



ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอีงอังกั้นซีด (*Kaloula mediolineata* Smith, 1917) ใน
ประเทศไทย

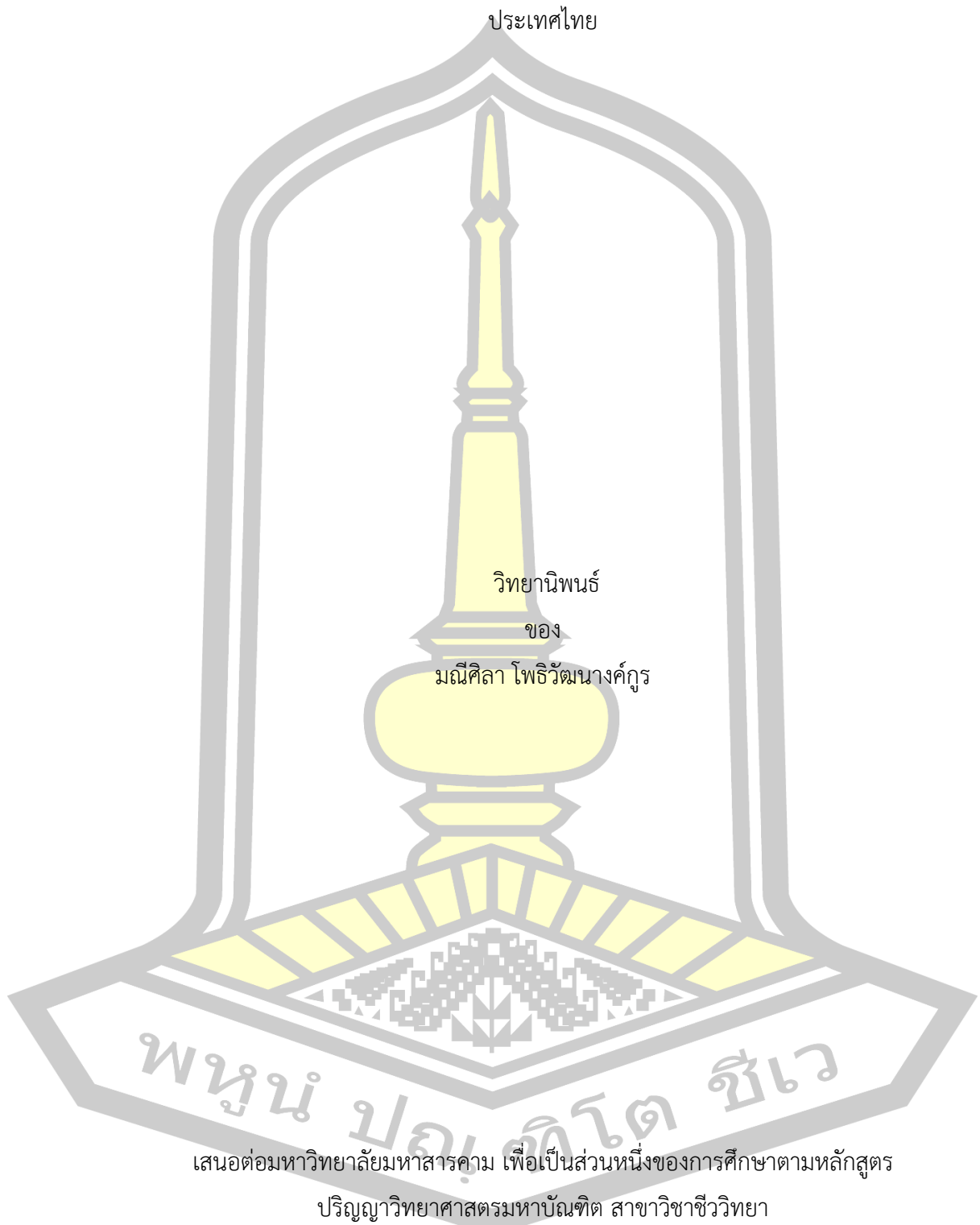
วิทยานิพนธ์
ของ
มณีนีศิลา โพธิ์วัฒนางค์กูร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงอังกั้นซีด (*Kaloula mediolineata* Smith, 1917) ใน
ประเทศไทย

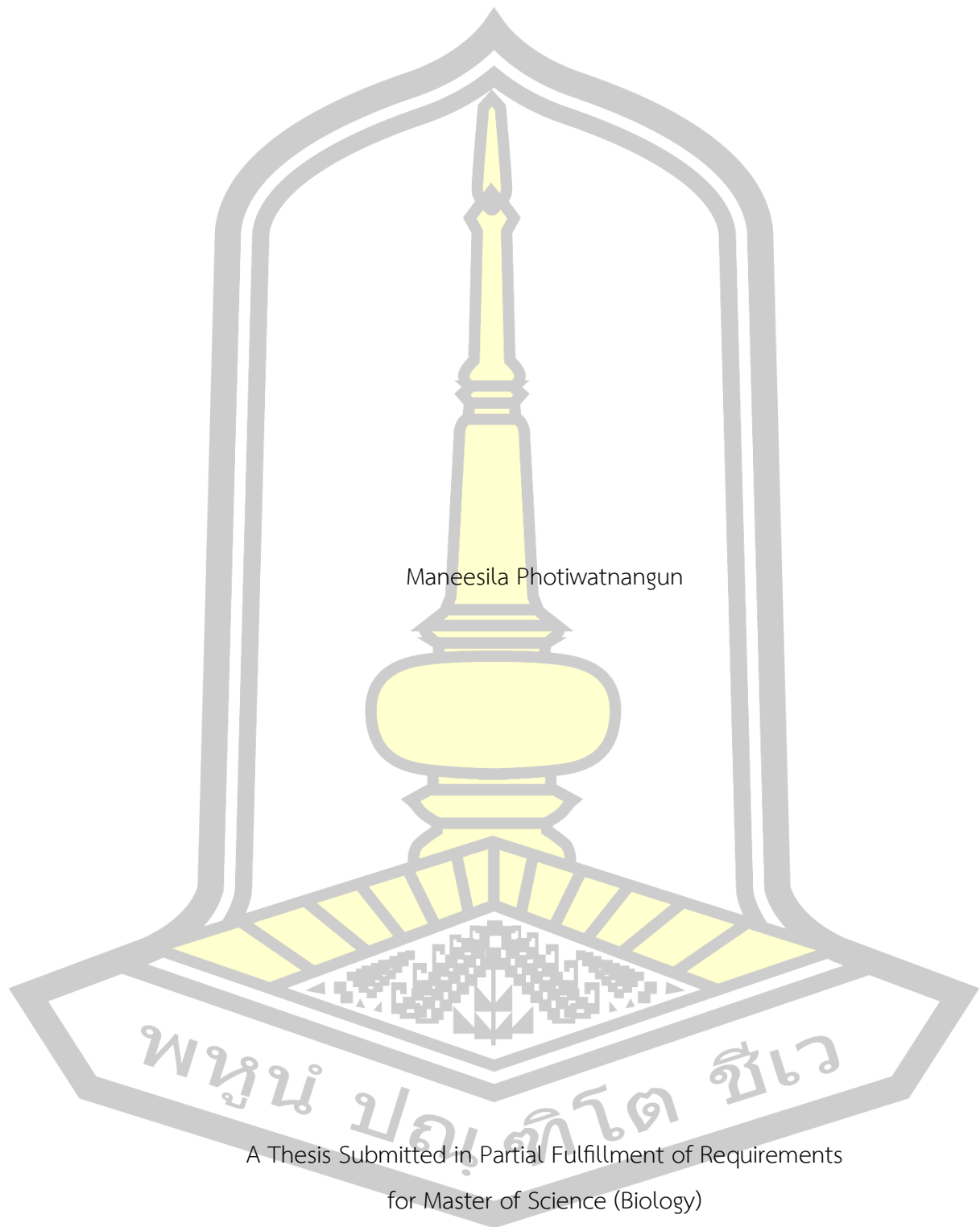


เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Genetic diversity of *Kaloula mediolineata* Smith, 1917 in Thailand



Maneesila Photiwatnangun

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

May 2024

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวมณีนีศิลา โพธิ์
วัฒนางค์กูร แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. ประวีร์ พรหมโชติ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รศ. ดร. คมศร เล่าห์ประเสริฐ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รศ. ดร. วีระชัย สายจันทา)

.....กรรมการ

(รศ. ดร. ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย)

.....กรรมการ

(ดร. เอกพจน์ ศรีฟ้า)

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

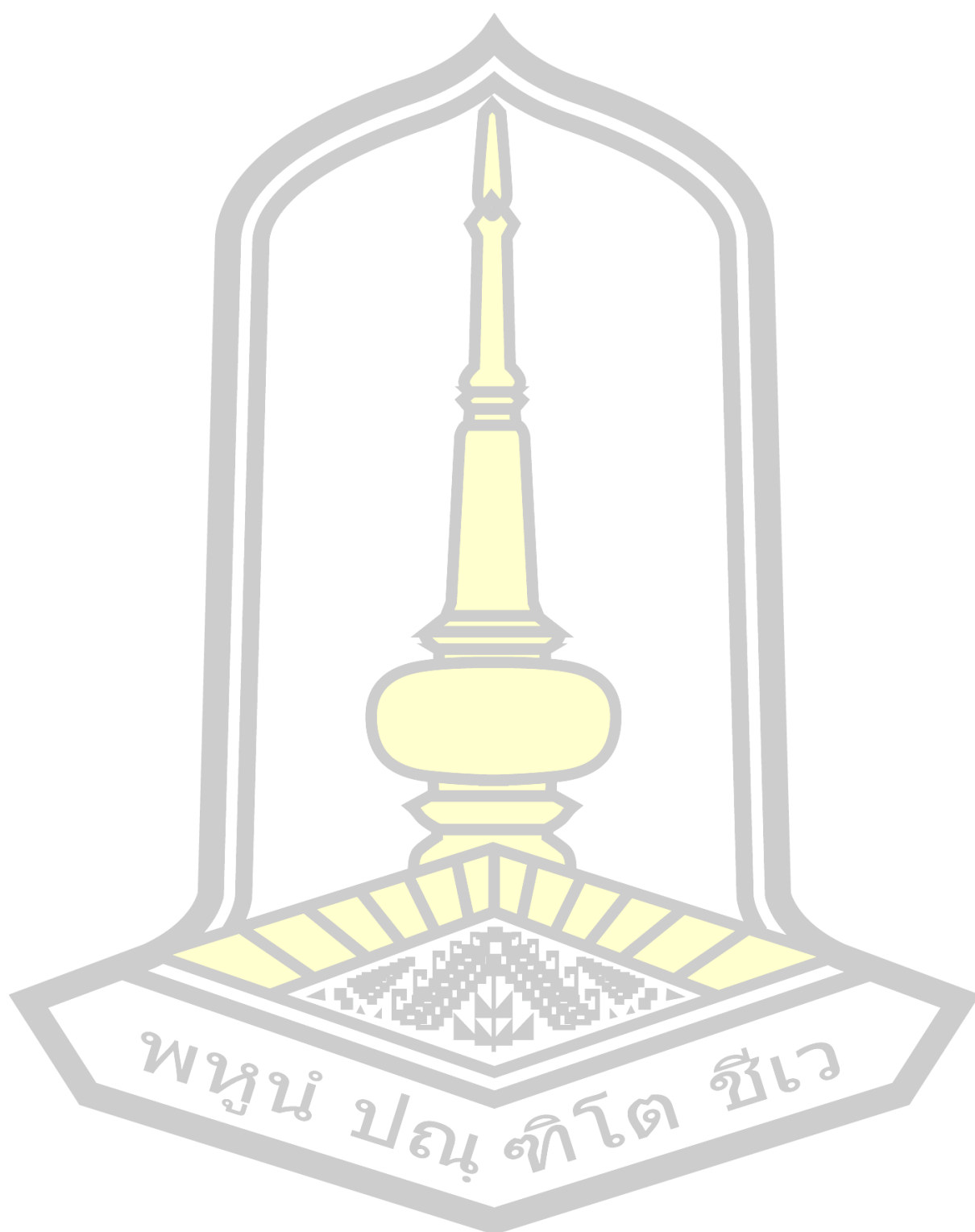
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงอ่างกันซีด (<i>Kaloula mediolineata</i> Smith, 1917) ในประเทศไทย		
ผู้วิจัย	มณีนีศา โพธิ์วัฒนางค์กูร		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. คมศร เล่าห์ประเสริฐ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระชัย สายจันทา		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2567

