว์เศรษฐกิจเช่น ปาดจิวศรีราชา *Chiromantis hansenae* ที่พบว่ามีความหลากหลายของแฮพโลไทป์สูง ถึง 57 แฮพโลไทป์ (Yodthong et al., 2014) สำหรับรูปแบบแฮพโลไทป์ ที่ถูกพบมากหรือมีความถี่สูงที่สุดของอึ่งปากขวดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยคือ แฮพโลไทป์ที่ H1 และแฮพโลไทป์ที่ 4 (ความถี่ 50% และ 62% ตามลำดับ) โดยมี 2 ประชากรที่ไม่แสดงความหลากหลายของประชากรเลย คือ ตัวอย่างประชากรจากอำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร (PMR3) และจากจังหวัดหนองคาย (NK) ทั้งนี้อาจจะเกิดจากการที่กลุ่มประชากรมีขนาดเล็กและมีการไหลของยีนในประชากรที่สูงมาก สอดคล้องกับการวิเคราะห์ประวัติประชากร mismatch distribution พบว่าประชากรมีรูปแบบแผนภูมิแบบ multimodal โดยค่า Tajima's D test มีค่าเป็นลบ และ Fu's Fs test มีค่าที่ต่ำ บ่งชี้ว่าประชากรอึ่งปากขวดในภาพรวมของภาคตะวันออกเฉียงเหนือไม่มีการเปลี่ยนแปลงของประชากรขนาดใหญ่ในอดีตที่ผ่านมา

การวิเคราะห์รูปแบบของ median-joining network ของยีน Cytochrome b ซึ่งพบว่าสายวิวัฒนาการรวมกันเป็นกลุ่มใหญ่แสดงแฮพโลไทป์ที่ H1 และแฮพโลไทป์ที่ 4 ที่มีความถี่สูงและมีการกระจายทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวาง ขณะที่ประชากรในที่ราบตอนล่างหรือกลุ่มประชากรจากจังหวัดอุบลราชธานี (UB) มีตัวอย่างที่ปรากฏแฮพโลไทป์เหมือนกับในกลุ่มเทือกเขาภูพาน 1 ตัวอย่าง (H4) นอกนั้นอีก 5 ตัวอย่างปรากฏลักษณะแฮพโลไทป์ที่มีความจำเพาะแยกออกมา (H9) และมีความแปรผันจากกลุ่มประชากรอื่นค่อนข้างมาก เช่นเดียวกับรายงานจาก กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ที่พบว่าประชากรตอนล่างของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความใกล้เคียงกับภาคตะวันออกหรือบริเวณเทือกเขาพนมดงรักมากกว่า (Pansook et al., 2012)

การเปรียบเทียบความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (pairwise F_{st}) พบว่าประชากรจากทางตอนล่างของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือกลุ่มประชากรจังหวัดอุบลราชธานี (UB) แสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่แยกออกจากประชากรส่วนใหญ่ และมีความแปรผันทางพันธุกรรมที่สูงเมื่อเทียบกับประชากรกลุ่มอื่น ทั้งนี้อาจเป็นผลจากระยะทางทางภูมิศาสตร์ที่ยังไกลกันมาก ยิ่งส่งผลต่อโอกาสการถ่ายทอดทางพันธุกรรมลดลง โดยประชากรที่อยู่บริเวณที่ห่างไกลเป็นเวลานาน มักมีความแตกต่างทางพันธุกรรมแยกออกจากประชากรอื่น และมีแนวโน้มที่จะแตกต่างจากประชากรส่วนกลางมากขึ้นหากระดับของการแยกสูงมากพอ (Cassel & Tammaru, 2003) ลักษณะเช่นนี้สามารถพบได้ในโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจำนวนมาก (H Pröhl, Ron, & Ryan, 2010)

การศึกษาของ Laojumpon, Suteethorn, & Komsorn Lauprasert (2012) จากวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 รูปแบบจากตัวเต็มวัยของอึ่งปากขวด รายงานว่าอึ่งปากขวดจากแอ่งสกลนครมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มตัวอย่างจากแอ่งโคราช อย่างไรก็ตามจากการวิจัยนี้พบว่ามีความสัมพันธ์ของทางพันธุกรรมสูงระหว่างประชากรแอ่งสกลนคร (PMR1, PMR2 และ PMR3) และประชากรกลุ่มตัวอย่างแอ่งโคราช (KK, KS, KK และ NK) การแยกกันของโครงสร้างทางพันธุกรรมที่พบในแอ่งสกลนครและส่วนบนของแอ่งโคราชขัดแย้งกับความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาที่อธิบายโดย Laojumpon, Suteethorn, & Komsorn Lauprasert (2012) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารูปแบบความแปรผันทางสัณฐานวิทยา (morphometric variation) จากผลกระทบของ phenotypic plasticity หรือความสามารถของสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนไทป์เดียวกัน เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันแล้วสามารถแสดงฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน (Relyea, 2002) ซึ่งเป็นลักษณะที่ถูกกำหนดโดยสภาพแวดล้อมที่มีความสัมพันธ์กับปัจจัยแวดล้อมในท้องถิ่นเช่นอุณหภูมิความชื้นและปริมาณฝนตก (Farjallah et al., 2012)

ข้อมูลภาคสนามในการเก็บตัวอย่างพื้นที่ ภูน้อย อ.ภูพาน จ.สกลนคร ที่มีความสูงถึง 488 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง พบว่าอึ่งปากขวดสามารถแพร่กระจายในภูเขาสูงและพื้นที่ราบซึ่งชี้ให้เห็นว่าสมมติฐานที่บอกเขาแยกออกจากกันระหว่างแอ่งสกลนครและแอ่งโคราชไม่สูงพอที่จะเป็นอุปสรรคทางภูมิศาสตร์ที่มีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับการศึกษาในกบนาโดยไม่พบว่าแนวเทือกเขาภูพานสามารถจำกัดการไหลของยีนได้ (Pansook et al., 2012) การแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมและการไหลของยีน ทั้งทั้ง 8 ประชากร พบว่าบริเวณที่มีการสะสมของยีนมาก (gene pool) คือบริเวณแนวเทือกเขาภูพาน เนื่องจากมี Haplotype distribution ความถี่สูง ขณะที่บริเวณพื้นที่ราบมหาสารคาม ขอนแก่น และกาฬสินธุ์ กลับพบว่ายีนมีการกระจายแตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าลักษณะของภูมิศาสตร์ที่เป็นแนวเทือกเขาไม่น่าจะมีผลต่อการขวางกันทางภูมิศาสตร์ (geographic barrier) แม้ว่าจะมีรายงานพบว่าแนวเทือกเขามีอิทธิพลขัดขวางการไหลของยีนก็ตาม (Funk et al., 2005; Monsen & Blouin, 2004; Zhan, Li, & Fu, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างที่สามารถผสมพันธุ์และวางไข่ในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำในภูเขาสูง (PMR1 และ PMR3) การใช้ลำธารเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ดังนั้นก็อาจเป็นอีกหนึ่งความเป็นไปได้ที่จะลดผลกระทบจากอุปสรรคของสันเขาเนื่องจากการเพิ่มการเชื่อมต่อของประชากรที่มีจำนวนมากและการกระจายตัวของตัวก่อนเต็มวัย (Zhan et al., 2009) จากการสังเกตพฤติกรรมการวางไข่ของอึ่งปากขวดในแหล่งน้ำชั่วคราว ช่วงฝนตกหนักช่วงแรกของปี (เดือนเมษายน) พบว่าเมื่อฝนตกตัวผู้จะออกจากโพรงที่อยู่อาศัยใต้ดินขึ้นมาร้องเรียกตัวเมีย จากนั้นทั้งตัวผู้และตัวเมียจะไปรวมตัวกันที่แหล่งน้ำชั่วคราว มีการผสมพันธุ์แบบในครั้งเดียวเป็นจำนวนมาก (explosive mating aggregation) แล้ววางไข่เป็นแพลอยอยู่ผิวน้ำจำนวนมาก (Altig & Rowley, 2014) เกิดความแปรผันที่เกิดขึ้นในประชากรจากกระบวนการรีคอม

บิเนชันในระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ มีการสร้างรูปแบบใหม่ของอัลลีลและมีการแลกเปลี่ยนอัลลีล ในกระบวนการนี้จะส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อวางไข่แล้วตัวผู้และตัวเมียจะกลับขึ้นมาสู่ฝั่งและชุดโครโมโซมลงใต้ดิน จากที่เทือกเขาภูเขาพานมีลักษณะพื้นที่สูง ทำให้มีโอกาสเกิดน้ำป่าไหลหลากได้ง่ายหากปริมาณฝนตกชุกและปริมาณของน้ำมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเชื่อมต่อกันของบ่อน้ำและแอ่งน้ำซึ่งตามมา (Heike Pröhl, Ron, & Ryan, 2010) เกิดเชื่อมต่อกันของแหล่งน้ำหลายแห่ง ไข่หลายฟองของอึ่งปากขวด ที่ลอยบนผิวน้ำมีโอกาสถูกพัดพาารวมกันและไหลลงสู่แหล่งน้ำนิ่งที่อยู่บริเวณที่ราบลุ่มได้ ซึ่งก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การไหลของยีนได้มากขึ้น (Blouin et al., 2010) จากนั้นไข่พัฒนาเป็นตัวอ่อนและอาศัยอยู่ในบริเวณนั้นมีเจริญเติบโตและมีการถ่ายทอดยีนอีกครั้งเป็นรุ่นต่อรุ่น อาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เกิดการไหลของยีนภายในภูมิภาคที่น่าสนใจในแอ่งสกลนครและตอนบนของแอ่งโคราช สามารถอธิบายการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมซึ่งลดปัจจัยทางภูมิศาสตร์ได้

การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรด้วยวิธี Analysis of Molecular Variance (AMOVA) โดยระบุกลุ่มประชากรในพื้นที่ราบทางตอนบน ตอนล่าง และบริเวณเทือกเขาภูเขาพาน พบว่ามีความแปรผันตามการจัดกลุ่มตัวอย่างตามตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของประชากรมีการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ให้ผลสอดคล้องกับสายสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic tree) จากข้อมูลทั้งสองสนับสนุน clades ที่แตกต่างทางพันธุกรรมของอึ่งปากขวดภายในที่ราบสูงโคราช โดยประชากรที่อาศัยอยู่ในแอ่งโคราช (clade B) ถูกแยกออกจากส่วนบนของที่ราบสูงโคราช (clade A) ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากร มีความสัมพันธ์กันอย่างมากระหว่างทั้งสอง clade โดยการเปรียบเทียบประชากรระหว่างสองภูมิภาค แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญความแตกต่างระหว่างสอง clade เหล่านี้ อาจเกิดจากระยะทางทางภูมิศาสตร์ที่เพิ่มขึ้นและอาจมาจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เช่น แม่น้ำขนาดใหญ่ โดยภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีแม่น้ำที่สำคัญคือแม่น้ำชีและแม่น้ำมูล ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคต่อการไหลยีน (Monsen & Blouin, 2004; Heike Pröhl et al., 2010; Spear, Peterson, Matocq, & Storer, 2005) ของระหว่างทั้งสอง clades โดยมักพบในพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Pröhl et al., 2010) อย่างไรก็ตามการศึกษาในอนาคตควรหาตัวอย่างจากพื้นที่เพิ่มจากช่องว่างทางภูมิศาสตร์ที่ยังขาด และทำการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสัณฐานวิทยาอีกครั้งเพื่อกำหนดช่วงการกระจายแท้จริงของประชากรกลุ่ม clades A และ B นอกจากนี้ยังต้องการข้อมูลด้านนิเวศวิทยาเนื่องจากเป็นกลไกที่จำกัดความสามารถในการแพร่กระจายของประชากรของอึ่งปากขวด

4.2.2 การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดในประเทศไทย

การศึกษาพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเส้นละติจูดกับสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดทั้งหมด 5 ตัวแปรคือ SVL, HW, HL, FL, TL โดยค่า HL และ TL นั้นสามารถอธิบายความแตกต่างของความสัมพันธ์ระหว่างเส้นละติจูดกับสัณฐานได้ดีที่สุด ในขณะที่ SVL, HW และ FL ก็สามารถอธิบายถึงความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ในแนวเส้นละติจูดต่ำกว่า 15 องศาเหนือ อย่างไรก็ตามในกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ในแนวเส้นละติจูด 15-18 องศาเหนือ และแนวเส้นละติจูดตั้งแต่ 18 องศาเหนือขึ้นไป นั้นไม่พบที่มีความแตกต่างระหว่าง SVL, HW และ FL ของทั้งสองกลุ่ม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอุณหภูมิในประเทศไทยที่ (ภาพ 19) มีบางช่วงของฤดูหรืออุณหภูมิในระหว่างปีที่มีความใกล้เคียงกัน ส่งผลให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างออกได้อย่างชัดเจน ซึ่งอึ่งปากขวดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการที่เป็นไปตามกฎของ Bergmann ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานของ (Valenzuela-Sánchez, Cunningham, & Soto-Azat, 2015) ที่อ้างถึงถึงฤดูกาลที่ยาวนาน น่าจะส่งผลต่อขนาดตัวที่ใหญ่ขึ้นเนื่องจากมีอัตราการเผาผลาญ (metabolic rate) ลดต่ำลง ทำให้การสูญเสียพลังงานต่ำลงตามไปด้วย ส่งผลต่อการแปรผันทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบการกระจายตัวของประชากร ซึ่งส่วนใหญ่ปัญหานี้จะได้รับการอธิบายด้วยปัจจัยทางภูมิประเทศและสภาพแวดล้อม อาจมีความสำคัญต่อการแปรผันทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบการกระจายตัวของประชากรได้ ซึ่งจากการศึกษาของ (Laojumpon et al., 2012) พบว่าความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดนั้นมีความสัมพันธ์ของอุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน และความชื้นสัมพันธ์ มากกว่าการขวางกั้นทางภูมิศาสตร์ (geographic Barrier) ด้วยภูเขาสูงและแม่น้ำ สอดคล้องกับผลการศึกษาทางพันธุกรรม ทำให้อึ่งปากขวดมีความแตกต่างทั้งขนาดและรูปร่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ในแนวเส้นละติจูด 15-18 องศาเหนือ และแนวเส้นละติจูดตั้งแต่ 18 องศาเหนือขึ้นไป มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ เนื่องจากภูมิประเทศเป็นภูเขาสูง อากาศหนาวเย็น ซึ่งทำให้มีสภาพอากาศที่แตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างที่อยู่ในแนวเส้นละติจูดต่ำกว่า 15 องศาเหนือ ซึ่งมีพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ราบและสภาพอากาศแห้งอุณหภูมิค่อนข้างสูง

บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของโครงสร้างและประชากรอึ่งปากขวด *G. molossus* ในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ การศึกษาเบื้องต้นพบว่าเทือกเขาภูพานไม่ได้มีอิทธิพลต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรอึ่งปากขวด เป็นไปได้ว่าการไหลของยีนอาจมาจากความสามารถของอึ่งปากขวดที่มีแหล่งที่อยู่อาศัยหลากหลาย และระดับพื้นที่ที่มีความสูง (120-488 เมตร) ซึ่งแตกต่างกันของชนิดป่าในที่ราบจนถึงยอดเขา รวมทั้งพฤติกรรมการวางไข่และการพัฒนาของแหล่งน้ำชั่วคราวจากด้านบนสู่ด้านล่าง ประชากรที่แยกจากบรรพบุรุษจะมีแนวโน้มของความแปรผันของประชากรมากขึ้น (Cassel & Tammaru, 2003) เกิดการกระจายของยีน นอกจากนี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมจะเพิ่มมากขึ้นตามความห่างของระยะทางภูมิศาสตร์ (Funk et al., 2005) มีผลกระทบจากการลดลงและการไหลของยีนที่มีสัมพันธ์ทางภูมิศาสตร์ แต่ยังไม่แสดงผลมากพอในการแยกกลุ่ม ซึ่งไม่คล้องคล้อยกับงานวิจัยทางสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ (Laojumpon, Suteethorn, & Lauprasert, 2012) พบว่ามีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาในกลุ่มตัวอย่างประชากรในบริเวณเทือกเขาภูพานและได้อธิบายปัจจัยที่เกิดจากสภาพแวดล้อมมากกว่าลักษณะทางภูมิศาสตร์ จากความขึ้นและปริมาณน้ำฝนสัมพันธ์ที่มีความแตกต่างกันส่งผลต่อความแปรผันทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้รูปแบบการกระจายตัวของอึ่งปากขวดนั้นยังขึ้นอยู่กับพืชพันธุ์ และความแปรปรวนของฤดูกาลยังเป็นอีกปัจจัยสำคัญ (Ashton, Feldman, May, & Feldman, 2003) การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลที่แต่ละภูมิภาคของประเทศไทยไม่พร้อมกันจึงอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโต ระยะเวลาของฤดูผสมพันธุ์และการหาอาหารอย่างจำกัดของอึ่งปากขวดได้ ส่งผลต่อขนาดลำตัวของอึ่งปากขวด (Degani, Goldberg, Gasith, Elron, & Nevo, 2013; Liao, Zhou, Yang, Hu, & Lu, 2010) ความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดในประเทศไทยมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับแนวเส้นละติจูด

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่าจำนวนตัวอย่างยังมีจำนวนน้อยและการเก็บตัวอย่างในช่วงฝนแรกของฤดูฝนทำให้ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างในพื้นที่เป็นไปอย่างจำกัด นอกจากนี้เป็นการศึกษาภายในประชากรเพียงชนิดเดียวอาจไม่สามารถอธิบายปัจจัยทางภูมิศาสตร์ได้อย่างชัดเจน ควรมีการสุ่มเก็บจำนวนตัวอย่างและพื้นที่พบการกระจายของอึ่งปากขวดเพิ่มเติมจากภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง เพื่อให้ครอบคลุมการแพร่กระจายของอึ่งปากขวดและการศึกษาสายพันธุ์อื่นมาเปรียบเทียบ รวมทั้งการนำเทคนิคทางโมเลกุลอื่นมาช่วยอธิบายข้อมูล และการศึกษาสัณฐานวิทยา เชิงลึก เช่น การศึกษาอายุเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของกระดูกในการเจริญเติบโต (เทคนิค skeletochronology) การศึกษาความสัมพันธ์ของสัณฐานวิทยากับระดับความสูง (Altitude) เพื่ออธิบายการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม รวมทั้งพฤติกรรม และนิเวศวิทยาของอึ่งปากขวดได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้นในอนาคต เพื่อตรวจสอบสถานภาพของสปีชีส์ต่อไป



บรรณานุกรม



ถาวร สุภาพรม วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร. (2535). การศึกษาจำนวนโครโมโซม และคาร์โบไฮเดรตของอึ่งปากขวดและปาดบ้าน. In รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30 สาขาเศรษฐศาสตร์และบริหารธุรกิจ สังคมศาสตร์ ศึกษาศาสตร์ มนุษยศาสตร์ สิ่งแวดล้อม คหกรรมศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. Retrieved from

http://kukr.lib.ku.ac.th:80/proceedings/KUCON/search_detail/exportBibTex/5407

ธวัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รังษิรุจิ. (2548). คาร์โบไฮเดรตของเซลล์ตับในกบภูเขา เขียดบัว เขียด กาญจนบุรี เขียดน้ำนอง และอึ่งเพ้า. In การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 43: (pp. 544–551). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. Retrieved from http://kukr.lib.ku.ac.th:80/db/BKN/search_detail/exportBibTex/9357

ธัญญา จั่นอาจ. (2546). คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย. กรุงเทพมหานคร:

บริษัทด้านสุทธนาการพิมพ์.

บงอร แถวโนนจิว อภิเดช แสงดี และสัญญา สุภจันทร์. (2549). ความหลากหลายชนิดและเครื่องหมาย ทางพันธุกรรมของปูนา ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

วรรณวิภา คงเจริญ และจารุจินต์ นภิตะภัก. (2550). ความหลากหลายชนิดและการแพร่กระจายตามระดับ ความสูงของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก บริเวณห้วยลำตะคองในอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่. วารสาร สัตว์ป่าเมืองไทย, 14(1), 113–128. Retrieved from

http://kukr.lib.ku.ac.th:80/db/kukr/search_detail/exportBibTex/35689

วิเชษฐ คนชื่อ. (2553). การประมาณอายุของอึ่งปากกระโดนและอึ่งอ่างหลังขีดที่เป็นอาหารโดยใช้ เทคนิค Skeletochronology และแนวทางในการอนุรักษ์. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุน สนับสนุนการวิจัย.

วีรยุทธ์ เลาะห์จินดา. (2552). วิทยาสัตวเลื้อยคลานและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก. กรุงเทพฯ:

สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุจิตรา จางตระกูล. (2551). การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและไอโซเอนไซม์ยีนเพื่อการประเมินสถานภาพแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้. สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. Retrieved from <https://books.google.co.th/books?id=I2lKcgAACAAJ>

อนันต์ เคนท้าว และพรพิมล เจียรน้อยปริเปรม. (2553). การประยุกต์ใช้ระบบเครือข่ายโครงยึดเพื่อระบุกลุ่มประชากรทางการประมงด้วยเทคนิคมัลติโมर्फเมตริกซ์ หลายตัวแปร: กรณีศึกษาในกลุ่มประชากรปลาช่อน (*Channa striata*) จากแหล่งภูมิศาสตร์ที่ต่างกัน (pp. 619–630). การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 11 มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อนันต์ พุทธิยาสถาพร และธวัช ดอนสกุล. (2544). คาร์โบไฮเดรตของปลาวงศ์ไซไพรอนิตี 15 ชนิด ที่พบในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

Allen, D. J., Smith, K. G., & Darwall, W. R. T. (2012). *The status and distribution of freshwater biodiversity in Indo Burma*. IUCN, Cambridge, UK and Gland, Switzerland. Retrieved from <https://portals.iucn.org/library/node/10212>

Altig, R., & Rowley, J. J. L. (2014). The breeding behavior of *Glyphoglossus molossus* and the tadpoles of *Glyphoglossus molossus* and *Calluella guttulata* (Microhylidae). *Zootaxa*, 3811(3), 381–386. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3811.3.9>

Anurukpongsathon, R. (2010). *Habitat Relations to Abundance of 4 Burrowing Frogs (Kaloula pulchra, K. mediolineata, Calluella guttulata, Glyphoglossus molossus) in Sakaerat Environmental Research Station, Nakhon Ratchasima Province*. Kasetsart University.

Ashton, K. G. (2001). BODY SIZE VARIATION AMONG MAINLAND POPULATIONS OF THE WESTERN RATTLESNAKE (*CROTALUS VIRIDIS*). *Evolution*, 55(12), 2523–2533.

<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00766.x>

Ashton, K. G., Feldman, C. R., May, N., & Feldman, R. (2003). Bergmann's Rule in Nonavian Reptiles: Turtles Follow It, Lizards and Snakes Reverse It BERGMANN'S rule in nonavian reptiles: turtles follow it , lizards and snakes reverse it, 57(5), 1151–1163.

Babik, W., Branicki, W., Sandera, M., Litvinchuk, S., Borkin, L. J., Irwin, J. T., & Rafinski, J. (2004). Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology*, 13(6), 1469–1480. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02157.x>

Bandelt, H.-J., Peter Forster, and A. R., & ïhl. (1999). Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology*, 16(1), 37–48.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>

Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Review TRENDS in Ecology and Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>

Blouin, M. S., Phillipsen, I. C., & Mosen, K. J. (2010). Population structure and conservation genetics of the Oregon spotted frog, *Rana pretiosa*. *Conservation Genetics*, 11(6), 2179–2194. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0104-x>

Bowsher, J. H. (2000). *Intraspecific genetic variation in New Zealand's endemic frog, *Leiopelma hochstetteri**. University of Canterbury. Zoology. Retrieved from

<https://ir.canterbury.ac.nz/handle/10092/6950>

Brown, M. B., & Forsythe, A. B. (1974). *Robust tests for the equality of variances.*

Journal of the American Statistical Association (Vol. 69).

<https://doi.org/10.1080/01621459.1974.10482955>

Cassel, A., & Tammaru, T. (2003). Allozyme variability in central, peripheral and isolated populations of the scarce heath (Coenonympha: Lepidoptera, Nymphalidae): implications for conservation. *Conservation Genetics*, 4(1), 83–93.

Danaisawat, P., Pradatsundarasan, A., & Khonsue, W. (2010). Morphological characters of some tadpole from Khao Sip Ha Chan proposed national Park, Chanthaburi province. *Journal of Wildlife in Thailand*, 17(1), 64–103. Retrieved from message:%3COF3B63EEAE.C4A476DA-ON48257A75.001EBF29-48257A75.001EA9F6@unimas.my%3E%5Cnpapers2://publication/uuid/F1E6AE28-CDC6-47DD-8DCD-4C6D666C3098

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772–772.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Degani, G., Goldberg, T., Gasith, A., Elron, E., & Nevo, E. (2013). DNA variations of the green toad *Pseudepidalea viridis* (syn. *Bufo viridis*) from various habitats.

Zoological Studies, 52(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1810-522X-52-18>

Dunnnett, C. W. (1955). A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association*, 50(272), 1096. <https://doi.org/10.2307/2281208>

Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>

Farjallah, S., Amor, N., Merella, P., & Said, K. (2012). Pattern of genetic diversity of North African green frog *Pelophylax saharicus* (Amphibia) in Tunisia. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(4), 901–907.

Feng, X., Chen, W., Hu, J., & Jiang, J. (2015). Variation and Sexual Dimorphism of Body Size in the Plateau Brown Frog along an Altitudinal Gradient. *Asian Herpetological Research*, 6(4), 291–297.

<https://doi.org/10.16373/j.cnki.ahr.150027>

Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915–925.

<https://doi.org/genetics.org//147/2/915>

Funk, W. C., Blouin, M. W., Corn, P. S., Maxell, B. A., Pilliod, D. S., Amish, S., & Allendorf, F. W. (2005). Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology*, 14(2), 483–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02426.x>

Grant, W. S., & Bowen, B. W. (1998). *Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation*. *The American Genetic Association* (Vol. 89).

Retrieved from

<https://pdfs.semanticscholar.org/7a16/7f39e62354c15e9f243398891c9a615d5bfc.pdf>

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.

<https://doi.org/citeulike-article-id:691774>

Hasan, M., Islam, M. M., Khan, M. M. R., Igawa, T., Alam, M. S., Djong, H. T., Sumida, M. (2014). Genetic divergences of South and Southeast Asian frogs: A case study of several taxa based on 16S ribosomal RNA gene data with notes on the generic name *Fejervarya*. *Turkish Journal of Zoology*, *38*(4), 389–411.

<https://doi.org/10.3906/zoo-1308-36>

Kate-ngam, S. (2003). DNA Markers in Plant Breeding. *Journal of Ubon Ratchathanu University*, *5*(2).

Khonsue, W., & Thirakhupt, K. (2001). A Checklist of the Amphibians in Thailand.

Tropical Natural History, *1*(1), 69–82. Retrieved from <https://www.tci-thaijo.org/index.php/tnh/article/view/102875>

Kurabayashi, A., Matsui, M., Belabut, D. M., Yong, H. Sen, Ahmad, N., Sudin, A., Sumida, M. (2011). From Antarctica or Asia? New colonization scenario for Australian-New Guinean narrow mouth toads suggested from the findings on a mysterious genus *Gastrophrynoides*. *BMC Evolutionary Biology*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-175>

Laojumpon, C., Suteethorn, S., & Komsorn Lauprasert. (2012). Morphological Variation of Truncate-Snouted Burrowing Frog (*Glyphoglossus molossus*) of Thailand. In *The 4th Science Research Conference. 12-13 March 2012. Faculty of Science, Naresuan University.*

Leary, C. J., Fox, D. J., Shepard, D. B., & Garcia, A. M. (2005). Body size, age, growth and alternative mating tactics in toads: Satellite males are smaller but not younger than calling males. *Animal Behaviour*, *70*(3), 663–671.

<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.12.013>

- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances In Ingram Olkin. In *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling* (pp. 278–292). Stanford University Press.
- Liao, W. B., Zhou, C. Q., Yang, Z. So., Hu, J. C., & Lu, X. (2010). Age, size and growth in two populations of the dark- spotted frog *Rana nigromaculata* at different altitudes in southwestern China. *Herpetological Journal*, 20(April 2014), 77–82.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Liedtke Maiditsch, I., Ng'wava, J., H. C. (2011). A bioacoustic and morphometric account of Albertine Rift litter frog, *Artholeptis schubotzi* (Amphibia: Anura). *Tropical Biology Association*, (Vonesh 2001), 1–14.
- Matsui, M., Ito, H., Shimada, T., Ota, H., Saidapur, S. K., Khonsue, W., Wu, G.-F. (2005). Taxonomic Relationships within the Pan-Oriental Narrow-mouth Toad *Microhyla ornata* as Revealed by mtDNA Analysis (Amphibia, Anura, Microhylidae). *Zoological Science*, 22(4), 489–495. <https://doi.org/10.2108/zsj.22.489>
- Meiri, S., & Dayan, T. (2003). On the validity of Bergmann's rule. *Journal of Biogeography*, 30, 331–351. Retrieved from http://132.66.16.6/lifesci/zoology/members/dayan_files/articles/on_the_validity.pdf
- Miaud, C., Guyétant, R., & Elmberg, J. (1999). Variations in life-history traits in the common frog *Rana temporaria* (Amphibia: Anura): a literature review and new data from the French Alps. *Journal of Zoology*, 249(1), 61–73.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1999.tb01060.x>

Monsen, K. J., & Blouin, M. S. (2004). Extreme isolation by distance in a montane frog *Rana cascadae*. *Conservation Genetics*, 5(6), 827–835.

<https://doi.org/10.1007/s10592-004-1981-z>

Moriarty, E. C., & Cannatella, D. C. (2004). Phylogenetic relationships of the North American chorus frogs (*Pseudacris: Hylidae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(2), 409–420. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00186-6](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00186-6)

Nakvijit, P. (2011). Breeding of the Blunt – headed Burrowing Frog (*Glyphoglossus molossu* Gunther, 1869). Lamphun Inland Fisheries Research and Development Center.

Ngo, A. Da. (2008). *The search for genetic structure and patterns in Vietnamese frogs*. University of Toronto.

Palo, J. U., & Merilä, J. (2003). A simple RFLP method for identification of two rapid frogs. *Conservation Genetics*, 4(6), 801–803.

<https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000006117.43571.6e>

Pansook, A., Khonsue, W., Piyapattanakorn, S., & Pariyanonth, P. (2012). Phylogenetic Relationships among *Hoplobatrachus rugulosus* in Thailand as Inferred from Mitochondrial DNA Sequences of the Cytochrome- *b* Gene (Amphibia, Anura, Dicroglossidae). *Zoological Science*, 29(1), 54–59.

<https://doi.org/10.2108/zsj.29.54>

Patrelle, C., Ohst, T., Picard, D., Pagano, A., Sourice, S., Dallay, M., & Plötner, J. (2010).

A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 200–205.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02905.x>

Pfeiler, E., & Markow, T. A. (2008). Phylogenetic relationships of leopard frogs (*Rana pipiens* complex) from an isolated coastal mountain range in southern Sonora, Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), 343–348.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.06.011>

Phochayavanich, R., Thirakhupt, K., & Voris, C. H. (2008). Species diversity and abundance of amphibians in stream flow across forest and agricultural habitats at Phu Luang Wildlife Sanctuary, Loei province. *Journal of Wildlife in Thailand*, 15(1), 17–28.

Pröhl, H., Ron, S. R., & Ryan, M. J. (2010). Ecological and genetic divergence between two lineages of Middle American tungara frogs *Physalaemus* (= *Engystomops*) *pustulosus*. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 6–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-146>

Pröhl, H., Ron, S. R., & Ryan, M. J. (2010). Ecological and genetic divergence between two lineages of Middle American tungara frogs (*Physalaemus pustulosus*). *BMC Evolutionary Biology*, 10, 146–164.

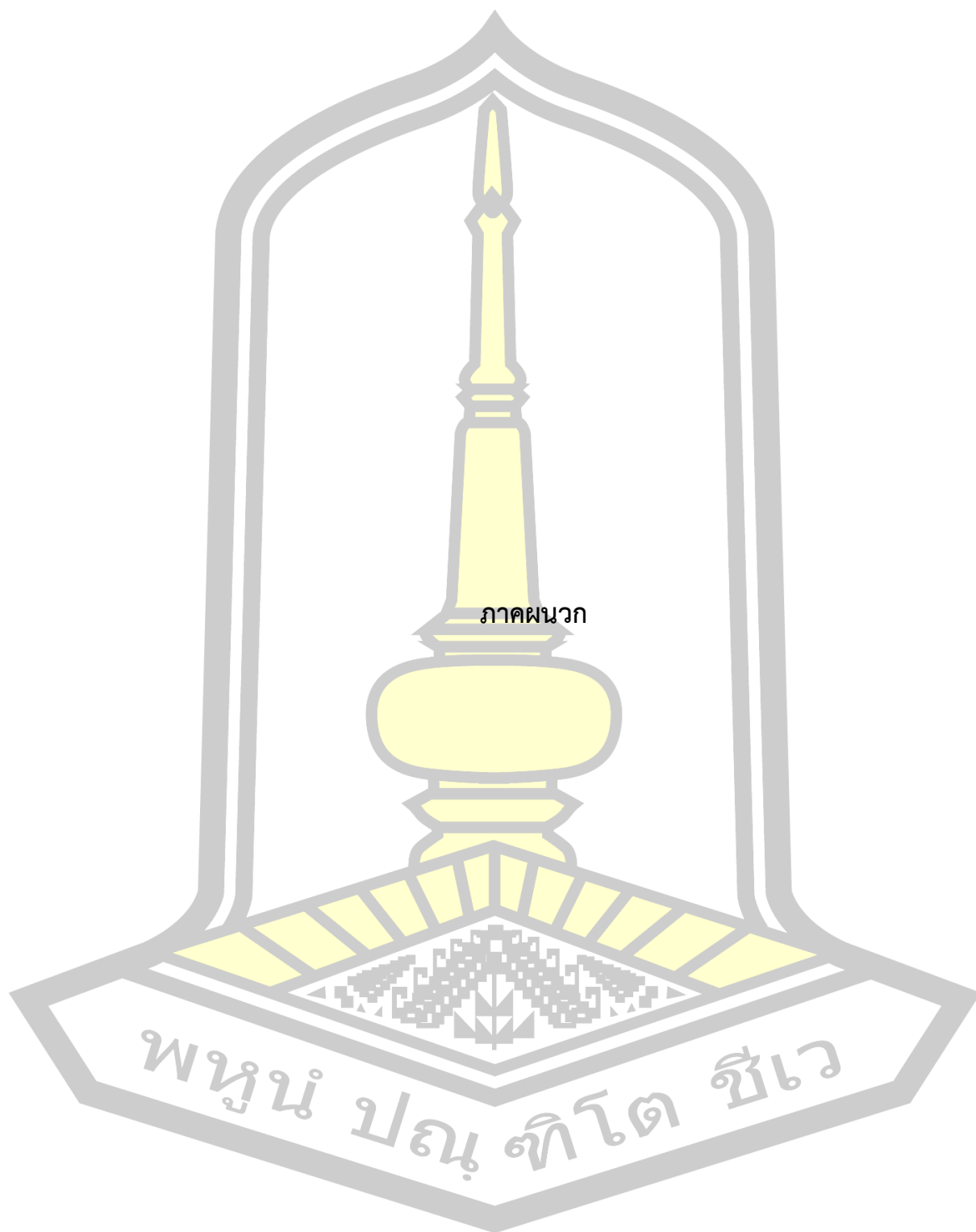
Relyea, R. A. (2002). Local population differences in phenotypic plasticity: predator induced changes in wood frog tadpoles. *Ecological Monographs*, 72(1), 77–93.
[https://doi.org/10.1890/0012-9615\(2002\)072\[0077:LPDIPP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(2002)072[0077:LPDIPP]2.0.CO;2)

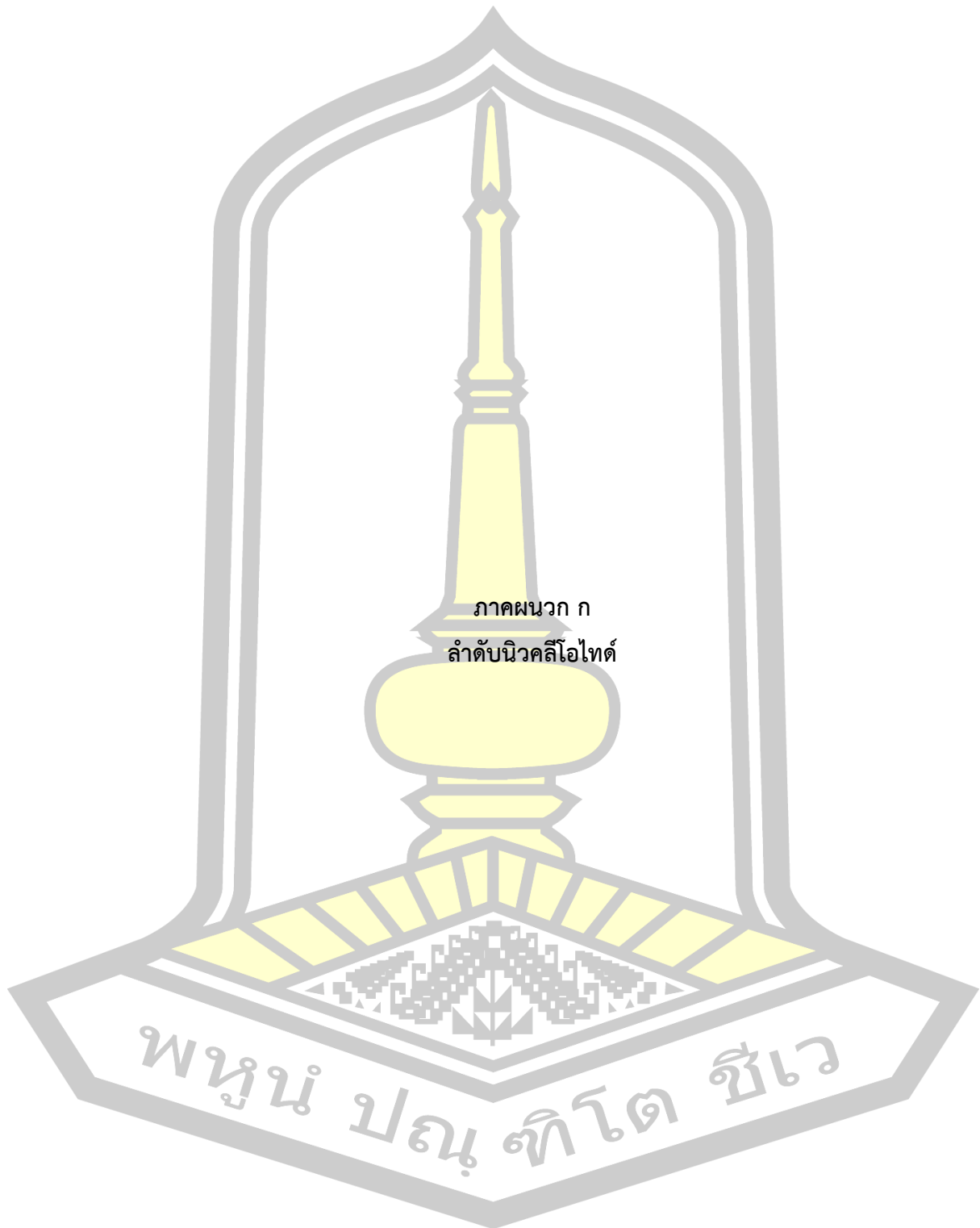
Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3), 552–569. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040727>

Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>

- Ryser, J. (1996). Comparative life histories of a low- and a high-elevation population of the common frog *Rana temporaria*. *Amphibia-Reptilia*, 17(3), 183–195. <https://doi.org/10.1163/156853896X00379>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591. <https://doi.org/10.2307/2333709>
- Sommanustweechai, A., Wongsakorn, S., Siriaroonrat, B., Kamolnorrart, S., Sailasutra, A., & Abstract, N. P. (2010). Chytridiomycosis': Emerging Infectious Disease in Amphibians. *The Journal of Thai Veterinary Practitioners*, 24(4), 15–23.
- Soonthornvipat, S., & Soonthornvipat, P. (2011). Breeding and Nursing of Truncate-Snouted Spadefoot Frog, *Glyphoglossus molossus* (Gunther, 1869). Phayao Inland Fisheries Research and Development Bureau.
- Spear, S. F., Peterson, C. R., Matocq, M. D., & Storfer, A. (2005). Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Molecular Ecology*, 14(8), 2553–2564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02573.x>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595. <https://doi.org/PMC1203831>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tanaka-Ueno, T., Matsui, M., Chen, S.-L. S., Takenaka, O., & Ota, H. (1998). Phylogenetic relationships of brown frogs from Taiwan and Japan assessed by mitochondrial cytochrome b gene sequences (Rana: Ranidae). *Zoological Science*, 288, 283–288. <https://doi.org/10.2108/zsj.15.283>