บทคัดย่อ

อิงอ่างกันซีด (*Kaloula mediolineata*) ในวงศ์ Microhylidae เป็นอึ่งที่มีมีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปัจจุบันอิงอ่างกันซีดถูกองค์กรระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ(IUCN Red List) ประเมินว่ามีความเสี่ยงใกล้การสูญพันธุ์ เนื่องจากมีการจับและขายเพื่อนำมาจำหน่ายและบริโภคในแต่ละปีเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ในงานวิจัยครั้งนี้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงอ่างกันซีดในประเทศไทย โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในไมโทคอนเดรีย 2 ยีน ได้แก่ ไซโตโครมบี (Cytochrome b gene) และยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA) ผลการศึกษาพบว่า ยีน Cytb จำนวน 118 ตัวอย่าง สามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมออกได้ 52 แฮพโลไทป์ ในขณะที่ยีน 16S rDNA จำนวน 52 ตัวอย่าง สามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมออกได้ 31 แฮพโลไทป์ แสดงให้เห็นว่ายีน Cytb มีความแปรผันทางพันธุกรรมมากกว่ายีน 16S rDNA ในการวิเคราะห์ด้วยยีน Cytb สามารถจำแนกพันธุกรรมออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มพันธุกรรม G1 ประกอบด้วย 5 แฮพโลไทป์ และกลุ่มพันธุกรรม G2 ประกอบด้วย 45 แฮพโลไทป์ มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มพันธุกรรม G1 และ G2 มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.028 และ มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.608 ซึ่งในการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (Phylogenetic tree) สามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มพันธุกรรมคือ กลุ่มพันธุกรรม G1 และกลุ่มพันธุกรรม G2 ซึ่งสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ (geographic barrier) ไม่มีผลในการแบ่งแยกทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง เนื่องจากความต้องการในการบริโภคของมนุษย์ทำให้อิงอ่างกันซีดถูกจับส่งไปขายในตลาดสัตว์ป่าตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ส่งผลให้เกิดการไหลของยีน (gene flow)

คำสำคัญ : อิงอ่างกันซีด, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ความแปรผันทางพันธุกรรม, การไหลของยีน, ประเทศไทย



TITLE Genetic diversity of *Kaloula mediolineata* Smith, 1917 in Thailand

AUTHOR Maneesila Photiwatthangun

ADVISORS Associate Professor Komsorn Lauprasert , Ph.D.
Associate Professor Weerachai Saijuntha , Ph.D.

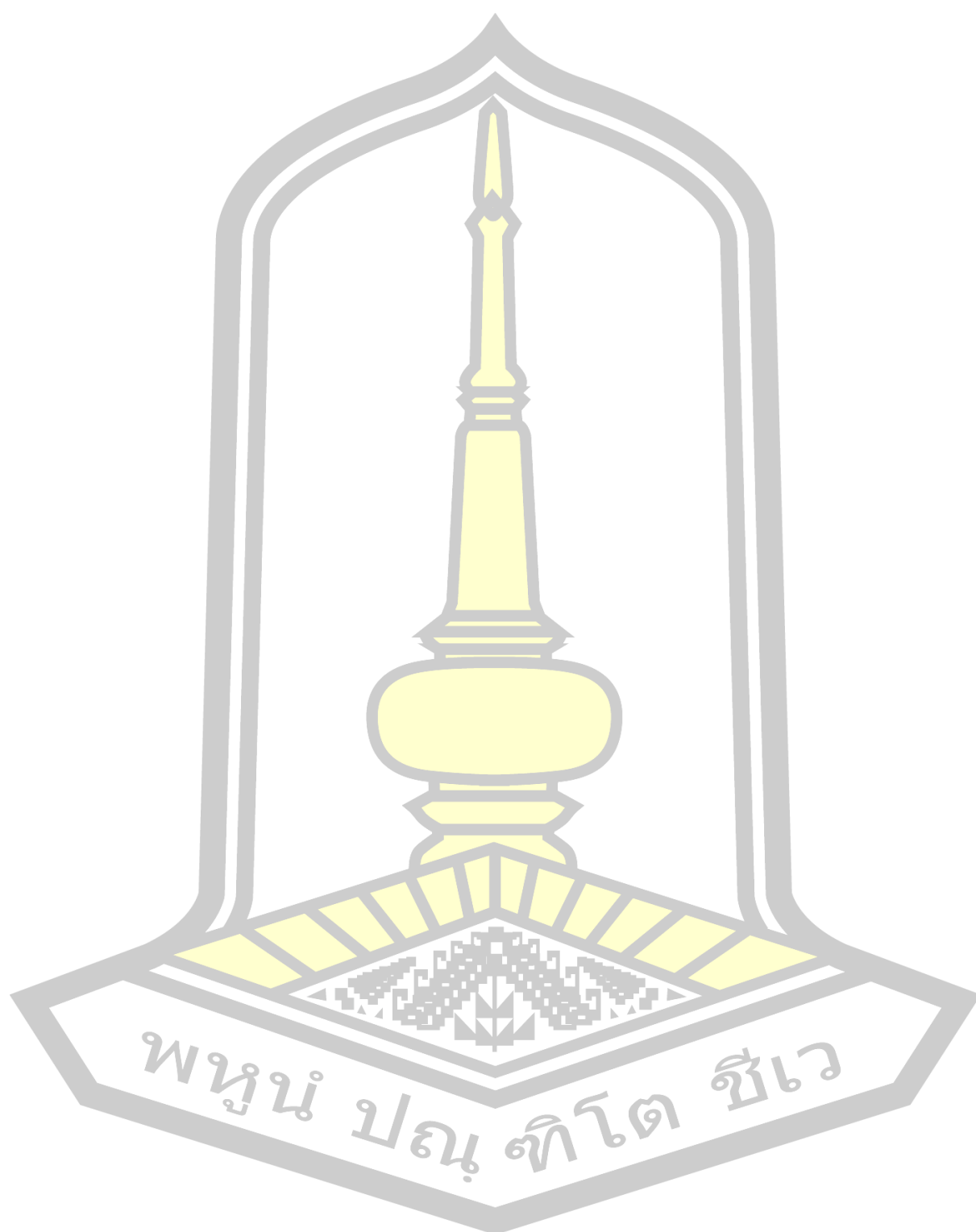
DEGREE Master of Science **MAJOR** Biology

UNIVERSITY Mahasarakham **YEAR** 2024
University

ABSTRACT

The Stripe-Back Burrowing Frog (*Kaloula mediolineata*) of Family Microhylidae is an economically important amphibian of Thailand. Currently, the burrowing frog is categorized as near-threatened species by the International Union for Conservation of Nature (IUCN Red List), due to the high risk of extinction caused by substantial harvesting for consumption and trade each year. In this study, the genetic diversity of *Kaloula mediolineata* in Thailand using analysis of nucleotide sequences, specifically analyzing the Cytochrome b gene and 16S ribosomal RNA gene. The analysis of the Cytb gene with 118 samples identified 52 haplotypes, while the analysis of the 16S rDNA gene with 52 samples identified 31 haplotypes. The study revealed higher genetic variation in the Cytb gene compared to the 16S rDNA gene. The Cytb gene analysis classified the burrowing frogs into two genetic groups (G1 and G2) with the minimum genetic difference between the genetic groups G1 and G2 is 0.028, while the maximum difference is 0.608. The phylogenetic tree showed two distinct clades: G1 and G2. Interestingly, geographical barriers had no impact on the separation of these groups. Human activities, particularly the demand for frog consumption, led to the interchange of genes (gene flow) between different regions in Thailand.