- Thongtip, N., Boonnontae, S., Wajjwalku, W., Mahasawankul, S., Angkawanish, T., & Jansittiwate, S. (2003). Haplotypes of Asian Elephant (*Elephas maximus*) in Thailand Based on Cytochrome b Gene. *Kamphaengsaen Acad*, 1(1), 33–39.
- Thy, N., & Eastoe, T. (2010). *An Investigation into Frog Consumption and Trade in Cambodia. Fauna & Flora International Cambodia Programme.*
- Tryjanowski, P., Sparks, T., Rybacki, M., & Berger, L. (2006). Is body size of the water frog *Rana esculenta* complex responding to climate change? *Naturwissenschaften*, 93(3), 110–113. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0085-2>
- Valenzuela-Sánchez, A., Cunningham, A. A., & Soto-Azat, C. (2015). Geographic body size variation in ectotherms: effects of seasonality on an anuran from the southern temperate forest. *Frontiers in Zoology*, 12(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12983-015-0132-y>
- Yodthong, S., Siler, C. D., Prasankok, P., & Aowphol, A. (2014). Phylogenetic patterns of the southeast Asian tree frog *Chiromantis hansenae* in Thailand. *Asian Herpetological Research*, 5(3), 179–196. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1245.2014.00179>
- Zhan, A., Li, C., & Fu, J. (2009). Big mountains but small barriers: Population genetic structure of the Chinese wood frog (*Rana chensinensis*) in the Tsinling and Daba Mountain region of northern China. *BMC Genetics*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-17>





ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยีน Cytochrome b ของอึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*)

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอึ่งปากขวด ทั้งหมด 9 แหฟโฟไทป์

>H1

CAATAGCATTCTCCTCCGTCGCTCATATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTTCTGC
GCAACCTACATGCCAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATTTGCATCTACCTCCACATCGGCC
GCGGCCTCTATTATGGCTCTTATATATTCAAAGAGACATGGAACATTGGAGTAATTCTAC
TTTTTTTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTGGGCTACGTCCTACCGTGAGGACAAATATCCT
TCTGAGGAGCAACAGTAATTACTAATCTCCTATCCGCAGCACCATATATCGGAACAGACT
TAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTCGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
CATTCCACTTTATTCTACCGTTCATTATCGCCGGAGCAAGCATAATCCACCTTCTTTCC
TTCACCAAACAGGTTTCATCAAATCCAACCTGGATTAACCCAAACCCAGACAAAATCCCAT
TCCATGCCTATTACTCATACAAAGATGCCTTCGGATTTGCCATTCTTCTAGCCGCCCTTG
CCTCTTTATCTGCCTTTGCCCTAACATTCTGGGCGACCCAGACAACCTTACCCAGCAA
ACCCTCTAGTCACTCCACCCACATTA

>H2

CAATAGCATTCTCCTCCGTCGCTCATATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTTCTGC
GCAACCTACATGCCAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATTTGCATCTACCTCCACATCGGCC
GCGGCCTCTATTATGGCTCTTATATATTCAAAGAGACATGGAACATTGGAGTAATTCTAC
TTTTTTTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTGGGCTACGTCCTACCGTGAGGACAAATATCCT
TCTGAGGAGCAACAGTAATTACTAATCTCCTATCCGCAGCACCATATATCGGAACAGACT
TAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTCGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
CATTCCACTTTATTCTACCGTTCATTATCGCCGGAGCAAGCATAATCCACCTTCTTTCC
TTCACCAAACAGGTTTCATCAAACCCAACCTGGATTAACCCAAACCCAGACAAAATCCCAT
TCCATGCCTATTACTCATACAAAGATGCCTTCGGATTTGCCATTCTTCTAGCCGCCCTTG
CCTCTTTATCTGCCTTTGCCCTAACATTCTGGGCGACCCAGACAACCTTACCCAGCAA
ACCCTCTAGTCACTCCACCCACATTA

>H3

CAATAGCATTCTCCTCCGTCGCTCACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTTCTGC
 GCAATCTACATGCCAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATTTGCATCTACCTCCACATCGGCC
 GCGGCCTCTATTATGGCTCTTATATATTCAAAGAGACATGGAACATTGGAGTAATTCTAC
 TTTTTTTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTGGGCTACGTCCTACCGTGAGGACAAATATCCT
 TCTGAGGAGCAACAGTAATTAATAATCTCCTATCCGCAGCACCATATATCGGAACAGACT
 TAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTCGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
 CATTCCACTTTATTCTACCGTTCATTATCGCCGGAGCAAGCATAATCCACCTTCTCTTCC
 TTCACCAAACAGGTTTCATCAAATCCAACCTGGATTAAACCCAAACCCAGACAAAATCCCAT
 TCCATGCCTATTACTCATACAAAGATGCCTTCGGATTTGCCATTCTTCTAGCCGCCCTTG
 CCTCTTTATCTGCCTTTGCCCCAACATTCTGGGCGACCCAGACAACTTTACCCCAGCAA
 ACCCCCTAGTCACTCCTCCCCACATTA

>H4

CAATAGCATTCTCCTCCGTCGCTCACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTTCTGC
 GCAACCTACATGCCAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATTTGCATCTACCTCCACATCGGCC
 GCGGCCTCTATTATGGCTCTTATATATTCAAAGAGACATGGAACATTGGAGTAATTCTAC
 TTTTTTTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTGGGCTACGTCCTACCGTGAGGACAAATATCCT
 TCTGAGGAGCAACAGTAATTAATAATCTCCTATCCGCAGCACCATATATCGGAACAGACT
 TAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTCGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
 CATTCCACTTTATTCTACCGTTCATTATCGCCGGAGCAAGCATAATCCACCTTCTCTTCC
 TTCACCAAACAGGTTTCATCAAATCCAACCTGGATTAAACCCAAACCCAGACAAAATCCCAT
 TCCATGCCTATTACTCATACAAAGATGCCTTCGGATTTGCCATTCTTCTAGCCGCCCTTG
 CCTCTTTATCTGCCTTTGCCCCAACATTCTGGGCGACCCAGACAACTTTACCCCAGCAA
 ACCCCCTAGTCACTCCTCCCCACATTA



>H5

CAATAGCATTCTCCTCCGTCGCTCACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTTCTGC
 GCAACCTACATGCCAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATTTGCATCTACCTCCACATTGGCC
 GCGGCCTCTATTATGGCTCTTATATATTCAAAGAGACATGGAACATTGGAGTAATTCTAC
 TTTTTTTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTGGGCTACGTCCTACCGTGAGGACAAATATCCT
 TCTGAGGAGCAACTGTAATTACTAACCTCCTATCCGCAGCACCATATATCGGAACAGACT
 TAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTCGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
 CATTCCACTTTATTCTACCGTTCATTATCGCCGGAGCAAGCATAATCCACCTTCTCTTCC
 TTCACCAAACAGGTTTCATCAAATCCAACCTGGATTAAACCCAAACCCAGACAAAATCCCAT
 TCCATGCCTATTACTCATACAAAGATGCCTTCGGATTTGCCATTCTTCTAGCCGCCCTTG
 CCTCTTTATCTGCCTTTGCCCCAACATTCTGGGCGACCCAGACAACTTTACCCCAGCAA
 ACCCCCTAGTCACTCCTCCCCACATTA

>H6

CAATAGCATTCTCCTCCGTCGCTCACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTTCTGC
 GCAACCTACATGCCAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATTTGCATCTACCTCCACATCGGCC
 GCGGCCTCTATTATGGCTCTTATATATTCAAAGAGACATGGAACATTGGAGTAATTCTAC
 TTTTTTTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTGGGCTACGTCCTACCGTGAGGACAAATATCCT
 TCTGAGGAGCAACAGTAATTACTAACCTCCTATCCGCAGCACCATATATCGGAACAGACT
 TAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTCGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
 CATTCCACTTTATTCTACCGTTCATTATCGCCGGAGCAAGCATAATCCACCTTCTCTTCC
 TTCACCAAACAGGTTTCATCAAATCCAACCTGGATTAAACCCAAACCCAGACAAAATCCCAT
 TCCATGCCTATTACTCATACAAAGATGCCTTCGGATTTGCCATTCTTCTAGCCGCCCTTG
 CCTCTTTATCTGCCTTTGCCCCAACATTCTGGGCGACCCAGACAACTTTACCCCAGCAA
 ACCCCCTAGTCACTCCTCCCCACATTA



>H7

CAATAGCATTCTCCTCCGTCGCTCACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTTCTGC
 GCAACCTACATGCCAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATTTGCATCTACCTCCACATCGGCC
 GCGGCCTCTATTATGGCTCTTATATATTCAAAGAGACATGGAACATTGGAGTAATTCTAC
 TTTTTTTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTGGGCTACGTCCTACCGTGAGGACAAATATCCT
 TCTGAGGAGCAACAGTAATTAATACTCCTATCCGCAGCACCATATATCGGAACAGACT
 TAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTCGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
 CATTCCACTTTATTCTACCGTTCATTATCGCCGGAGCAAGCATAATCCACCTTCTCTTCC
 TTCACCAAACAGGTTTCATCAAATCCAACCTGGATTAAACCCAAACCCAGACAAAATCCCAT
 TCCATGCCTATTACTCATACAAAGATGCCTTCGGATTTGCCATTCTTCTAGCCGCCCTTG
 CCTCTTTATCTGCCTTTGCCCCAACATTCTAGGGCGACCCAGACAACCTTACCCCAGCAA
 ACCCCCTAGTCACTCCTCCCCACATTA

>H8

CAATAGCATTCTCCTCCGTCGCTCACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTTCTGC
 GCAACCTACATGCCAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATTTGCATCTACCTCCACATTGGCC
 GCGGCCTCTATTATGGCTCTTATATATTCAAAGAGACATGGAACATTGGAGTAATTCTAC
 TTTTTTTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTGGGCTACGTCCTACCGTGAGGACAAATATCCT
 TCTGAGGAGCAACAGTAATTAATACTCCTATCCGCAGCACCATATATCGGAACAGACT
 TAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTCGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
 CATTCCACTTTATTCTACCGTTCATTATCGCCGGAGCAAGCATAATCCACCTTCTCTTCC
 TTCACCAAACAGGTTTCATCAAATCCAACCTGGATTAAACCCAAACCCAGACAAAATCCCAT
 TCCATGCCTATTACTCATACAAAGATGCCTTCGGATTTGCCATTCTTCTAGCCGCCCTTG
 CCTCTTTATCTGCCTTTGCCCCAACATTCTGGGCGACCCAGACAACCTTACCCCAGCAA
 ACCCCCTAGTCACTCCTCCCCACATTA



>H9

CAATAGCATTCTCCTCCGTCGCTCACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTTCTGC
 GCAACCTACATGCCAACGGCGCCTCATTCTTCTCATTGTCATCTACCTCCACATCGGCC
 GCGGCCTCTATTATGGCTCTTATATATTCAAAGAGACATGGAACATTGGGGTAATTCTAC
 TCTTTTTAGTAATAGCCACAGCTTTTGTGGGCTACGTCCTACCGTGAGGACAAATATCCT
 TCTGAGGAGCAACAGTAATTACTAATCTCCTATCCGCAGCACCATATATCGGAACAGACT
 TAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTTCTCAGTCGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
 CATTCCATTTTATTTTGCCGTTTATTATCGCCGGAGCAAGCATAATCCACCTTCTCTTCC
 TTCATCAAACAGGTTTCATCAAATCCAACCTGGATTAAACCCAAACCCAGACAAAATCCCAT
 TCCATGCCTATTACTCATACAAAGATGCCTTCGGATTTGCCATTCTTCTAGCCGCCCTTG
 CCTCTTTATCTGCCTTTGCCCTAACATTCTGGGCGACCCAGACAACCTTACCCAGCAA
 ACCCCCTAGTCACTCCACCCACATTA

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Kaloula pulchra*

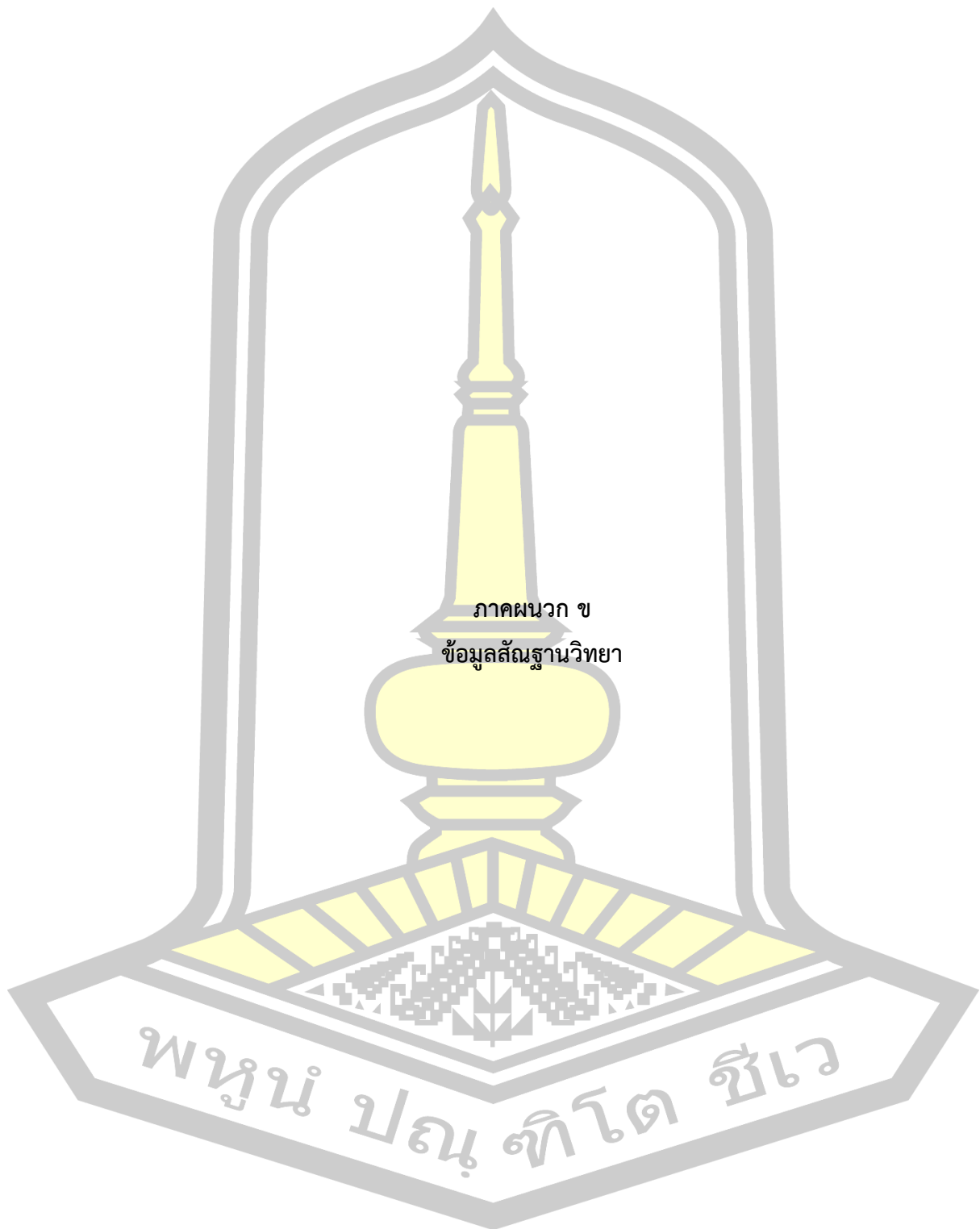
>AB819033.1 *Kaloula pulchra* mitochondrial cytochrome b

TATTTTCGTCTAAGTGCAACTACGGATGACTTCTACGCCCCACATGGCAACGGGCTTCATTTTC
 TTTATTTGTATCTACCTGCACATCGGACGAGGCCTATACTACGGCTCATACTGTACAAAGAAA
 CATGAAACATTGGGGTTATCCTTCTATTCTAGTCATAGCCACAGCCTTTGTAGGCTACGTCCT
 GCCTTGAGGACAAATATCATTCTGGGGGGCAACAGTGATCACCAATCTACTATCAGCAGCCCCA
 TACATTGGCACTGACCTAGTACAATGAATCTGAGGGGGCTTCTCAGTAGACAATGCTACCCTAA
 CACGATTTTTTACATTTCACTTCATTCTACCATTATTGTCAGGAGCCAGCATAATCCACTTA
 TTATTCCTACATCAAACAGGCTCAACCAACCCAAACAGGCCTTAATGCCAACCCAGACAAAATCC
 CATTCCATGCCTACTACTCGTACAAAGACGCCTTCGGCTTTGCCATTCTCCTAGCAGCCCTGGC
 CTCCCTATCAACCTTGGGCCAAACATCCTGGAGGACCCAGAACCACTTCA

>AB530639.1 Kaloula pulchra mitochondrial genes for 16S rRNA

GCACTTCGCTTACACCGAAATCATGTCTGTTAACTCAGATCATTTTTGAGCCTAAAACCCAGCC
CGACCATCGCAACTTATGTTAACCCAATTCTCTATTTTACCAAATAAAACATTTTCAACATTTAG
TAAAGGCGATTAAAAATGTCTAGGAGCCCTACAAATAGTACCGCAAGGGAAATGTGAAATAAT
AATGAAATAACTTTAAAGCACAAAAAAGCAGAGATTCAACCTCGTACCTTTTGCATCATGGTCTA
GCTAGTCCAACCAAGCAAAAAGAAATTTAAGTTTGACCCCCGAAACTAAGCGAGCTACTTCAA
AACAGCCTTATAGGGCCAACCCGTCTCTGTTGCAAAGAGTGGAAGATTTTCAAGTAGAGGTG
ATAAACCTACCGAGCTTAGAGATAGCTGGTTATTCAAGAAAAGGATCTAAGTCCTACCTTAAAT
CAATACAGTAATAATAAATACATTAACAGATTTAAGAGCTATTCAAATAAGGTACAGCCTATTTG
AAACAGGATACAACCTAAACAACAGGGTAATGAAATCAAATACGTAACCTAAGTGGGCCTAAGAG
CAGCCATCTTTTAAAAGCGTTAAAGCTTAATTACTTATTTATATTAATTCCACTAACCAATCAA
AACCTTATCCAGTATTGAATGATTCCATAACCATATGGAAAACCGTATGCTAGAACTAGTAATA
AGAAGAAGACCTTCTCCAAAATACAAGTGTGAGCCGAAATGAACAACCTCATCGGCACTTAACGT
AAATGAACCCAAAGTAGTAACAAAACAAGAAAATTCTACTACACAATACGTCAACCTTACACTA
GAGTATTACTGGAAAGATTAAGAAGAAAGGAAGGAACCTCGGCAAATCATCAACCCCGCTGTTT
ACCAAAAACATCGCCTCTTGACAAAATATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACG
GCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATG
AATGGCATCACGAGGGTTGCACTGTCTCCCCTTTTTAATCAATGAAACTGACCTCCCCGTGAAG
AGGCGGGGATATAACTATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGTATCAACCGCCT
ACAACACATCATTACAATTTGGCAGATCTGATTACTAGTTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAAAGGACCTATACTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCAAAGAATC
AAAAAACTGACATAAATTGATCCAATTAATTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACA
GCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT
ATCCCAGTGGTGCA

พูน ปณ ทิโต ชีเว



ข้อมูลพื้นฐานวิทยา

ตารางข้อมูลพื้นฐานวิทยาภายนอก

Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
	PY-001	60.75	26.50	21.45	6.70	15.90	25.75	15.90
	PY-002	67.80	27.30	24.90	6.65	15.80	27.55	15.80
	PY-003	59.10	23.55	19.50	5.95	13.30	24.70	13.30
	PY-004	56.65	25.75	19.60	6.30	16.25	24.00	16.25
	PY-005	61.20	28.55	22.80	8.15	16.70	24.50	16.70
	PY-006	65.10	24.25	21.35	8.30	15.15	27.80	15.15
	PY-007	56.00	21.35	18.90	6.65	14.90	22.50	14.90
	PY-008	58.20	23.65	23.60	7.30	12.90	22.10	12.90
PY	PY-009	69.10	23.10	20.25	7.00	15.30	25.70	15.30
	PY-010	59.30	26.10	20.70	6.60	14.70	23.30	14.70
	PY-011	58.85	24.50	19.50	7.75	11.70	26.10	11.70
	PY-012	62.10	25.40	25.25	7.30	17.30	25.00	17.30
	PY-013	55.95	26.70	20.65	6.60	16.90	26.50	16.90
	PY-014	60.45	25.20	22.10	6.55	16.50	25.60	16.50
	PY-015	62.55	24.50	20.85	7.50	16.85	24.65	16.85
	PY-016	61.10	25.00	21.10	5.10	12.80	24.80	12.80
	PY-017	61.10	27.10	22.10	6.90	16.95	25.45	16.95
	LPN-01	69.12	18.29	23.80	7.13	13.13	25.20	13.13
LP	LPN-02	59.25	19.48	18.42	8.06	14.37	22.30	14.37
	LPN-03	53.29	19.21	19.95	9.37	7.47	23.02	7.47
	LPN-04	64.39	20.17	25.11	6.97	13.00	26.53	13.00

ตารางข้อมูลพื้นฐานวิทยาภายนอก (ต่อ)

Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
	LPN-05	63.85	19.54	24.29	8.40	11.55	25.54	11.55
	LPN-06	68.07	18.83	24.19	7.07	11.66	24.58	11.66
	LPN-07	56.25	28.40	23.25	6.35	13.65	22.45	13.65
	LPN-08	59.75	26.50	17.70	6.85	13.60	21.50	13.60
LP	LPN-09	56.30	19.45	20.85	7.70	14.65	24.10	14.65
	LPN-10	56.75	22.90	17.30	6.80	13.20	22.10	13.20
	LPN-11	54.35	22.70	21.45	7.60	13.90	22.45	13.90
	LPN-12	57.80	21.10	20.00	8.20	12.70	23.60	12.70
	LPN-13	58.55	24.50	12.00	7.30	12.85	23.55	12.85
	LA6	61.41	17.60	16.71	4.45	13.86	23.45	36.26
	LA7	69.55	22.69	16.23	5.32	12.83	25.61	40.10
	LA8	65.59	19.65	16.08	5.23	12.20	24.68	36.72
	LA9	62.39	21.24	16.99	5.33	12.42	23.13	32.08
LA	LA10	66.32	21.97	17.69	5.66	13.19	24.08	36.74
	LA11	50.95	19.69	15.24	4.76	11.65	21.81	35.41
	LA12	71.34	26.61	17.73	6.62	16.83	28.04	41.96
	LA13	64.03	23.70	16.04	4.64	15.10	24.44	38.40
	LA14	57.50	19.70	15.05	5.30	15.68	24.84	36.69
	LA15	60.59	20.18	16.44	5.41	13.34	24.49	37.29
	NK3	68.51	22.57	21.28	4.79	13.95	25.93	42.81
NK	NK4	53.76	20.22	18.26	5.28	14.45	24.07	39.15
	NK5	62.57	22.13	20.06	5.04	12.87	24.34	42.03

ตารางข้อมูลสัณฐานวิทยาภายนอก (ต่อ)

Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
NK	NK11	60.08	21.46	17.76	4.79	12.75	25.25	37.50
	NK12	60.42	21.97	19.09	5.41	12.77	25.19	36.70
	NK13	61.62	23.95	20.02	4.85	13.98	28.10	40.21
	NK14	52.92	22.15	14.83	4.77	11.56	24.82	34.43
	NK15	67.20	21.07	17.47	4.12	17.44	26.95	37.69
	NK16	58.66	22.83	21.08	5.63	14.82	25.96	41.67
	NK17	69.28	20.53	16.81	4.64	14.34	24.50	38.70
	NK18	57.69	20.04	16.73	5.14	16.13	24.95	38.17
	Nk19	63.48	20.23	18.03	4.28	16.27	27.25	40.43
	NK20	69.50	24.77	21.64	5.10	16.52	27.63	40.12
PMR2	SN 1	65.41	26.72	21.30	6.02	17.21	23.78	41.90
	SN 2	54.04	23.71	15.17	4.55	15.23	20.42	33.77
	SN 3	62.86	29.22	17.84	5.25	14.75	20.83	35.89
	SN 4	57.96	23.47	17.21	3.29	14.03	23.69	35.81
	SN 5	58.95	24.51	13.98	4.87	14.71	19.72	32.18
	SN 6	65.00	26.13	17.69	5.24	14.46	21.88	36.16
	SN 7	64.41	28.19	19.36	5.33	13.88	18.89	37.32
	SN 8	60.45	27.14	20.45	5.28	15.02	21.75	34.79
	SN 9	68.92	21.51	19.03	5.13	16.00	20.42	33.05
	SN 10	54.54	24.05	13.37	4.62	14.53	19.37	29.42
	SN 11	63.67	27.90	21.15	6.09	14.66	25.93	39.53
	SN 12	54.60	21.92	18.32	6.02	12.21	20.19	26.59

ตารางข้อมูลพื้นฐานวิทยาภายนอก (ต่อ)

Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
	SN 13	65.15	28.41	19.82	5.42	16.08	23.82	37.80
	SN 14	56.33	26.07	19.68	5.68	14.36	21.49	34.55
	SN 15	63.00	26.14	22.15	5.31	13.88	21.81	31.96
	SN 16	61.13	22.21	20.49	4.66	13.05	21.13	34.75
	SN 17	65.03	24.71	21.19	5.83	10.51	20.26	34.43
	SN 18	53.20	25.40	17.39	5.67	13.92	20.35	32.22
	SN 19	54.72	26.01	17.20	4.90	16.03	22.52	34.58
	SN 20	56.00	22.93	19.10	5.10	13.70	19.49	32.31
PMR2	SN 21	62.06	30.09	21.65	5.91	17.24	23.88	39.90
	SN 22	57.00	23.46	15.06	5.53	15.86	21.62	33.48
	SN 23	61.43	23.83	16.03	4.37	14.90	20.64	34.72
	SN 24	57.26	24.64	18.50	5.86	15.42	23.76	38.18
	SN 25	58.73	26.87	18.54	4.81	14.23	20.58	33.45
	SN 26	61.64	22.09	17.93	5.43	13.47	23.46	36.58
	SN 27	58.04	22.63	18.23	4.74	13.62	21.65	36.80
	SN 28	53.05	21.80	14.65	4.92	11.74	18.59	31.59
	SN 29	56.22	23.14	16.73	4.60	15.10	22.74	38.56
	SN 30	71.27	26.20	19.24	6.18	16.56	26.04	41.42
	TK-001	62.72	26.82	22.32	6.99	11.68	22.11	11.68
TK	TK-002	57.81	25.07	12.52	5.89	12.85	19.23	12.85
	TK-003	53.41	25.42	16.69	5.69	14.12	21.92	14.12
	TK-004	51.13	22.17	17.10	6.73	13.07	20.91	13.07

ตารางข้อมูลสัณฐานวิทยาภายนอก (ต่อ)

Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
	TK-005	48.30	22.97	16.97	4.80	13.86	20.31	13.86
	TK-006	57.24	22.56	18.59	6.62	12.93	23.19	12.93
	TK-007	51.91	21.84	18.28	6.00	15.55	23.73	15.55
	TK-008	42.42	21.54	15.84	4.63	9.26	20.86	9.26
	TK-009	52.69	22.46	14.25	4.56	14.59	20.96	14.59
	TK-010	42.28	23.41	17.92	4.73	13.65	20.43	13.65
	TK-011	40.74	22.18	16.18	4.76	16.42	20.92	16.42
	TK-012	54.86	26.85	22.39	5.18	12.60	22.36	12.60
	TK-013	47.20	23.40	16.75	4.82	14.13	21.68	14.13
	TK-014	44.60	24.02	19.20	4.42	9.81	21.26	9.81
TK	TK-015	52.57	24.12	19.90	4.04	13.34	20.39	13.34
	TK-016	58.67	23.66	22.66	4.44	12.96	23.29	12.96
	TK-017	23.60	20.11	14.51	4.23	14.37	22.79	14.37
	TK-018	40.94	24.91	19.62	4.76	16.32	20.99	16.32
	TK-019	55.49	27.87	18.97	4.93	10.61	20.18	10.61
	TK-020	53.67	29.94	14.04	4.89	11.70	22.73	11.70
	TK-021	57.25	27.87	17.63	4.37	13.92	22.33	13.92
	TK-022	42.00	20.07	17.68	5.58	14.53	19.36	14.53
	TK-023	40.41	21.82	15.69	3.75	11.93	18.85	11.93
	TK-024	53.54	17.76	14.13	4.45	11.86	21.24	11.86
	TK-025	35.50	20.50	16.07	4.29	11.91	17.86	11.91
	TK-026	57.50	20.92	19.23	4.58	13.93	22.51	13.93

ตารางข้อมูลสัณฐานวิทยาภายนอก (ต่อ)

Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
TK	TK-027	70.24	30.36	23.72	7.94	18.97	23.96	18.97
	TK-028	61.41	24.73	19.18	6.31	19.44	24.36	19.44
	TK-029	54.79	28.94	18.78	7.30	17.56	22.65	17.56
	TK-030	53.56	20.45	19.87	4.52	12.58	21.74	12.58
	TK-031	54.69	19.02	16.67	4.87	14.78	19.10	14.78
	TK-032	56.39	17.63	15.74	5.66	12.36	20.35	12.36
PMR3	PN11	66.43	20.52	15.61	4.98	16.08	22.57	38.68
	PN02	66.59	19.84	20.53	7.21	16.26	19.83	36.58
	PN10	75.58	23.88	22.43	5.80	19.83	25.05	43.00
	PN07	72.20	19.44	20.37	5.78	19.54	26.54	48.85
	PN09	72.14	18.07	19.12	5.58	18.78	23.23	41.48
	PN14	63.14	19.02	16.27	5.62	16.66	19.23	34.86
	PN18	67.22	22.56	20.34	6.59	17.81	26.85	43.88
	PN01	76.59	22.28	19.87	5.60	16.11	24.96	41.60
	PN08	61.61	21.67	16.67	5.62	15.83	19.64	36.48
	PN12	72.08	20.37	20.05	4.96	16.98	26.52	41.57
	PN2-1	67.31	28.06	21.36	5.88	15.71	23.24	36.90
	PN2-2	58.98	27.53	16.34	4.76	15.45	22.87	37.48
PMR1	KL1	64.38	16.58	19.06	5.07	13.33	22.03	36.63
	KL2	56.02	23.31	22.71	5.07	12.69	22.15	38.67
	KL3	59.37	19.85	21.08	4.21	12.89	23.45	33.53
	KL4	50.40	23.66	18.60	4.31	11.62	21.83	40.94

ตารางข้อมูลสัณฐานวิทยาภายนอก (ต่อ)

Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
PMR1	KL5	59.17	24.15	20.82	4.81	12.66	20.13	37.80
	KL6	57.03	19.65	21.37	5.56	12.84	22.10	38.29
	KL7	55.78	16.83	14.90	5.74	13.34	22.98	35.58
	KL8	50.25	16.17	13.45	4.96	12.31	20.77	32.91
	KL9	57.87	18.06	16.19	4.98	12.91	22.53	39.15
	KL10	55.43	20.03	16.78	4.70	12.41	23.55	35.69
KK	KK1	53.30	16.21	15.05	4.76	12.33	21.85	33.10
	KK2	51.04	17.17	15.14	4.65	12.59	22.48	36.75
	KK3	60.41	20.27	18.21	5.48	14.42	20.88	33.45
	KK4	48.76	15.01	17.76	5.44	15.02	20.28	30.98
KS	KS3-18	55.59	20.16	14.43	5.84	16.28	19.41	32.71
	KS3-19	58.78	19.55	18.48	6.04	14.04	20.17	33.83
	KS3-23	62.53	16.46	16.16	4.85	14.76	20.24	32.62
	KS3-24	51.24	15.95	17.88	4.97	12.69	22.63	35.43
	KS3-26	56.17	19.48	22.54	4.71	16.13	19.87	38.15
	KS3-27	63.41	15.94	16.97	5.83	14.48	23.97	32.81
	KS3-28	62.17	18.47	19.90	5.65	14.39	22.66	39.24
	KS3-29	58.55	16.56	15.88	5.63	12.85	20.38	36.55
	KS3-31	56.64	16.76	19.51	5.81	16.28	19.67	36.61
	KS3-32	48.68	15.41	19.05	5.00	14.26	19.26	32.61
KRI-025	48.47	15.27	17.25	5.66	7.39	15.92	7.39	

ตารางข้อมูลพื้นฐานวิทยาภายนอก (ต่อ)

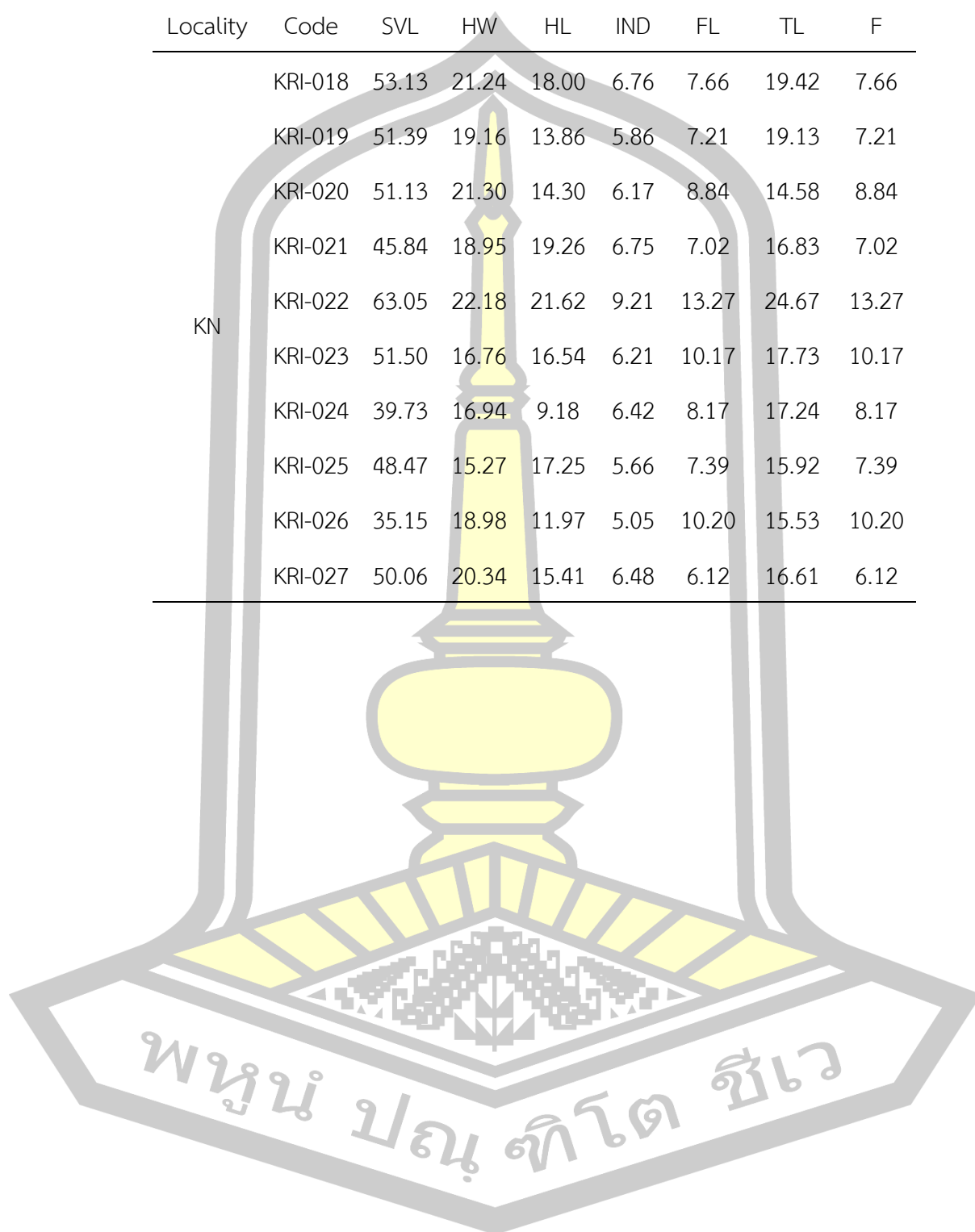
Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
PB	PB-003	40.05	19.50	29.19	7.29	12.97	23.99	12.97
	PB-004	46.99	15.68	21.91	6.96	11.68	19.66	11.68
MK	MK1	64.22	19.16	15.97	5.00	10.96	25.24	34.48
	MK2	55.85	17.11	13.58	4.29	9.96	19.69	35.22
	MK3	60.02	20.92	14.83	4.96	11.94	21.52	32.95
	MK4	53.24	16.10	14.35	4.93	11.02	18.56	29.70
	MK5	53.30	19.44	15.04	4.56	10.34	18.46	32.32
	MK6	62.66	22.72	20.58	4.82	14.14	23.89	38.53
	MK7	57.95	18.53	16.29	4.93	12.59	20.51	34.29
	MK8	41.38	15.74	15.59	4.43	11.70	19.32	29.92
	MK9	54.29	18.76	14.05	4.56	10.59	19.18	33.58
	MK10	54.78	18.52	15.12	5.25	11.88	19.84	34.22
UB	UR1	67.40	23.46	16.54	5.35	15.37	30.61	38.09
	UR3	61.54	20.94	19.34	4.86	13.48	25.39	38.75
	UR8	56.37	21.32	19.78	4.88	13.17	25.62	41.74
	UR9	53.77	17.21	17.96	5.10	13.75	20.41	33.95
	UR10	56.15	21.86	21.50	5.06	13.90	21.04	38.33
	UR11	58.01	21.38	20.54	5.12	12.31	22.66	40.62
	UR12	58.69	21.44	15.80	4.64	14.57	24.99	34.53
	UR13	60.08	23.11	20.36	4.78	13.43	23.78	36.77
	UR14	64.61	22.02	19.86	4.53	13.27	24.57	35.65
	UR15	58.74	22.76	16.85	5.09	11.69	22.35	33.39

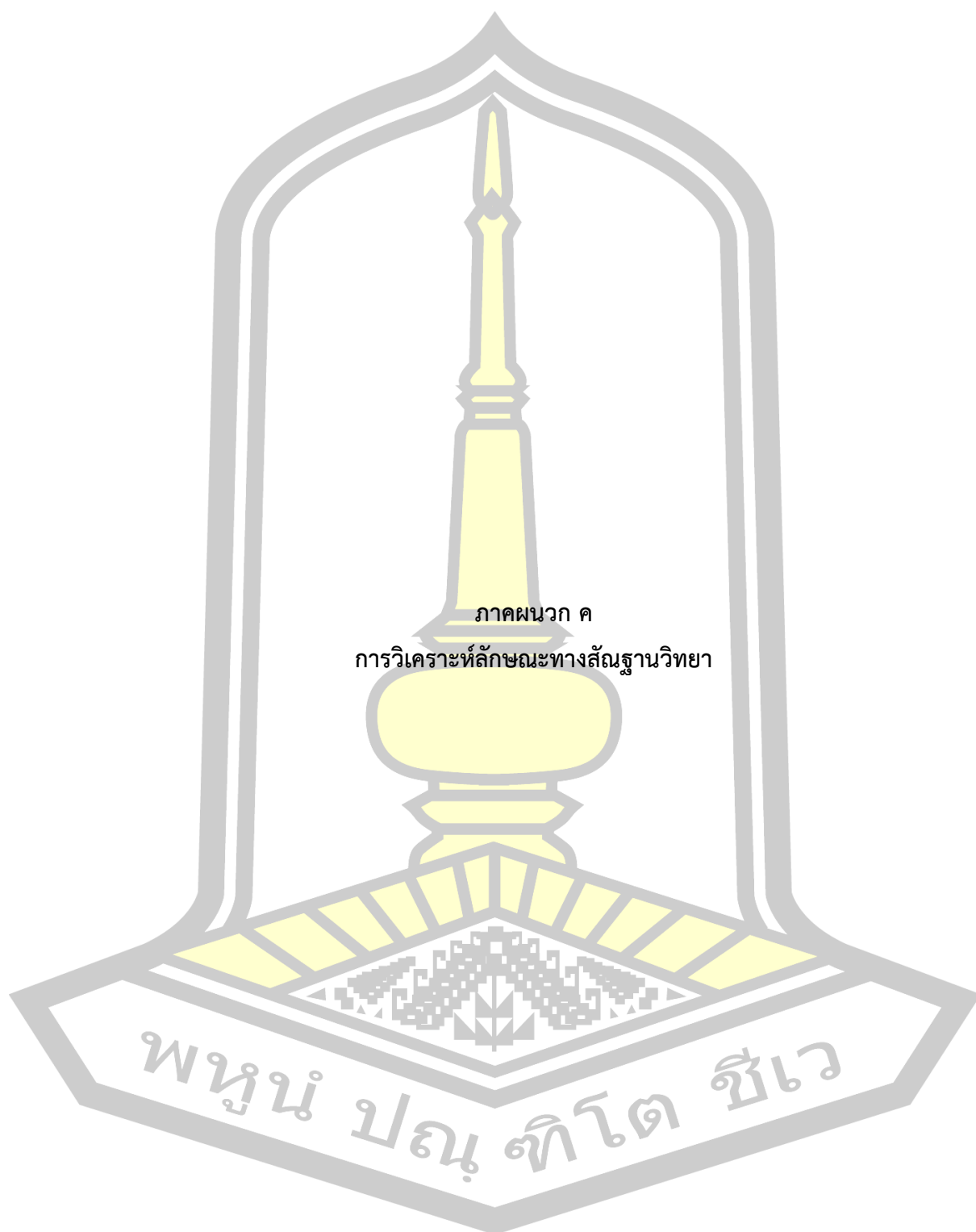
ตารางข้อมูลพื้นฐานวิทยาภายนอก (ต่อ)

Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
	UR16	64.45	19.16	18.89	5.14	11.64	24.48	36.39
	UR18	53.43	20.19	17.12	5.01	15.46	22.53	37.46
	UR19	53.58	18.72	16.43	5.00	11.50	21.85	35.57
UB	UR20	65.41	20.49	17.02	4.99	13.14	23.97	39.90
	UR22	60.00	21.09	17.11	5.05	12.76	21.30	34.93
	UR23	55.63	19.76	17.25	4.94	14.48	26.66	39.90
	UR24	63.56	22.72	16.17	5.04	11.53	21.79	37.08
	KRI-001	52.62	23.29	16.56	7.65	9.10	14.61	9.10
	KRI-002	45.52	19.60	10.79	8.72	10.25	15.82	10.25
	KRI-003	47.28	15.86	15.35	7.73	11.71	18.73	11.71
	KRI-004	52.76	19.35	17.93	7.81	11.04	21.79	11.04
	KRI-005	39.95	13.37	13.14	4.20	3.71	10.78	3.71
	KRI-006	45.71	18.27	11.50	7.06	8.58	16.14	8.58
	KRI-007	48.99	19.77	11.60	7.55	7.27	12.49	7.27
KN	KRI-008	42.27	17.64	12.61	6.56	11.11	17.97	11.11
	KRI-009	45.15	19.40	13.87	7.25	8.14	13.77	8.14
	KRI-010	41.15	14.47	8.72	6.33	8.72	15.37	8.72
	KRI-012	51.80	18.35	17.53	6.26	11.97	16.76	11.97
	KRI-014	42.15	14.95	17.45	7.19	11.14	17.24	11.14
	KRI-015	55.03	17.03	12.49	6.71	11.38	15.77	11.38
	KRI-016	35.75	16.68	17.90	7.55	9.38	16.43	9.38
	KRI-017	50.62	19.24	13.48	6.86	9.19	15.55	9.19

ตารางข้อมูลสัณฐานวิทยาภายนอก (ต่อ)

Locality	Code	SVL	HW	HL	IND	FL	TL	F
	KRI-018	53.13	21.24	18.00	6.76	7.66	19.42	7.66
	KRI-019	51.39	19.16	13.86	5.86	7.21	19.13	7.21
	KRI-020	51.13	21.30	14.30	6.17	8.84	14.58	8.84
	KRI-021	45.84	18.95	19.26	6.75	7.02	16.83	7.02
KN	KRI-022	63.05	22.18	21.62	9.21	13.27	24.67	13.27
	KRI-023	51.50	16.76	16.54	6.21	10.17	17.73	10.17
	KRI-024	39.73	16.94	9.18	6.42	8.17	17.24	8.17
	KRI-025	48.47	15.27	17.25	5.66	7.39	15.92	7.39
	KRI-026	35.15	18.98	11.97	5.05	10.20	15.53	10.20
	KRI-027	50.06	20.34	15.41	6.48	6.12	16.61	6.12





การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. สัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

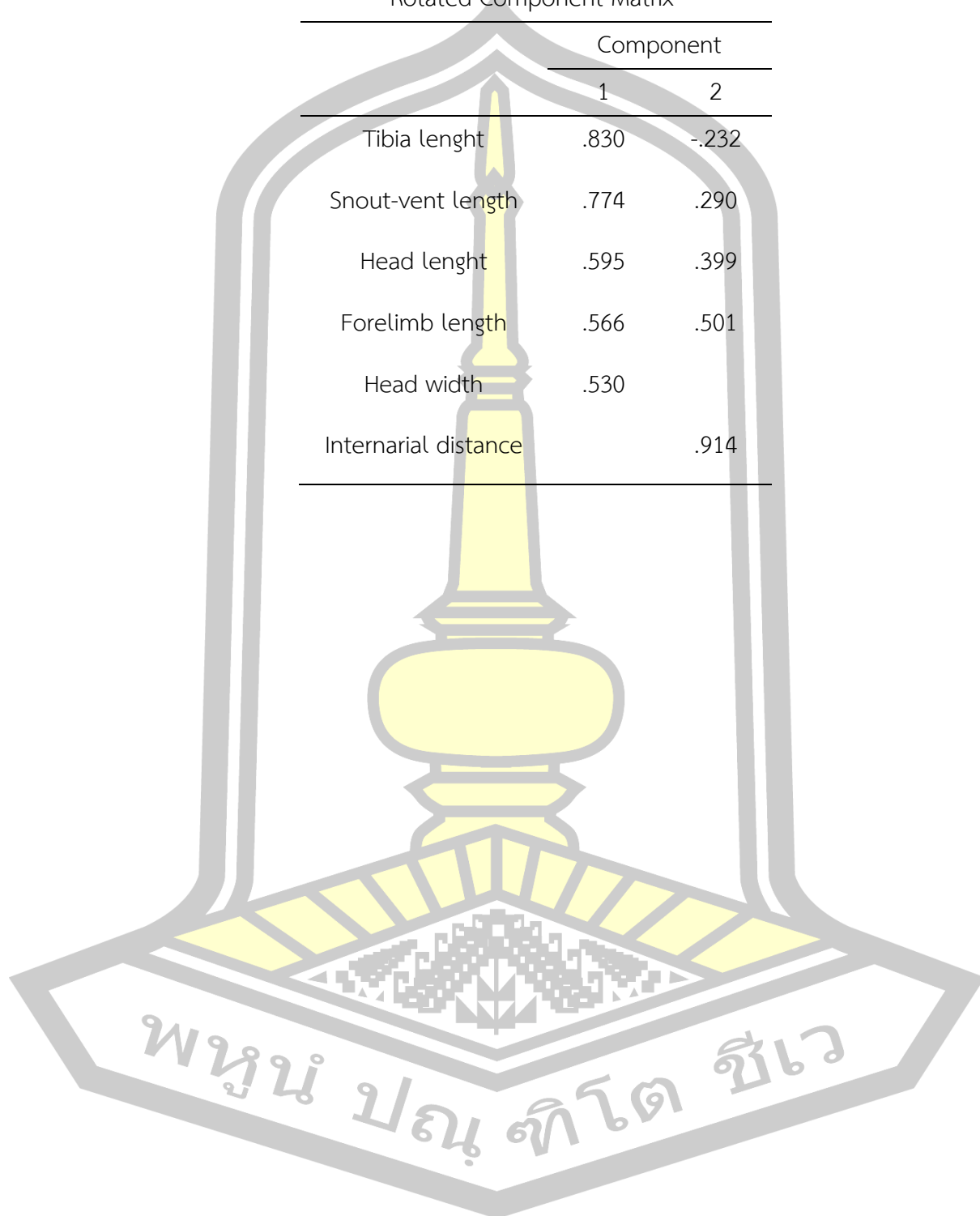
1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ

KMO and Bartlett's Test			
Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		.739	
Bartlett's Test of Sphericity	Approx. Chi-Square	139.870	
	df	15	
	Sig.	.000	

Total Variance Explained					
Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings	
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance
1	2.661	44.346	44.346	2.661	44.346
2	1.011	16.850	61.196	1.011	16.850
3	.852	14.193	75.389		
4	.629	10.485	85.874		
5	.451	7.517	93.391		
6	.397	6.609	100.000		

Rotated Component Matrix^a

	Component	
	1	2
Tibia length	.830	-.232
Snout-vent length	.774	.290
Head length	.595	.399
Forelimb length	.566	.501
Head width	.530	
Internarial distance		.914



2. การวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของอึ่งปากขวดในประเทศไทย

2.1 การวิเคราะห์ AMOVA

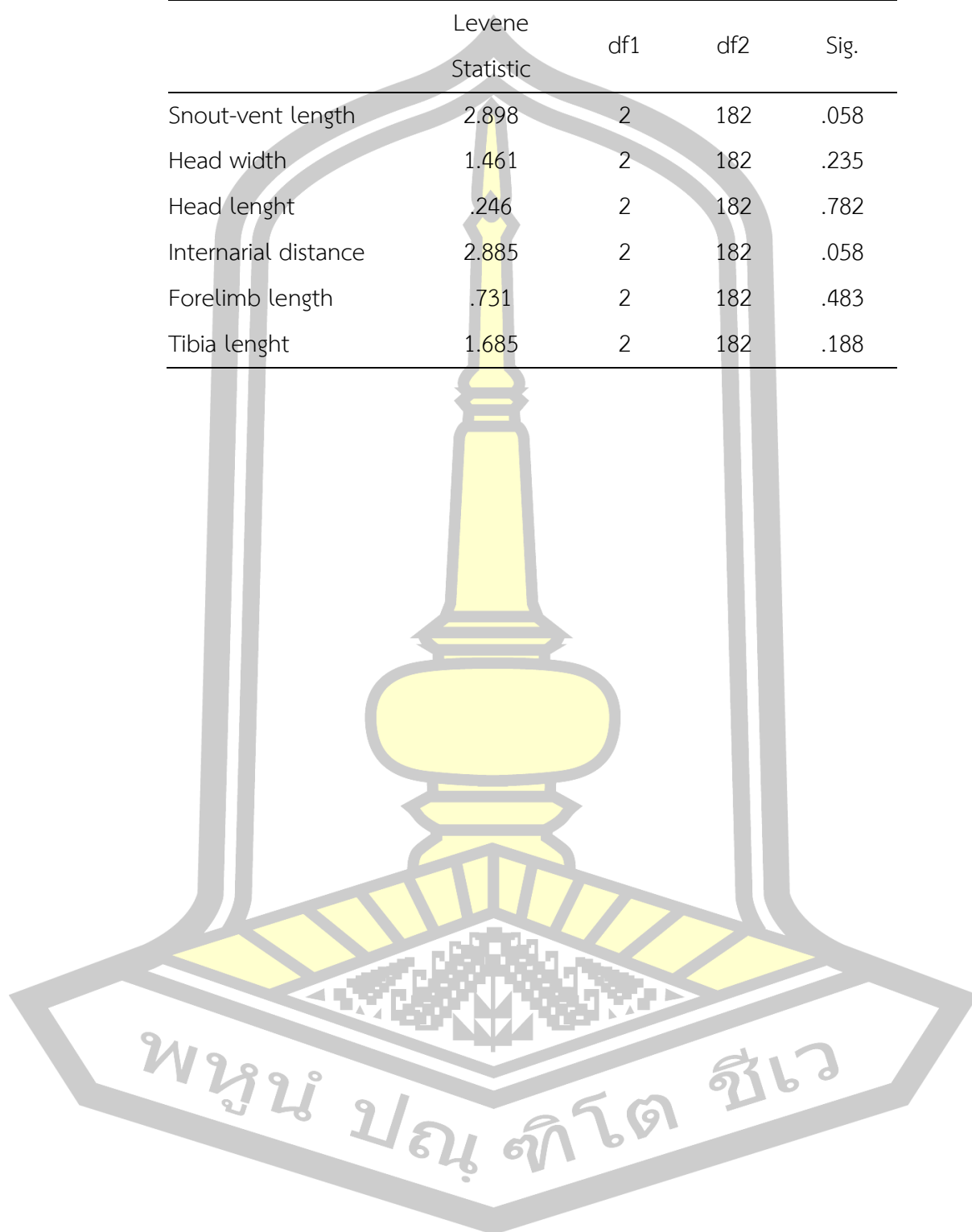
Tests of Normality							
Latitude	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
	<15	.108	25	.200*	.967	25	.565
SVL	15?-18	.115	130	.000	.942	130	.000
	>18	.129	30	.200*	.944	30	.120
	<15	.119	25	.200*	.985	25	.960
HW	15-18	.049	130	.200*	.988	130	.301
	>18	.112	30	.200*	.944	30	.119
	<15	.111	25	.200*	.977	25	.825
HL	15-18	.384	130	.000	.168	130	.000
	>18	.116	30	.200*	.928	30	.043
	<15	.117	25	.200*	.976	25	.788
IND	15-18	.125	130	.000	.922	130	.000
	>18	.106	30	.200*	.974	30	.642
	<15	.092	25	.200*	.979	25	.867
FL	15-18	.051	130	.200*	.989	130	.381
	>18	.111	30	.200*	.928	30	.044
	<15	.140	25	.200*	.941	25	.159
TL	15-18	.063	130	.200*	.978	130	.035
	>18	.109	30	.200*	.970	30	.549

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

 Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Snout-vent length	2.898	2	182	.058
Head width	1.461	2	182	.235
Head length	.246	2	182	.782
Internarial distance	2.885	2	182	.058
Forelimb length	.731	2	182	.483
Tibia length	1.685	2	182	.188



ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SVL	Between Groups	2563.243	2	1281.621	25.473	.000
	Within Groups	9157.061	182	50.314		
	Total	11720.304	184			
HW	Between Groups	431.035	2	215.518	20.685	.000
	Within Groups	1896.271	182	10.419		
	Total	2327.306	184			
HL	Between Groups	590.446	2	295.223	1.840	.162
	Within Groups	29200.036	182	160.440		
	Total	29790.482	184			
IND	Between Groups	137.347	2	68.674	109.649	.000
	Within Groups	113.987	182	.626		
	Total	251.334	184			
FL	Between Groups	467.041	2	233.521	62.137	.000
	Within Groups	683.986	182	3.758		
	Total	1151.027	184			
TL	Between Groups	915.391	2	457.695	85.311	.000
	Within Groups	976.433	182	5.365		
	Total	1891.823	184			



		Robust Tests of Equality of Means			
		Statistic ^a	df1	df2	Sig.
SVL	Welch	36.952	2	56.995	.000
	Brown-Forsythe	37.384	2	74.367	.000
HW	Welch	31.472	2	53.378	.000
	Brown-Forsythe	26.374	2	81.630	.000
HL	Welch	29.679	2	86.745	.000
	Brown-Forsythe	7.221	2	171.992	.001
IND	Welch	92.921	2	42.723	.000
	Brown-Forsythe	79.200	2	57.008	.000
FL	Welch	51.354	2	44.744	.000
	Brown-Forsythe	52.884	2	66.446	.000
TL	Welch	73.237	2	49.765	.000
	Brown-Forsythe	85.268	2	54.569	.000

a. Asymptotically F distributed.



Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) Latitude	(J) Latitude	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
SVL	Tukey HSD	<15	15-18	-9.69515*	1.54905	.000	-13.3556	-6.0347
			>18	-12.98600*	1.92085	.000	-17.5251	-8.4469
		15-18	<15	9.69515*	1.54905	.000	6.0347	13.3556
			>18	-3.29085	1.43671	.060	-6.6859	.1042
		>18	<15	12.98600*	1.92085	.000	8.4469	17.5251
			15-18	3.29085	1.43671	.060	-.1042	6.6859
	Dunnett T3	<15	15-18	-9.69515*	1.44868	.000	-13.3043	-6.0860
			>18	-12.98600*	1.50246	.000	-16.7212	-9.2508
		15-18	<15	9.69515*	1.44868	.000	6.0860	13.3043
			>18	-3.29085*	1.03415	.006	-5.8121	-.7696
		>18	<15	12.98600*	1.50246	.000	9.2508	16.7212
			15-18	3.29085*	1.03415	.006	.7696	5.8121
HW	Tukey HSD	<15	15-18	-3.98586*	.70492	.000	-5.6516	-2.3201
			>18	-5.31673*	.87411	.000	-7.3823	-3.2512
		15-18	<15	3.98586*	.70492	.000	2.3201	5.6516
			>18	-1.33087	.65380	.107	-2.8758	.2141
		>18	<15	5.31673*	.87411	.000	3.2512	7.3823
			15?-18	1.33087	.65380	.107	-.2141	2.8758
	Dunnett T3	<15	15-18	-3.98586*	.57409	.000	-5.4089	-2.5628
			>18	-5.31673*	.74011	.000	-7.1393	-3.4942
		15-18	<15	3.98586*	.57409	.000	2.5628	5.4089
			>18	-1.33087	.62870	.113	-2.8849	.2232
		>18	<15	5.31673*	.74011	.000	3.4942	7.1393
			15-18	1.33087	.62870	.113	-.2232	2.8849

Multiple Comparisons (ต่อ)

Dependent Variable	(I) Latitude	(J) Latitude	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
HL	Tukey HSD	<15	15-18	-4.46398	2.76618	.242	-11.0006	2.0726
			>18	-6.36460	3.43010	.155	-14.4701	1.7409
		15-18	<15	4.46398	2.76618	.242	-2.0726	11.0006
			>18	-1.90062	2.56557	.740	-7.9632	4.1619
		>18	<15	6.36460	3.43010	.155	-1.7409	14.4701
	15-18	1.90062	2.56557	.740	-4.1619	7.9632		
	Dunnett T3	<15	15-18	-4.46398*	1.46133	.008	-7.9910	-.9370
			>18	-6.36460*	.82386	.000	-8.4007	-4.3285
		15-18	<15	4.46398*	1.46133	.008	.9370	7.9910
			>18	-1.90062	1.40316	.442	-5.2863	1.4851
>18		<15	6.36460*	.82386	.000	4.3285	8.4007	
15-18	1.90062	1.40316	.442	-1.4851	5.2863			
IND	Tukey HSD	<15	15-18	1.67046*	.17283	.000	1.2621	2.0789
			>18	-.37000	.21431	.198	-.8764	.1364
		15-18	<15	-1.67046*	.17283	.000	-2.0789	-1.2621
			>18	-2.04046*	.16029	.000	-2.4192	-1.6617
		>18	<15	.37000	.21431	.198	-.1364	.8764
	15-18	2.04046*	.16029	.000	1.6617	2.4192		
	Dunnett T3	<15	15-18	1.67046*	.22208	.000	1.1084	2.2325
			>18	-.37000	.26323	.416	-1.0216	.2816
		15-18	<15	-1.67046*	.22208	.000	-2.2325	-1.1084
			>18	-2.04046*	.16684	.000	-2.4559	-1.6250
>18		<15	.37000	.26323	.416	-.2816	1.0216	
15-18	2.04046*	.16684	.000	1.6250	2.4559			

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Multiple Comparisons (ต่อ)

Dependent Variable	(I) Latitude	(J) Latitude	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
FL	Tukey HSD	<15	15-18	-4.51686*	.42336	.000	-5.5173	-3.5164
			>18	-5.03807*	.52497	.000	-6.2786	-3.7975
		15-18	<15	4.51686*	.42336	.000	3.5164	5.5173
			>18	-.52121	.39266	.382	-1.4491	.4067
	>18	<15	15-18	.52121	.39266	.382	-.4067	1.4491
			15-18	-4.51686*	.45737	.000	-5.6679	-3.3658
		15-18	<15	4.51686*	.45737	.000	3.3658	5.6679
			>18	-.52121	.42413	.531	-1.5768	.5344
	Dunnett T3	>18	<15	5.03807*	.58011	.000	3.6081	6.4681
			15-18	.52121	.42413	.531	-.5344	1.5768
		<15	15-18	-5.79972*	.50584	.000	-6.9950	-4.6044
			>18	-7.75547*	.62724	.000	-9.2377	-6.2733
Tukey HSD	15-18	<15	5.79972*	.50584	.000	4.6044	6.9950	
		>18	-1.95574*	.46915	.000	-3.0644	-.8471	
	>18	<15	7.75547*	.62724	.000	6.2733	9.2377	
		15?-18	1.95574*	.46915	.000	.8471	3.0644	
TL	Dunnett T3	<15	15-18	-5.79972*	.59548	.000	-7.2995	-4.2999
			>18	-7.75547*	.63710	.000	-9.3443	-6.1666
		15-18	<15	5.79972*	.59548	.000	4.2999	7.2995
			>18	-1.95574*	.36837	.000	-2.8602	-1.0512
	>18	<15	7.75547*	.63710	.000	6.1666	9.3443	
		15-18	1.95574*	.36837	.000	1.0512	2.8602	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบ

KMO and Bartlett's Test

Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		.698
Bartlett's Test of Sphericity	Approx. Chi-Square	290.871
	df	15
	Sig.	.000

Rotated Component Matrix^a

	Component	
	1	2
Tibia length	.848	
Forelimb length	.847	
Snout-vent length	.773	
Head width	.710	
Internarial distance		.931
Head length	.240	.343

Extraction Method: Principal Component Analysis.

Rotation Method: Varimax with Kaiser Normalization

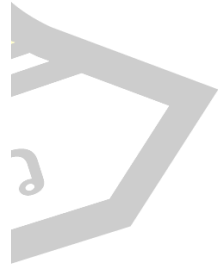
a. Rotation converged in 3 iterations

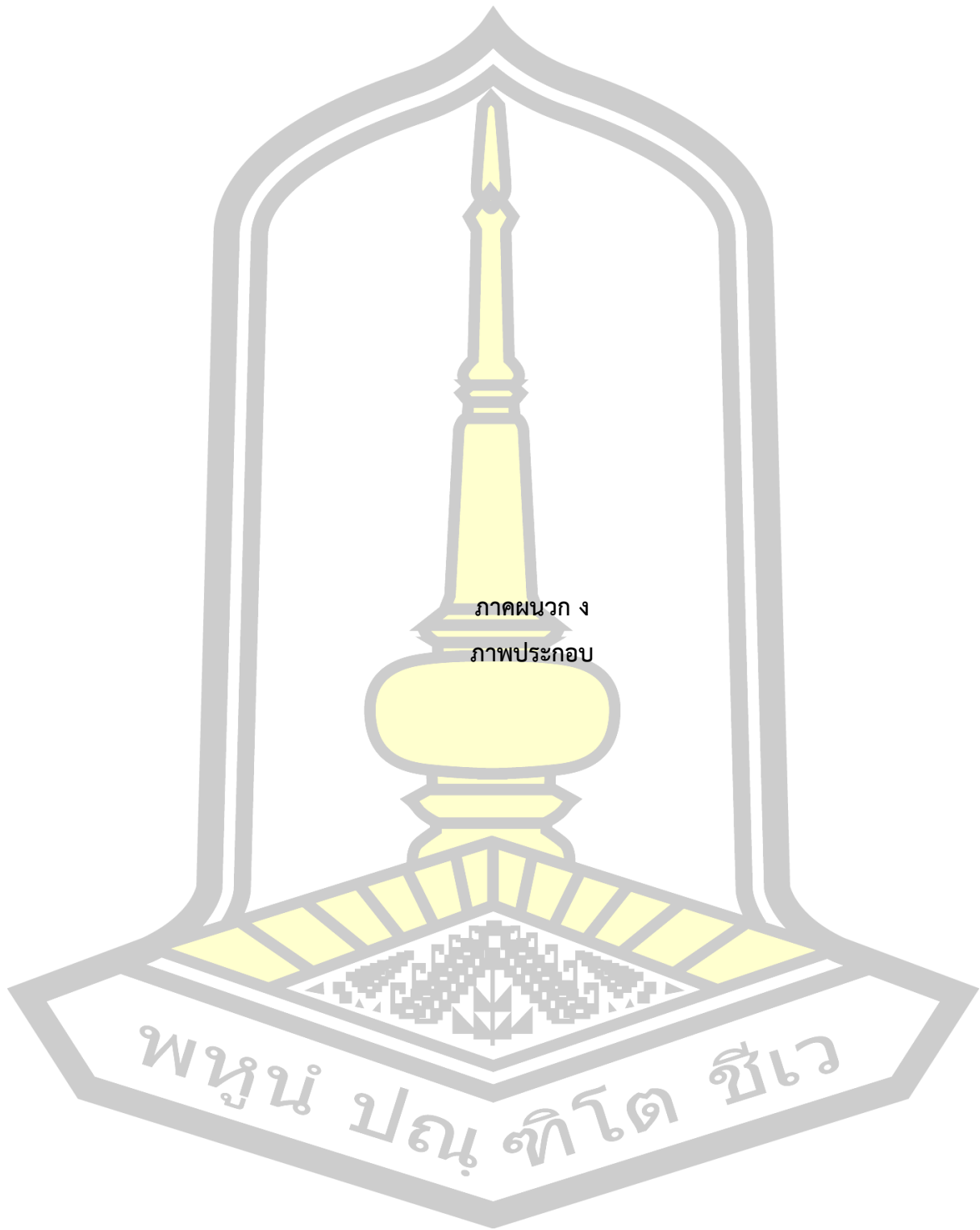
พหุ ประถมศึกษา



Total Variance Explained											
Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared			Rotation Sums of Squared				
	Total	% of Variance	Cumulative %	Loadings			Loadings				
				Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %		
1	2.633	43.878	43.878	2.633	43.878	43.878	2.609	43.488	43.488	2.609	43.488
2	1.025	17.088	60.966	1.025	17.088	60.966	1.049	17.479	60.966	1.049	17.479
3	.967	16.123	77.089								
4	.654	10.901	87.990								
5	.471	7.850	95.840								
6	.250	4.160	100.000								

Extraction Method: Principal Component Analysis.





ภาคผนวก ง
ภาพประกอบ

พูนูปถมนุทีโตชีเว

ภาพพื้นที่ภาคสนามบ้านน้ำจั้น ต.ตลาด อ.เมือง จ.มหาสารคาม



ภาพพื้นที่ภาคสนาม ต.พระพุทธบาท อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย



ภาพพื้นที่ภาคสนาม ภูน้อย อ.ภูพาน จ.สกลนคร



ภาพพื้นที่ภาคสนาม อ.เมือง จ.กาฬสินธุ์



ภาพพื้นที่ภาคสนาม วัดคำประมง อ.พรรณานิคม จ.สกลนคร



ภาพชาวบ้านนำอึ่งที่จับได้มาขายให้พ่อค้าส่ง อ.คำม่วง จ.กาฬสินธุ์



ภาพการเก็บตัวอย่างในภาคสนาม ภูน้อย อ.ภูพาน จ.สกลนคร



พูน ปณ ทัโต ชีเว

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายธเนศ นนท์ศรีราช
วันเกิด	วันที่ 2 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2533
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 25 ซอย 6/2 ถนนนครสวรรค์ ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2545 มัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนสารคามพิทยาคม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2550 มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนสารคามพิทยาคม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2554 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2562 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนสนับสนุนการวิจัยงบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พูนัน ปณุกิตโต ชีวะ