Keyword : *Kaloula mediolineata*, Genetic diversity, Genetic variation, Gene flow, Thailand



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความรู้และความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก รศ.ดร.คมศร เล่าห์ประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.ดร.วีระชัย สายจันทา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.ปิยะธิดา พิมพ์วิชัย กรรมการสอบ ดร.เอกพจน์ ศรีฟ้า กรรมการสอบ และ รศ.ดร.ปรวีร์ พรหมโชติ ประธานกรรมการสอบ

ขอขอบคุณนางสาวนฤมล บุญชม ที่คอยช่วยแนะนำการทดลองกับการวิเคราะห์ข้อมูลการทำวิจัยและที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ต่าง ๆ ขอขอบคุณนาย ณัฐกิตติ บุญญาวิวัฒน์และนางเบญจรัตน์ พรหมเพ็ญที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ช่วยเหลือและอนุเคราะห์ สถานที่ปฏิบัติการวิจัยครั้งนี้

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ที่ได้รับทุนนักวิจัยหลังปริญญาตรี ประจำปีงบประมาณ 2566 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ท้ายที่สุดนี้ ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาและให้การสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

มณีนีลา โพธิ์วัฒนางค์กูร

พูน ปณ จิตโต ชีเว

สารบัญ

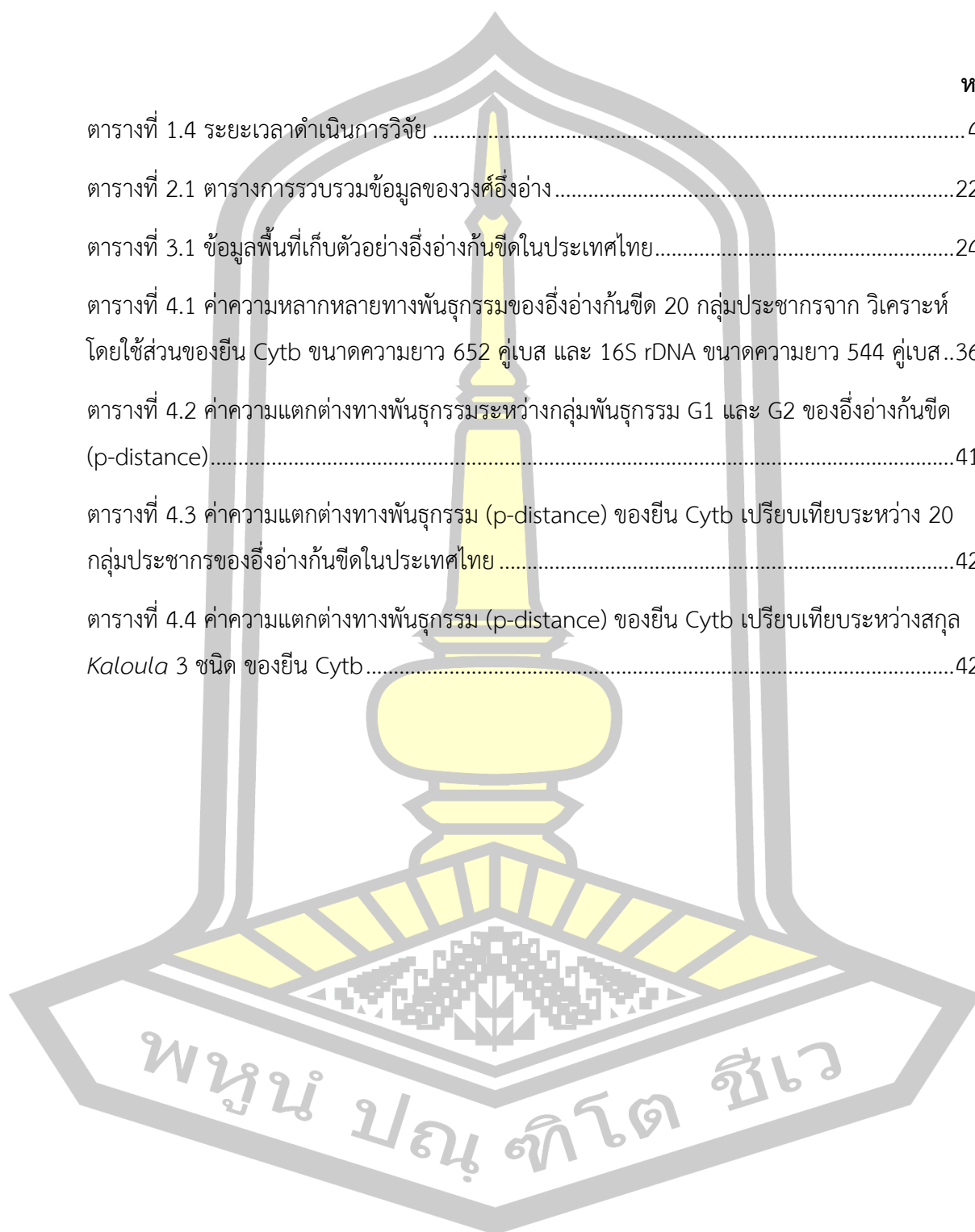
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา.....	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	3
1.4 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 อนุกรมวิธานของอึ่งอ่างก้นขีด.....	5
2.2 พฤติกรรมของอึ่งอ่าง.....	7
2.3 นิยามศัพท์.....	8
2.4 การสำรวจและการศึกษาเกี่ยวกับวงศ์อึ่งอ่างในประเทศไทย.....	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	23
3.1 พื้นที่การเก็บตัวอย่างในประเทศไทย.....	23
3.2 การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	25
3.3 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์.....	26

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล	29
บทที่ 4 ผลการวิจัย	30
4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	30
4.2 การวิเคราะห์เครือข่ายแฮพโลไทป์และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (haplotype network and Phylogenetic tree)	33
4.3 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง 20 กลุ่มประชากรของอี้อย่างกันซิด	40
4.4 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสกุล <i>Kaloula</i> 3 ชนิด	40
4.5 ลักษณะความแตกต่างของลายขีดบนหลังของอี้อย่างกันซิด	43
บทที่ 5 สรุปผลและอภิปรายผล	45
5.1 สรุปผลและอภิปรายผล	45
5.2 ข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก	55
ประวัติผู้เขียน	75



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.4 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	4
ตารางที่ 2.1 ตารางการรวบรวมข้อมูลของวงศ์อิงอ่าง	22
ตารางที่ 3.1 ข้อมูลพื้นที่เก็บตัวอย่างอิงอ่างกันซิดในประเทศไทย	24
ตารางที่ 4.1 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงอ่างกันซิด 20 กลุ่มประชากรจาก วิเคราะห์ โดยใช้ส่วนของยีน Cytb ขนาดความยาว 652 คู่เบส และ 16S rDNA ขนาดความยาว 544 คู่เบส..36	
ตารางที่ 4.2 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มพันธุกรรม G1 และ G2 ของอิงอ่างกันซิด (p-distance).....	41
ตารางที่ 4.3 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ของยีน Cytb เปรียบเทียบระหว่าง 20 กลุ่มประชากรของอิงอ่างกันซิดในประเทศไทย	42
ตารางที่ 4.4 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ของยีน Cytb เปรียบเทียบระหว่างสกุล <i>Kaloula</i> 3 ชนิด ของยีน Cytb	42



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 อี้อ่างกันขีด	5
ภาพที่ 2.2 อี้อ่างกันขีดและลักษณะนิ้วมือและฝ่าตีนของอี้อ่างกันขีด.....	6
ภาพที่ 3.1 การเก็บตัวอย่างอี้อ่างกันขีด.....	25
ภาพที่ 4.1 แผนที่การกระจายความถี่ของอี้อ่างกันขีด.....	35
ภาพที่ 4.2 เครือข่ายแอโพลไทป์ของอี้อ่างกันขีดจำนวน 52 แอโพลไทป์ (Km1 – Km52).....	38
ภาพที่ 4.3 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์.....	39
ภาพที่ 4.4 มีลวดลายขีดแถบบนหลัง 5 รูปแบบ	44



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) มีความเชื่อมโยงกับการดำเนินชีวิตของคนไทยมาเนิ่นนาน แต่เมื่อกล่าวถึงสัตว์ในกลุ่มนี้ผู้คนมักจะนึกถึงเพียงกบและเขียดเท่านั้น แต่ความจริงแล้วจำแนกออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ 3 อันดับ ตามรูปร่างที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน อันดับแรกเป็นอันดับกะท่างน้ำ (Salamanders) รูปร่างคล้ายจิ้งจก มีขาสั้นสี่ขา ลำตัวแบน และมีหางยาว พบอยู่ตามยอดเขาที่มีอากาศหนาวเย็น อันดับที่สองเป็นอันดับของเขียดงู (Ceacilians) รูปร่างคล้ายงู ลำตัวยาว ไม่มีรยางค์ หางสั้นมาก หัวและหางทู่ ผิวเป็นเมือกลื่น พบเห็นค่อนข้างยาก เนื่องจากส่วนใหญ่ใช้ชีวิตอยู่ใต้ดิน และอันดับสุดท้าย คืออันดับของกบ เขียด คางคก อึ่งและปาด (Anurans) มีสี่ขา โดยขาหน้าสั้นกว่าขาหลัง หัวสั้นทู่ ไม่มีคอ ไม่มีหาง ตาโปน มีทั้งผิวเรียบและผิวขรุขระ ผิวลื่นและผิวแห้ง มีและไม่มีพังผืดระหว่างนิ้ว (ปิยวรรณ นิยมวัน, ไพรวัลย์ ศรีสม และ ปริญญา ภาวิคนันท์, 2562) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั่วโลกกำลังเผชิญกับวิกฤตที่เพิ่มขึ้นมาก โดยระหว่างหนึ่งในสามถึงครึ่งหนึ่งของสัตว์ที่รู้จักทั้งหมดถูกคุกคามด้วยการสูญพันธุ์ แม้ว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกใหม่จะถูกค้นพบและอธิบายทุกปี โดยปัจจุบันมี 8736 ชนิดที่ได้รับการยอมรับทั่วโลก แต่ในความเป็นจริงสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นที่ต้องการมาก IUCN จึงได้มีการอนุรักษ์สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้ตัดสินใจที่จะประกาศปี 2008 เป็น"ปีแห่งกบ" (Neang, 2010) นอกจากนี้ประเทศไทยก็เป็นประเทศร้อนชื้นมีสภาพอากาศเหมาะสมสำหรับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในการเป็นที่อยู่อาศัยเป็นอย่างมาก แต่เมื่อกล่าวถึงสัตว์ในกลุ่มนี้ผู้คนมักจะนึกถึงเพียงกบและเขียดเท่านั้น ความจริงยังมีเขียดงูและกะท่างรวมอยู่ด้วย สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกไม่ได้มีประโยชน์เพียงแค่เป็นอาหารเท่านั้น ในธรรมชาติสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้นมีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าสัตว์กลุ่มอื่น ไม่ว่าจะเป็นบทบาทของผู้กำจัดแมลงนานาชนิดไม่ให้แพร่ระบาดมากเกินไป ตัวอ่อนหรือลูกออดที่อาศัยอยู่ในน้ำก็ยังเป็นตัวช่วยควบคุมปริมาณสัตว์น้ำให้อยู่ในภาวะสมดุล นอกจากนี้สภาพความสมบูรณ์ของตัวเต็มวัยของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกยังเป็นดัชนีที่บ่งชี้ถึงสภาพมลภาวะในอากาศและสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี (ธัญญา จันอาจ, 2546)

ปัจจุบันสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย มีรายงานการค้นพบแล้วประมาณ 200 ชนิด จำแนกออกเป็น 3 อันดับ 8 วงศ์ คือ 1. อันดับกะท่าง (Order Caudata) พบในประเทศไทย 5 ชนิด จัดอยู่ในวงศ์กะท่างน้ำ (Family Salamandridae) 2. อันดับเขียดงู (Order Gymnophiona) พบในประเทศไทย 6 ชนิด จัดอยู่ในวงศ์เขียดงูอุษาคเนย์ (Family Ichthyophiidae) 3. อันดับกบ (Order Anura) พบในประเทศไทย 189 ชนิด กระจายอยู่ใน 7 วงศ์ ได้แก่ วงศ์อิงกราย (Family Megophryidae) วงศ์คางคก (Family Bufonidae) วงศ์ปาดเมืองจีน (Family Hylidae) วงศ์อิงอ่าง (Family Microhylidae) วงศ์กบ เขียด (Family Ranidae) วงศ์ปาด (Family Rhacophoridae) และวงศ์กบลิ้นส้อม (Dicroglossidae) (<http://www.norththailandbirding.com>) จากทั้งหมดมี วงศ์อิงอ่าง (Family Microhylidae) มีประมาณ 614 สปีชีส์ ใน 13 วงศ์ย่อยที่มีการกระจายทั่วโลก มีลักษณะเด่นที่สุดที่ทำให้วงศ์อิงอ่างแตกต่างจากวงศ์อื่น ๆ คือขากรรไกรไม่มีเคราตินและฟันกราม, รูหายใจเดี่ยว (spiracle single) และ ด้านกลางท้อง (mid ventral) ในลูกอ๊อดแบบออร์ตัน ซึ่งในหลายประเทศมีการค้าขายสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ที่ไม่จำกัดเฉพาะเนื้อสัตว์ กบยังถูกจับเพื่อใช้ทำสิ่งแปลกใหม่และน่าสนใจสำหรับอุตสาหกรรมการท่องเที่ยว เช่น กระเป๋าเงินและพวงกุญแจ หนึ่งกบถูกนำมาใช้ในการค้าหนึ่ง สำคัญในวงศ์อิงอ่างนั้นมีสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญ ได้แก่ อึ่งปากขวด อึ่งแดง อึ่งอ่างบ้าน และอึ่งอ่างกันขิด โดยทั้ง 4 ชนิดมีความสำคัญเนื่องจากเป็นที่นิยมบริโภคและมีราคาสูงมากที่สุด คือ อึ่งปากขวด เนื่องจากมีรสชาติดี พบในช่วงเวลาสั้น ๆ ของปี เพียงครั้งเดียวเท่านั้น ทำให้มีราคาจำหน่ายสูงถึงกิโลกรัมละ 180 – 200 บาท (Latremsanga et al., 2017)

ในวงศ์อิงอ่าง ได้แก่ อึ่งอ่างกันขิด (*Kaloula mediolineata* Smith, 1917) สถานภาพปัจจุบันไม่ได้ถูกจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2535 แต่กลับมีสถานภาพเป็นสัตว์ป่าใกล้สูญคุกคามและถูกใช้เป็นสัตว์เศรษฐกิจมากขึ้น นำเสียดายที่สถานะของสัตว์หลายชนิดถูกจัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงภายใต้บัญชีแดงของ IUCN ของชนิดพันธุ์ที่ถูกคุกคามเนื่องจากอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศและการกระจายตัวของแหล่งที่อยู่อาศัย ตลอดจนขาดความรู้เกี่ยวกับข้อมูลทางนิเวศวิทยา พฤติกรรม พันธุศาสตร์และอนุกรมวิธาน

ดังนั้น การศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับอิงอ่างกันชิต นี่เป็นการแสดงถึงข้อมูลที่น่าเสนอนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อบอกความสำคัญของอิงอ่างกันชิต ในด้านความหลากหลายและโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของอิงอ่างกันชิตในประเทศไทย เนื่องจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ จึงต้องอาศัยเทคนิคการตรวจสอบอนุพันธุศาสตร์เพื่อช่วยในการสนับสนุนข้อมูลโครงสร้างพันธุกรรมของอิงอ่างกันชิตในแต่ละพื้นที่ ทำให้เข้าใจถึงรูปแบบการกระจาย ขอบเขตการกระจาย ตลอดจนถึงกลไกที่มีอิทธิพลต่อการกระจายของอิงอ่างกันชิตในประเทศไทย เพื่อเป็นการวางแผนการจัดการให้มีการดำรงชีวิตของอิงอ่างกันชิตในประชากรให้มีสัดส่วนที่มีความเหมาะสมในธรรมชาติและการอนุรักษ์ประชากรอิงอ่างกันชิตได้อย่างยั่งยืนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา

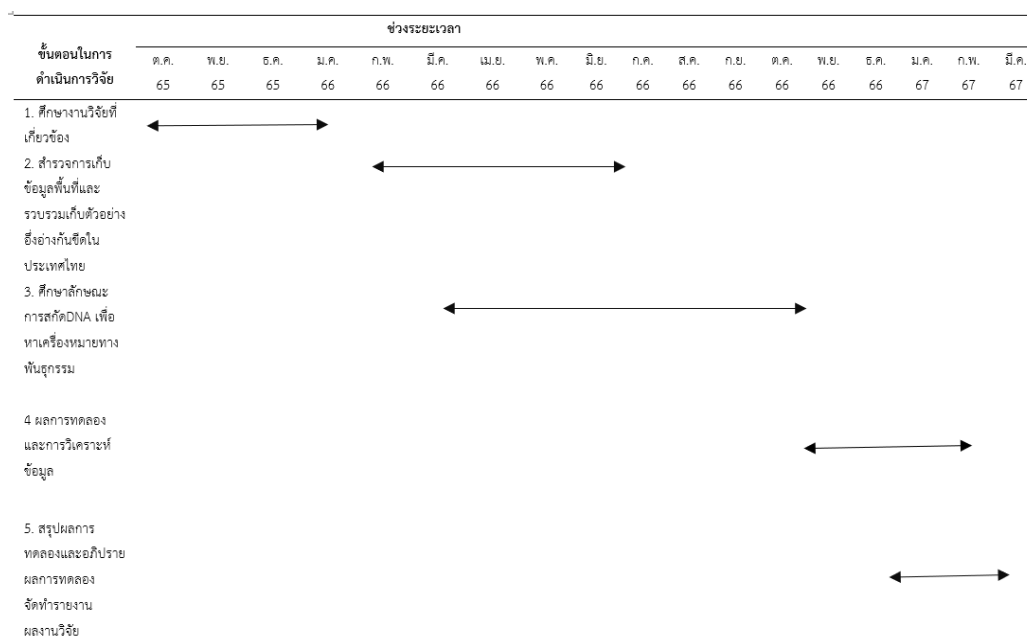
1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงอ่างกันชิตในประเทศไทย โดยใช้ยีนไซโตโครมบี (Cytochrome b gene) และยีน 16S rDNA เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
2. วิเคราะห์เครือข่ายแฮพโลไทป์และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ เพื่อศึกษากลุ่มพันธุกรรมภายในของอิงอ่างกันชิต
3. วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรของอิงอ่างกันชิตในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงอ่างกันชิต (*Kaloula mediolineata* Smith, 1917) ในประเทศไทย

พญนุ ปณุกีโต ชีวะ

1.4 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย



1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งอํากันชีตในประเทศไทย
2. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา สามารถนำไปช่วยวางแผนการจัดการและการอนุรักษ์สิ่งอํากันชีต เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานของอิงอ่างก้นขีด

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Amphibia

Order: Anura

Family: Microhylidae

Genus: *Kaloula*

Species: *Kaloula mediolineata* Smith, 1917



ภาพที่ 2.1 อิงอ่างก้นขีด

อึ่งอ่างก้นขีด

ชื่อไทย: อึ่งอ่างก้นขีด

ชื่อภาษาอังกฤษ : Middle Back-Stripe Bullfrog

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Kaloula mediotlineata* Smith, 1917

อึ่งอ่างก้นขีดอยู่ในสกุล *Kaloula* อันดับ Anura เป็นอึ่งที่พบในทั่วทุกภาคของประเทศ ขนาดความยาวจากปลายจมูกถึงรูทวารประมาณ 50 มิลลิเมตร อาศัยอยู่ในโพรงดินเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในฤดูแล้งจะอาศัยอยู่ในโพรงดินเกือบตลอดเวลา แต่ระหว่างฤดูฝนจะขึ้นมาหากินบนพื้นดินบ้างในช่วงเวลากลางคืน ผสมพันธุ์และวางไข่ในคืนที่มีฝนตกหนักมากเป็นครั้งแรกของฤดูฝน มีนิสัยการสืบพันธุ์รวมกัน เป็นกลุ่มคอนและเป็นจำนวนมาก (explosive mating aggregation) (ธัญญา จันอาจ, 2546) (ภาพที่ 2.1)

ลักษณะทั่วไป

เป็นอึ่งขนาดใหญ่ มีลักษณะและขนาดที่ใกล้เคียงกับอึ่งอ่างบ้านมาก แต่มีความแตกต่างกันที่ อึ่งอ่างก้นขีดมีแถบสีน้ำตาลอ่อนหรือสีครีมที่บริเวณด้านท้ายของลำตัว ปลายนิ้วเรียวยาวแหลม และนิ้วตีนมีพังผืดประมาณครึ่งหนึ่งของความยาวนิ้ว ฝ่าตีนมีปุ่ม metatarsal tubercles 2 ปุ่มขนาดใหญ่ โดยมีลักษณะเฉพาะ มีจมูกสั้นมน นิ้วเรียวยาว นิ้วแรกมีขนาดสั้นกว่านิ้วที่สอง มีผิวหนังเรียบลื่น มีตุ่มเล็กๆ แถบสีข้างลำตัวอาจไม่ชัดเจนหรือแถบสีข้างลำตัวอาจมีแถบสีไม่ต่อกัน และแถบสีจากกลางลำตัวแม้ว่าจะเห็นได้ชัดเจน แต่แถบสีมีความยาวที่แตกต่างกันไป (Smith, 1917) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 อึ่งอ่างก้นขีดและลักษณะนิ้วมือและฝ่าตีนของอึ่งอ่างก้นขีด

ที่มา: Smith, 1917

อิงอ่างกันชืดอาศัยอยู่ในดินที่เป็นดินทรายและจะขึ้นมาจากดินเพื่อผสมพันธุ์ในช่วงต้นของฤดูฝน ผิวหนังบริเวณใต้คางของเพศผู้มีสีดำเข้ม เคลื่อนที่ได้ค่อนข้างเร็วและมีพฤติกรรมการป้องกันตัวโดยการพองตัวให้มีขนาดใหญ่และยกตัวขึ้น และเมื่อหลบหลีกจะปล่อยลมออกมาทางรูจมูกเสียงดังฟู จากนั้นจะกระโดดหนีไปอย่างรวดเร็ว และยังสามารถหลังเมือกสีขาวออกมาจากตัว ซึ่งเมือกนี้ไม่มีกลิ่น มีคุณสมบัติเหนียว เกาะติดแน่นและล้าออกได้ยาก นอกจากนี้ อิงอ่างกันชืดยังสามารถมุดลงดินได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ตีนหลังขุดดินแล้วถอยหลังลงไปในดินจากนั้นจึงใช้ดินกลบฝังตัวเอง (ปรวีร์ พรหมโชติ และวิเชษฐ คนชื่อ, 2562)

ลักษณะเด่น คือ มีแถบสีน้ำตาลอ่อนหรือสีครีมขอบดำพาดจากกลางลำตัวมาถึงประมาณ 1/3 ของหลัง จึงเป็นที่มาของชื่อ อิงอ่างกันชืด หัวสั้นและทุ่ ลำตัวอ้วนป้อม ผิวเรียบหรือมีตุ่มขนาดเล็กกระจายอยู่ ลำตัวมีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง มีแถบน้ำตาลอ่อนหรือสีครีมพาดบนหัว ระหว่างตาทั้ง 2 ข้างและแถบสีนี้พาดมาตามขอบหลังทั้ง 2 ข้างและแถบสีนี้พาดมาตามขอบหลังทั้ง 2 ข้าง ขาหน้าและขาหลังค่อนข้างสั้น ปลายนิ้วมือเรียวแหลม (ปรวีร์ พรหมโชติ และวิเชษฐ คนชื่อ, 2562)

2.2 พฤติกรรมของอิงอ่าง

การขุดดินฝังตัว

อิงสามารถขุดดินฝังตัวได้ดี เพราะบริเวณฝ่าเท้ามีสันแข็ง ๆ คล้ายจอบ อิงบางชนิด เช่น อิงอ่างบ้าน ใช้ชีวิตส่วนใหญ่หมดไปกับการจำศีลหรือการขุดดินลึกลงไปซ่อนตัว เลือกลงดินที่ชื้นและร่วนซุย และจะขึ้นมาจากดินเมื่อถึงช่วงฤดูผสมพันธุ์ สะสมอาหารไว้ในตัวแล้วกลับลงดินไปเช่นเดิม (Nomura et al., 2009)

ความแตกต่างระหว่างเพศ

ลักษณะเพศผู้และเพศเมียของอิง สามารถสังเกตได้ชัดเจนจากภายนอก คืออิงเพศผู้มีขนาดเล็กและเรียกว่าเพศเมีย ส่วนท้องแบนราบท้องค่อนข้างหนา บริเวณใต้คางมีสีดำ เช่น อิงอ่างบ้าน ในขณะที่ผสมพันธุ์ใต้คางจะมีของเหลว ลักษณะเหนียวสำหรับใช้เกาะหลังเพศเมีย ส่วนอิงเพศเมียลำตัวมีขนาดใหญ่โตกว่าบริเวณใต้คางมีสีเหลืองอ่อนหรือสีขาว ในช่วงระยะเวลาผสมพันธุ์วางไข่ ส่วนท้องมีขนาดใหญ่ ผนังท้องบาง สามารถมองเห็นไข่ได้ชัดเจน (สมชาติ ธรรมขันธา และคณะ, 2548)

การป้องกันตัว

อึ่งมีวิธีการป้องกันตัวแตกต่างกันไป เริ่มตั้งแต่การพรางตัวด้วยลวดลายที่กลมกลืนกับธรรมชาติ หรือการเปลี่ยนสีให้ชัดเจนลง เช่น อึ่งกรายมีสีส้มของลำตัวคล้ายกับสีของใบไม้แห้งที่ร่วงหล่นอยู่ตามพื้น ทำให้ศัตรูมองเห็นได้ยาก ลวดลายของอึ่งบางชนิดเมื่อผสมผสานกับท่าทางอาจจะเลียนแบบสัตว์ที่น่าเกรงขามได้ เช่น อึ่งป้อม มีลายคล้ายดวงตาที่เอว เมื่อมีอันตรายมันจะหันหลังให้ศัตรูแล้วยกกันขึ้น ทำให้ดูคล้ายงูกำลังอ้าปาก (ธัญญา จันอาจ, 2546)

พฤติกรรมการสืบพันธุ์วางไข่ของอึ่งอ่าง

อึ่งเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์ในช่วงตีกถึงช่วงเช้ามีด โดยอึ่งเพศผู้เกาะบนหลังเพศเมียบริเวณเอว (inguinal) แต่เนื่องจากอึ่งอ่างมีลำตัวอ้วนป้อมและขาสั้น เพศผู้จึงมีเซลล์พิเศษที่ผิวหนังด้านท้องบริเวณอกสามารถสร้างสารเหนียวคล้ายกาวออกมาแปะติดกับส่วนหลังของเพศเมีย เพื่อให้การเกาะมันคงมากขึ้น เมื่อผสมพันธุ์เสร็จเรียบร้อยแล้ว อึ่งทั้งสองเพศจะแยกจากกันกลับไปจำศีลในดิน เช่นเดิม ไข่ของอึ่งที่ปล่อยออกมาใหม่ ๆ มีลักษณะเป็นเม็ดกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร มีสองสี คือ ไข่ด้านบน (animal hemisphere) ประมาณกึ่งหนึ่งของไข่มีสีดำ ส่วนไข่ด้านล่าง (vegetal hemisphere) มีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ทันทีที่ไข่ถูกปล่อยออกมาสัมผัสกับน้ำส่วนที่เป็นสารเหนียว (albuminous invsment) จะพองตัวกลายเป็นวุ้น (gelationous mass) ห่อหุ้มโดยรอบไข่ ไข่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง รวมทั้งวุ้นขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ลอยเกาะกลุ่มเป็นแพ กลุ่ม ๆ ละ 100 – 150 ฟอง แต่มีลักษณะที่สามารถแยกออกจากกันเป็นเม็ด ในช่วงฤดูฝน ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก ช่วงเวลาดังกล่าว เนื้อดินมีลักษณะอ่อนนุ่ม และมีปริมาณอาหารในธรรมชาติอยู่มาก ส่วนช่วงเวลาอื่น ๆ อึ่งจะจำศีลอยู่ใต้พื้นดิน (Altig & Rowley, 2014)

2.3 นิยามศัพท์

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) หมายถึง ความหลากหลายในชุดของยีน (gene) ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทำให้เกิดความแตกต่างในพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต กับปฏิภณระหว่างพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อม ซึ่งสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมียีนแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ความแตกต่างทางพันธุกรรมมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ (Mutation) ซึ่งอาจเกิดในระดับยีนหรือโครโมโซม ผสมผสานกับกลไกที่เรียกว่า Crossing over ที่เกิดขึ้นในขณะที่มีการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เป็นผลทำให้ gene สลับที่หรือรวมตัวกันใหม่ (Recombination) ซึ่งจะถูกถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานรุ่นต่อ ๆ ไปในประชากร อย่างไรก็ตามประชากร

ของสิ่งมีชีวิตใดชนิดหนึ่งจะรวมตัวเป็นกลุ่มและผสมพันธุ์กันภายในกลุ่มเผ่าพันธุ์ของตน ทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนเกิดขึ้นเฉพาะ ภายในประชากรของสปีชีส์เดียวกัน กลุ่มยีนของประชากรสิ่งมีชีวิตเดียวกัน เรียกว่า Gene pool การถ่ายทอดยีนแต่ละรุ่นต้องประสบกับแรงกดดันทางวิวัฒนาการ (Evolutionary forces) เช่น การคัดเลือก โดยธรรมชาติ การอพยพ และความผันแปรทางพันธุกรรม ทำให้โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรในแต่ละรุ่นเปลี่ยนแปลงไปก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรต่าง ๆ ของสปีชีส์ ประชากรของสปีชีส์อาจจะมีลักษณะจำเพาะ (Speciation) ในแต่ละพื้นที่มีสาเหตุจากการแยกตัวทางภูมิศาสตร์ (Geographic isolation) อันเกิดจากการแยกกลุ่มประชากร (Splitting) ของสิ่งมีชีวิตโดยสภาพ ทางภูมิศาสตร์โดยมีสภาพภูมิศาสตร์เป็นตัวสกัดกั้น (Barrier) ทำให้สิ่งมีชีวิตมีการพัฒนาที่เฉพาะตัว ขึ้นมาเป็นสปีชีส์ใหม่โดยการผสมข้ามพันธุ์หรือผสมกันเองภายใต้ ข้อจำกัดทางภูมิศาสตร์ ทำให้มีความหลากหลายของพันธุกรรมขึ้น (Marsh & Grossa, 1996; Smith, 1989)

โครงสร้างทางพันธุกรรม (Genetic structure) คือการเปลี่ยนแปลงในแต่ละรุ่นไปก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรต่าง ๆ ของสปีชีส์ ประชากรของสปีชีส์อาจจะมีลักษณะจำเพาะ (Speciation) ในแต่ละพื้นที่มีสาเหตุจากการโดดเดี่ยวทางภูมิศาสตร์ (Geographic isolation) อันเกิดจากการแยกกลุ่มประชากร (Splitting) ของสิ่งมีชีวิตโดยสภาพ ทางภูมิศาสตร์โดยมีสภาพภูมิศาสตร์เป็นตัวสกัดกั้น (Barrier) ทำให้สิ่งมีชีวิตมีการพัฒนาที่เฉพาะตัว ขึ้นมาเป็นสปีชีส์ใหม่โดยการผสมข้ามพันธุ์หรือผสมกันเองภายใต้ข้อจำกัดทางภูมิศาสตร์ (Marsh & Grossa, 1996; Smith, 1989)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่นิยมใช้ ได้แก่ ยีน cytochrome c oxidase I (COI) เป็นยีนที่อยู่บนไมโทคอนเดรีย มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส (Hebert et al., 2003) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีลักษณะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะ ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันเท่านั้น และแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ อย่างชัดเจน (ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และนนทรี ปานพรหมมินทร์, 2557)

หลักการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เกิดจากแนวคิดที่ต้องการสร้างรหัสประจำตัวของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยอาศัยหลักการพื้นฐานที่ว่า การจัดเรียงของเบส 4 ตัว คือ A (Adenine), T (Thymine), C (Cytosine) และ G (Guanine) ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะต้องมีความแตกต่างกันไปบ้างไม่มากนัก (วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2554)

วิธีการของดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) จัดเป็น molecular based identification system ที่ผสมผสานกับชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) เป็นการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอในบริเวณที่มีการประเมนแล้วว่ามีศักยภาพเพียงพอที่จะใช้แยกและระบุ (identification) ชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ เรียกว่าบริเวณนี้ว่า “ดีเอ็นเอมาตรฐาน (standardized DNA)” การใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานในการระบุชนิดอาจใช้เพียงบริเวณเดียวหรือหลายบริเวณในจีโนมแต่มักเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ (150 – 800 คู่เบส) นำดีเอ็นเอมาตรฐานที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานในบริเวณเดียวกันซึ่งถูกบันทึกเก็บไว้ในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA barcoding database) ซึ่งเป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว วิธีการนี้จะทำให้ระบุตัวอย่างสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว (Shneyer, 2009; Casiraghi et al, 2010)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอ หรือยีนบนโครโมโซม ที่ใช้บ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมบางอย่างที่สนใจ อาจเป็นช่วงหรือส่วนที่แสดงออกหรือเป็นชิ้นนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เป็นรหัสทางพันธุกรรม เครื่องหมายดีเอ็นเอมีแบบแผนของการถ่ายทอดตามกฎเมนเดล(อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และคณะ, 2548)

ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) ดีเอ็นเอสายเดี่ยวสายสั้น ๆ หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ที่เป็นสายตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่ ในการจำลองดีเอ็นเอ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และคณะ, 2548)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) การตรวจการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในสายของดีเอ็นเอ (อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และคณะ, 2548)

นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ส่วนประกอบย่อยของสารพันธุกรรมพวกดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ ประกอบด้วยน้ำตาล และเบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเรียกว่า นิวคลีโอไทด์ ต่อกับสารประกอบฟอสเฟต นิวคลีโอไทด์หลายโมเลกุลต่อกัน เรียกว่า โอลิโกนิวคลีโอไทด์ และถ้านิวคลีโอไทด์หลาย ๆ โมเลกุลต่อกันเป็นสายยาวมาก ๆ เรียกว่า พอลินิวคลีโอไทด์ (อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และคณะ, 2548)

ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือเบส (nucleotide (base) sequence) ลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์หรือเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และคณะ, 2548)

2.4 การสำรวจและการศึกษาที่เกี่ยวกับวงศ์อึ่งอ่างในประเทศไทย

การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอึ่งปากขวด (*Glypholossus molossus* Gunther) และปาดบ้าน (*Rhacophorus leucomystax* Kuhl) ที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดอุบลราชธานี ชนิดละ 5 ตัว และใช้วิธีการเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ไขกระดูกที่แบ่งตัวอยู่ตลอดเวลาแบบโคลชิซิน-ไฮโปรโทนิค-ฟิก เซชัน-แอร์ดรายอิงและย้อมด้วยสีจิมซ่า ผลการศึกษาปรากฏว่าจำนวนโครโมโซม แบบดิพลอยด์ของอึ่งปากขวดและปาดบ้าน มีจำนวนเท่ากันคือ $2n = 26$ รูปร่างของโครโมโซมมีอยู่ 3 แบบคือ แบบเมตาเซนตริก (metacentric) แบบสับเมตาเซนตริก (submetacentric) และแบบอโครเซนตริก (acrocentric) โดยอึ่งปากขวดมีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมรูปร่างแบบเมตาเซนตริก 3 คู่ สับเมตาเซนตริก 9 คู่ และอโครเซนตริก 1 คู่ และปาดบ้านมีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมรูปร่างแบบเมตาเซนตริก 7 คู่ สับเมตาเซนตริก 5 คู่ และอโครเซนตริก 1 คู่ จากการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของสัตว์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าคาริโอไทป์ของอึ่งปากขวด พบโครงสร้างพิเศษ (Chromosome marker) ที่บริเวณแขนยาวได้ตำแหน่งเซนโตรเมียร์ (centromere) ของโครโมโซมคู่ที่ 6 โดยมีลักษณะเป็นบริเวณที่สร้างนิวคลีโอลัส (nucleolar Organizer Region หรือ NOR) ส่วนคาริโอไทป์ของปาดบ้านพบโครงสร้างพิเศษที่มีลักษณะเป็นรอยคอด secondary constriction บนโครโมโซมมากถึง 6 คู่ คือ คู่ที่ 6 7 8 9 11 และ 13 โดยโครโมโซมคู่ที่ 13 บริเวณปลายแขนสั้นมีลักษณะเป็นดิ่งเล็ก ๆ คล้ายตุ่ม (knob) ซึ่งโครงสร้างพิเศษที่พบบนโครโมโซมนี้นี้จะมีประโยชน์ทางด้านเซลล์อนุกรมวิธาน (Cytotaxonomy) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมาก และสามารถใช้เป็นเครื่องหมาย (marker) ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (evolutionary relationships) ได้ (ถาวร สุภาพรม, วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร, 2535)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของอึ่งอ่างมลายู (*Kaloula borealis*) (Anura, Microhylidae) ในเกาหลี มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรอึ่งอ่างมลายู (*Kaloula borealis*) ในเกาหลี โดยมีเก็บตัวอย่างทั้งหมด 178 ตัว เก็บตัวอย่างมาจากเกาหลี (11 พื้นที่) และจีน (1 พื้นที่) ได้แก่ 1. Incheon 23 ตัว 2. Pochon 13 ตัว 3. Chochiwon 11 ตัว 4. Kwangju 10 ตัว 5. Wanju 14 ตัว 6. Yongam 21 ตัว 7. Sangju 6 ตัว 8. Kyongju 6 ตัว 9. Andong 30 ตัว 10. Bukcheju 5 ตัว 11. Namcheju 29 ตัว และ 12. China 10 ตัว เก็บตัวอย่างจากตับ หัวใจ และโครงกระดูก ได้ทำการวิเคราะห์อัลโลไซม์ (allozyme) ความแปรปรวนทางพันธุกรรมเฉลี่ยของอึ่งอ่างมลายูในเกาหลี คือ $\%P=13.2$, $H_o = 0.048$ และ $H_E = 0.045$ ค่านี้ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

ในเกาหลี นอกจากนี้ ยังมีค่าต่ำกว่าของอิงอ่างมลายูในจีน (%P=50, $H_o = 0.125$, $H_E = 0.172$) มาก สถิติ F-test แสดงให้เห็นว่า *Kaloula borealis* ของเกาหลีมีระดับการไหลของยีนในระดับต่ำอย่างเห็นได้ชัดในกลุ่มประชากรในภูมิภาค ($F_{ST} = 0.339$, $N_m = 0.487$) เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์สะเทินบกสะเทินน้ำในเกาหลี ระดับเฉลี่ยของความแตกต่างทางพันธุกรรมของอิงอ่างมลายูในเกาหลีอยู่ในระดับปานกลาง (Nei's $D=0.020$) ดังนั้น ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ ($H_E = 0.045$) และการไหลของยีน ($N_m = 0.487$) ในกลุ่มประชากรในภูมิภาคนั้นลดลงเนื่องจากการลดลงของขนาดประชากรและการกระจายตัวของอิงอ่างมลายูในเกาหลีน้อยลง (Yang et al., 2000)

การศึกษาคาร์ิโอไทป์และบริเวณนิวคลีโอไลต์สอร์แกนในเซอร์ของเซลล์ตับในกบนา อี๋ยางและคางคกที่พบในประเทศไทยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคาร์ิโอไทป์และบริเวณนิวคลีโอไลต์สอร์แกนในเซอร์หรือเอ็นโออาร์ของกบนา อี๋ยาง และคางคกที่พบในประเทศไทย โดยใช้ตัวอย่างชนิดละ 10 ตัวในการเตรียม โครโมโซม โครโมโซมเตรียมจากเซลล์ตับ โดยฉีดด้วยโคลชิซิน แช่ในสารละลายไฮโปโทนิค, โฮโมจีไนส์, ฟิกเซชัน และแฟรกชันเนชัน ฟังตะกอนให้แห้งในอากาศ ย้อมด้วยสีย้อมกิมซาและซิลเวอร์ไนเตรท ตรวจโครโมโซมและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการวิเคราะห์โครโมโซมพบว่ากบนามีโครโมโซม $2n = 26$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วย $7m + 5sm + 1st$ คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 อี๋ยางมีโครโมโซม $2n = 28$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วย $9m + 3sm + 2st$ คู่ NF เท่ากับ 56 NORs มี 3 คู่ 2 คู่ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้น ของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 และ 8 กับอีก 1 คู่ ตั้งอยู่ปลายสุดแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเทโลเซน ทริกคู่ที่ 1 คางคกมีโครโมโซม $2n = 22$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วย $8m + 3sm$ คู่ NF เท่ากับ 44 NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่ปลายสุดแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 ข้อมูลด้านเซลล์พันธุศาสตร์นี้สามารถนำไปใช้ศึกษาด้านเซลล์อนุกรมวิธานและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกบ อี๋ยาง และคางคกได้ (วัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รั้งศิริจิ, 2548)

การศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างของกบไต่บาวสกี (*Rana dybowskii*) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของจีน มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของกบไต่บาวสกี (*Rana dybowskii*) โดยใช้ 11 polymorphic microsatellite loci เก็บตัวอย่างทั้งหมด 75 ตัวมาจากทั้งภูมิภาคและลุ่มแม่น้ำ มี 6 พื้นที่ ได้แก่ 1. Tonghua, Jilin (Yalu River Basin) 13 ตัว 2. Jiaohe, Jilin (Songhua River and a tributary of Mudan River) 10 ตัว 3. Huadian, Jilin (Songhua River Basin) 12 ตัว 4. Mudanjiang,

Heilongjiang (Mudan River) 10 ตัว 5. Hebei, Heilongjiang (Songhua River Basin) 15 ตัว และ 6. Tieli, Heilongjiang (Songhua River Basin) 15 ตัว การเก็บตัวอย่างจากกล้ามเนื้อขาหลัง และใช้ 11 polymorphic microsatellite loci ใช้ไพรเมอร์ ได้แก่ Rpi100, Rpi101, Rpi102, Rpi104, Rpi107, RsyC23, RsyC52, RsyC41, RsyD25, RsyD40 และ RsyD88 ผลการศึกษาพบว่า จำนวนอัลลีลของตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) 11 ตำแหน่ง อยู่ในช่วง 2 - 10 ในทุกประชากร โดยมีค่าเฉลี่ย 5.6 heterozygosity (H_E) คือ 0.572 ซึ่งบ่งบอกถึงความแตกต่างในระดับปานกลาง ผลสัมประสิทธิ์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรมีนัยสำคัญระหว่างเทือกเขาฉางไป๋และเทือกเขาจินกันน้อย ($p < 0.001$) ซึ่งสรุปว่าประชากรกบไคบาวสกีที่กระจายอยู่ในเทือกเขาจินกัน และเทือกเขาฉางไป๋ที่แตกต่างกัน (Zhang et al., 2010)

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของอึ่งอ่างขนาดเล็ก วงศ์อึ่ง (Microhylidae) (Amphibia, Anura) ด้วยข้อมูลความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยยีนไมโทคอนเดรีย โดยมีการศึกษาระหว่าง 45 ชนิดจาก 89 สายพันธุ์ที่มีชื่อและแท็กซาที่ไม่มีชื่อ 4 ชนิดจาก 11 ใน 14 สกุลของวงศ์อึ่ง (Microhylidae) จากลำดับ 1767 bp ของยีนไมโทคอนเดรีย 12S rRNA และ 16S rRNA โดยใช้วิธีการ maximum parsimony, maximum likelihood และ Bayesian inference วงศ์อึ่ง (Microhylidae) ไม่เป็นกลุ่มพันธุ์กรรมเดียว (monophyly) และข้อมูลของเคลด (Clades) มีความเชื่อมั่นที่สูง 4 กลุ่มซึ่งไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างกัน: (A) *Microhyla*, *Calluella* และ *Glyphoglossus* (B) *Chaperina*, (C) *Kaloula*, *Phrynella* และ *Metaphrynella* และ (D) *Micryletta* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกันและกันเหมือนกับจากวงศ์ย่อย *Kalophryninae* อื่น ๆ และสามารถจำแนกได้ว่าเป็นวงศ์ย่อยที่แตกต่างกันภายใน Clade A ข้อมูลของกลุ่มย่อยมีความเชื่อมั่นที่สูง 3 กลุ่มซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างกันยังมีความคลุมเครือ: (AI) *Microhyla-I*, (AII) *Calluella* และ *Glyphoglossus* และ (AIII) *Microhyla-II* ซึ่งแยกไม่ได้จากวงศ์ย่อย สรุปว่า สกุล *Phrynella* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบบพี่น้อง (sister group) กับสกุล *Metaphrynella* ใน Clade C ในขณะที่สกุล *Gastrophrynoides* ถูกจัดกลุ่มในวงศ์ย่อย *Asterophryinae* พบที่ปาปัว-นิวกินี และออสเตรเลีย สกุลย่อยและชนิดภายในสกุล *Microhyla* ตามมีลักษณะสัณฐานวิทยาไม่สัมพันธ์กับทางสายวิวัฒนาการ และจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป (Matsui et al., 2011)

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของอึ่งปากขอในประเทศไทย มีจำนวนอึ่งปากขอตัวเต็มวัยทั้งหมด 297 ตัวอย่างถูกเก็บรวบรวมจากพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ 3 แห่ง (ภาคเหนือ

ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ตั้งแต่เดือนเมษายน ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2553 มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาโดยใช้สถิติที่มีตัวแปรและหลายตัวแปรด้วยมอร์โฟเมตริกแบบดั้งเดิม (traditional morphometrics) ไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศ แต่พบความแตกต่างของรูปร่างและขนาดระหว่างภูมิภาค (Laojumpon et al., 2012)

การศึกษาสกุล *Kaloula* สปีชีส์ใหม่ (Amphibia: Anura: Microhylidae) มาจากทางใต้ของมณฑลกว่างสี ประเทศจีน สปีชีส์ใหม่ของสกุล *Kaloula* ในเขตอนุรักษธรรมชาติแห่งชาติ เขตชายแดนจีน - เวียดนามทางตอนใต้ของจีน *Kaloula nongangensis* sp.nov. แตกต่างจากสกุลเดียวกันโดยการรวมกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไปนี้: ขนาดกลาง (SVL 41.4–52.7 มม. ในเพศผู้ 18 ตัว, SVL 52.2 มม. ในเพศเมีย); ผิวหลังเรียบหรือหยาบเล็กน้อยมีเครื่องหมายสีเขียวเข้มและจุดสีน้ำตาลผิดปกติ ปลายนิ้วขยายและตัดออกอย่างกว้างขวาง เพศผู้มีนิ้วเท้าเกือบเป็นพังผืด เพศผู้มี tubercles โหนกนูนสองข้างที่ผิวด้านบนของปลายนิ้วและหน้าอกสีเบจมีจุดสีมะนาวเล็ก ๆ *Kaloula nongangensis* sp.nov พบในแหล่งที่อยู่อาศัยตั้งแต่ทุ่งนาที่อยู่ติดกับป่าไปจนถึงป่าดิบชื้น ในแหล่งที่อยู่อาศัยแบบคาสต์ ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนยีนไรโบโซม RNA 16S ของไรโบโซม RNA, *Kaloula nongangensis* sp.nov อยู่ภายในกลุ่ม *Kaloula verrucosa* (รวมถึง *Kaloula borealis*, *Kaloula rugifera* และ *Kaloula verrucosa*) และแสดงระยะทางพันธุกรรมที่ต่ำไปยังสปีชีส์เหล่านี้ (< 3%) เมื่อพิจารณาจากสัณฐานวิทยาและคาร์โบไฮเดรตที่ชัดเจน สถานะเป็นสปีชีส์ที่แยกจากกันสำหรับเชื้อสายที่มีการกระจายแบบแบ่งส่วนเหล่านี้ (Mo et al., 2013)

การศึกษาค้นพบอิงอ่างกันชนิดลายขีดบนหลังรูปคล้ายตัว Y หรือ ตัว T (*Kaloula mediolineata*) (Anura: Microhylidae) ครั้งแรกจากเกาะพุโก่ว๊ก จังหวัดบิญถ่วน ทางตอนใต้ของประเทศเวียดนาม อิงจากภาพถ่ายที่ถ่ายในเดือนมิถุนายน 2013 ที่เกาะแห่งแรกทางตะวันออกสุดในประเทศเวียดนาม (Phung et al., 2013)

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงบางชนิดในสกุล *Microhyla* ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งการผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันเชิงวิวัฒนาการที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรหรือสปีชีส์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ลูกผสม (hybrids) ที่เกิดขึ้นอาจทำให้เกิดการไหลของยีน (gene flow) ระหว่างประชากร โดยใช้เทคนิคทางด้านอนุชีววิทยา อิงน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) อิงข้างดำ (*M.*

heymonsi) และอิงลายเลอะ (*M. butleri*) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่อยู่ในสกุลเดียวกัน มีขนาดลำตัวใกล้เคียงกันและมีการกระจายอยู่ในทุกภาคของประเทศไทย จากการสำรวจเบื้องต้นพบว่าอิงมีการใช้พื้นที่อยู่อาศัยร่วมกัน และที่สำคัญด้วยธรรมชาติของอิงที่มีการปฏิสนธิภายนอก ร่างกายเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COI และมีความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างอิงทั้งสามชนิดในธรรมชาติ โดยนำอิงน้ำเต้าจำนวน 48 ตัว อิงข้างดำจำนวน 43 ตัวและอิงลายเลอะจำนวน 9 ตัว ที่เก็บมาจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี มาตรวจหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อเยื่อตับของอิงทั้งสามชนิด และการเพิ่มปริมาณยีน COI โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลการศึกษาพบว่า อิงทั้งสามชนิดจำนวน 72 ตัวอย่าง ให้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 677 คู่เบส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DnaSP พบจำนวนแฮพโลไทป์ที่แตกต่างกันจำนวน 36 แฮพโลไทป์ ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 189 (27.92%) ตำแหน่ง มีค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.973 ± 0.006 และ 0.10891 ± 0.00525 ตามลำดับ ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของอิงทั้งสามชนิดอยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.223 แสดงว่าประชากรของอิงทั้งสามชนิดมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน COI ค่อนข้างสูง ซึ่งเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของอิงทั้งสามชนิด นอกจากนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการยังพบว่าอิงน้ำเต้า อิงข้างดำ และอิงลายเลอะมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเป็นแบบชาติพันธุ์เดียว (monophyletic group) การตรวจพบว่าการไหลของยีน (gene flow) ระหว่างประชากรของอิงข้างดำและอิงน้ำเต้า และระหว่างประชากรของอิงลายเลอะและอิงน้ำเต้า แสดงว่าอิงทั้งสองชนิดนั้นสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ในธรรมชาติ (อัมพร วิเวกแก้ว และวิเชษฐ์ คนชื้อ, 2557)

พฤติกรรมการผสมพันธุ์ของอิงปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) และลูกอ๊อดของอิงปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) และ อิงแดง (*Glyphoglossus guttulatus*) (Microhylidae) พฤติกรรมการผสมพันธุ์ของอิงปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) อธิบายได้จากภาพนิ่งและวิดีโอที่ถ่ายในประเทศไทยกัมพูชา โดยอิงอ่างตามธรรมชาติวางไข่ในน้ำ ในการผสมพันธุ์แบบระเบิดชั่วคราว คือการจุ่มน้ำและจุ่มลงในฟิล์มผิวไข่ของไข่ที่มีสี ส่วนหนึ่งของคลัตช์ถูกปล่อยออกในการจุ่มแต่ละครั้ง การจุ่มแต่ละครั้งจะใช้เวลาประมาณ 6 วินาที โดยจะปล่อยไข่ 200-300 ฟองต่อการจุ่มแต่ละครั้ง และผ่านไปประมาณ 5 วินาทีระหว่างการจุ่ม ไข่มีสีดำเข้มและสีเหลือง และข้อมูล

เกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อดของอึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) จากประเทศไทย เวียดนามและอึ้งแดง (*Glyphoglossus guttulatus*) จากประเทศพม่า (Altig & Rowley, 2014)

การเลี้ยงอึ่งปากขวดในระบบการเกษตรยังยืนอึ่งปากขวด (BhBF) (*Glyphoglossus molossus*) เป็นสายพันธุ์ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เนื่องจากผู้คนจับพวกมันเป็นอาหารและขายในตลาดเพื่อหาทำไร การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาธรรมชาติของอึ่งเพ้าและพัฒนาวิธีการเลี้ยงในระบบเกษตรแบบยังยืน การทดลองดำเนินการใน 2 พื้นที่ของระบบนิเวศธรรมชาติ พื้นที่ 1. หมู่บ้านหนองทับลาน 5 ต.ห้วยหมอนทอง และพื้นที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (KU KPS) ทั้งสองพื้นที่ตั้งอยู่ในอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย และทำการทดลองตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2555 ถึงมิถุนายน 2557 การทดลองเพาะพันธุ์อึ่งปากขวด เริ่มต้นด้วยลูกอ๊อดอายุ 5 วันและต่อเนื่องจนถึงอายุ 20 วัน ซึ่งดำเนินการใน บ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 ซม. อัตราความหนาแน่น 1,200 ลูกอ๊อด/บ่อ เจริญเติบโตสูงสุด โดยมีความยาวเฉลี่ย 2.79 ซม. ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอัตราความหนาแน่น 1,500 ลูกอ๊อด/บ่อ (ความยาวเฉลี่ย 2.63 ซม.) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอัตราความหนาแน่น 1,800 (ความยาวเฉลี่ย 2.34 ซม.) และ 2,100 ลูกอ๊อด/บ่อ (ความยาวเฉลี่ย 2.38 ซม.) ไม่พบความแตกต่างในความยาวลูกอ๊อดระหว่างอัตราความหนาแน่น 1,800 ถึง 2,100 ลูกอ๊อด/บ่อ ลูกอ๊อดในอัตราความหนาแน่น 1,200 ลูกอ๊อด/สภาพบ่อหนักที่สุด (7.61 ก.) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากลูกอ๊อดในสภาวะอื่น ๆ อัตราความหนาแน่น 1,500 (6.25 ก.) 1,800 (4.71 ก.) และ 2,100 ลูกอ๊อด/บ่อ (5.60 ก.) ที่ $p < 0.0001$ ไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักลูกอ๊อดระหว่างกลุ่มที่มีอัตราความหนาแน่น 1,800 (4.71 ก.) และ 2,100 ลูกอ๊อด/บ่อ (5.60 ก.) อัตราการรอดตายสูงสุดของลูกอ๊อด อยู่ที่อัตราความหนาแน่น 1,800 ลูกอ๊อด/สภาพบ่อ และอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าสภาวะอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.0012$ ความยาวของอึ่งปากขวดจากอัตราความหนาแน่น 1,200 และ 1,500 ลูกอ๊อด/บ่อ มีความแตกต่างจากความยาวของอึ่งปากขวด ที่อัตราความหนาแน่น 1,800 และ 2,100 ลูกอ๊อด/บ่อ แม้ว่าการผสมพันธุ์ของอึ่งปากขวดหลายตัว ที่มีอัตราความหนาแน่นต่ำสุดจะให้ความยาวและน้ำหนักสูงสุด แต่ก็มีอัตราการรอดชีวิตต่ำที่สุด ในพื้นที่หมู่บ้านหนองทับลาน 5 ต.ห้วยหมอนทอง เกษตรกรสามารถจับอึ่งปากขวด ได้มากถึง 1.5 กก. (ประมาณ 20-30 ตัว) หลังจากหนึ่งปี ในพื้นที่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน พบว่า อึ่งปากขวดประมาณ 20-30 ตัวได้ผสมพันธุ์และวางไข่ในสระน้ำ 1 ปี ต่อมา (Boontham & Naritoom, 2015)

ผลกระทบของสายวิวัฒนาการและการสุมตัวอย่างอนุกรมวิธานต่อการอนุมานสายวิวัฒนาการในอึ่งน้ำเต้า (Anura Microhylidae) และความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของวงศ์อึ่งอ่าง ความสัมพันธ์ระหว่างวงศ์ย่อยยังคงมีความคลุมเครือ และหลายสกุลไม่ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ 5 แบบ (ตั้งแต่ 7 ตำแหน่งสำหรับ 48 แท็กชาถึง 73 ตำแหน่งสำหรับมากถึง 142 แท็กชา) โดยใช้วิธีการจัดลำดับสายวิวัฒนาการ (66 ตำแหน่ง ที่ได้จากจีโนม 48 ตำแหน่ง) และการเรียงลำดับแซงเกอร์ (7 ตำแหน่งสำหรับแท็กชาสูงสุด 142 แท็กชา) ผลจากการสุมตัวอย่าง วิธีการวิเคราะห์วิวัฒนาการของวงศ์อึ่งอ่าง (Family Microhylidae) และการวิเคราะห์คลด (Clades) โดยใช้หลักการ Maximum parsimony ในแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่ามีลักษณะที่คล้ายคลึงกันของวงศ์อึ่งอ่าง(Microhylidae) และมีค่า Bootstrap ค่อนข้างน้อยในความสัมพันธ์ระหว่างวงศ์ย่อย แต่มีการตั้งชื่อสกุลย่อยใหม่ 2 สกุล ทั้งแบบโมโนไทป์ (Peloso et al., 2016)

การศึกษาแนวกันแม่น้ำแดงและความแปรผันของภูมิอากาศแบบไพลสโตซีน (Pleistocene) ทำให้เกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมของอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) (Anura: Microhylidae) ในตอนใต้ของจีนและอินโดจีน ในการศึกษาที่มีการอิงจากประวัติศาสตร์ทางธรณีวิทยาของภูมิภาคนี้ ทดสอบ 2 สมมติฐานโดยใช้ประวัติวิวัฒนาการของไมโครไฮลาฟิสซิปีสที่ซับซ้อน การใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอจากทั้งยีนไมโทคอนเดรียและนิวเคลียส พบว่ามีสมมติฐานที่ 1 ว่าแม่น้ำแดงเป็นอุปสรรคต่อการไหลของยีนและการแพร่กระจายของอึ่งน้ำเต้า มีสมมติฐานที่ 2 ว่าการหมุนเวียนภูมิอากาศแบบไพลสโตซีน (Pleistocene) ส่งผลต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมและการดำรงชีวิตของอึ่งน้ำเต้า เก็บตัวอย่างอึ่งน้ำเต้า ทั้งหมด 324 ตัวจาก 76 พื้นที่ เก็บตัวอย่างจากนี้ไว้ทำการเก็บตัวอย่างตัวอย่างทั้งหมดจะถูกการุณยฆาตโดยใช้เบนโซเคน และเก็บรักษาไว้เป็นตัวอย่างอ้างอิงงานวิจัย (voucher specimens) และใช้ยีน cytochrome b (Cytb) พบมีการแบ่งแยกทางพันธุกรรมที่สำคัญ 2 อย่างที่เชื่อมโยงกับแม่น้ำแดง มีการเคลื่อนตัวของเปลือกโลกยุคไมโอซีนที่เกี่ยวข้องกับแม่น้ำแดงทำให้เกิดความหลากหลาย แบบจำลองการกระจายพันธุ์ (SDM) ที่มีความแตกต่างทางนิเวศวิทยาที่สำคัญระหว่างฝั่งแม่น้ำแดง ดังนั้น ความแตกต่างทางนิเวศวิทยาจึงมีความหลากหลายทางลำดับวงศ์ การดำรงชีวิต และ แบบจำลองการกระจายพันธุ์ (SDM) รูปแบบในภาคใต้ของจีนกับการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในระดับสูงสุดของธารน้ำแข็ง (LGM) ยกเว้นในอินโดจีน ความแตกต่างในภูมิศาสตร์และสภาพอากาศระหว่าง 2 พื้นที่นี้เป็นการค้นพบที่ดีที่สุด ปฏิบัติการตอบสนอง

ต่อการหมุนเวียนของธารน้ำแข็งซึ่งน้ำแข็งในยุคไพลสโตซีนมีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์และภูมิภาค (Yuan et al., 2016)

การศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกและโพรงปากของอึ่งแดง อึ่งขาคำ และอึ่งลายแต้ม โดยคัดเลือกลูกอ๊อดในระยะ 36-38 วัน มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา 26 ลักษณะ พบว่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ได้แก่ ลูกอ๊อดอึ่งขาคำและลูกอ๊อดอึ่งลายแต้มมีปลายหางเรียวยาวแหลมเป็นเส้น ส่วนลูกอ๊อดอึ่งลายมีปลายหางเรียวยาวแหลมไม่เป็นเส้น และโครงสร้างภายในโพรงปากมีความแตกต่างกัน ลูกอ๊อดอึ่งลายและลูกอ๊อดอึ่งขาคำมีแผ่นปิดรูจมูกภายใน และโพรงปากไม่เรียบ มีพาลิลลี (papillae) ส่วนลูกอ๊อดอึ่งลายแต้มไม่พบแผ่นปิดรูจมูกภายใน และโพรงปากเรียบ ไม่มีพาลิลลี (papillae) ดังนั้น การวัดสัณฐานวิทยาสามารถแยกความแตกต่างทางชนิดได้ (จันทร์ทิพย์ ช่วยเงิน, 2560)

การศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอก โครงสร้างช่องปาก และพฤติกรรมการกินของอึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra* TADPOLES (Grey, 1831)) (Amphibia: Anura: Microhylidae) มีการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าช่องปากในระยะต่าง ๆ ของตัวอ่อนนั้นไม่มีขากรรไกร ฟันปาก และเคราโตดอนต์ แทนที่จะมีปลายแหลมตรงข้ามกับปากที่วางแนวหน้าท้อง (umbelliform) จากการศึกษาพบว่าลูกอ๊อดของอึ่งอ่างบ้าน เป็นตัวป้อนสารแขวนลอย (nekton) และเริ่มให้อาหารตั้งแต่วัย 25 เป็นต้นไป ในช่วงแรกของการให้อาหาร พวกมันกินเศษซากและวัสดุจากพืชเป็นส่วนใหญ่ และในช่วงต่อมาของการให้อาหารพวกมันกินทั้งแมลงก้นดอพืชและแมลงก้นดอสัตว์ ในระยะ 42 ลูกอ๊อดหยุดให้อาหาร ส่วนปากจะเสื่อมและค่อยๆ เปลี่ยนเป็นปากโตเต็มวัย มีการกินสาหร่ายไดอะตอม (Bacillariophyceae) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanophyceae) เป็นอาหาร ในการขยายพันธุ์มีอัตราการเพิ่มที่เร็วขึ้นภายในระยะเวลาอันสั้น (Lalremsanga et al., 2017)

ในการศึกษาพันธุศาสตร์ของเซลล์อึ่งอ่างที่นิยมบริโภคในจังหวัดกาฬสินธุ์ โดยที่พันธุศาสตร์ของเซลล์อึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus* Günther, 1868) อึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra* Gray, 1831) และอึ่งอ่างก้นขีด (*Kaloula mediolineata* Smith, 1917) ในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ ได้ศึกษาการจัดเรียง แคโรไทป์และไอดีโอแกรมของตัวอย่างอึ่งอ่างบ้านทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 5 ตัว ด้วยเทคนิคการย้อมสีธรรมดา (conventional staining technique) มีการเตรียมโครโมโซมระยะเมทาเฟสจากไขกระดูกด้วยวิธีทางตรงข้ามด้วยการฉีดสารโคลชิซิน 1% เข้าช่องท้อง

จากนั้นมีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาโดยใช้สีจิมซ่า 10% ผลการศึกษาพบว่า อึ่งปากขวด (*G. molossus*) มีโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 26 แคริโอไทป์ ประกอบด้วย 10m + 3sm คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 อึ่งอ่างบ้าน (*K. pulchra*) มีโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 28 แคริโอไทป์ ประกอบด้วย 7m + 7sm คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 56 และอึ่งอ่างก้นขีด (*K. mediolineata*) มีโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 28 แคริโอไทป์ ประกอบด้วย 4m + 10sm คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 56 (จารุนันท์ พากิตี, นพคุณ รักดิณรงค์ และคมสร เล่าห์ประเสริฐ, 2561)

การศึกษาการวิเคราะห์ของอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla ornate*) (Anura, Microhylidae) ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีนไมโทคอนเดรียในการระบุอนุกรมวิธานของอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla ornate*) เป็นสปีชีส์ที่มีมาจากชายฝั่งตะวันตกเฉียงใต้ของอินเดียในปี พ.ศ. 2384 มีรายงานว่าพบความหลากหลายทั่วทั้งเอเชียใต้ ตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla ornate*) พบได้เฉพาะเอเชียใต้ แต่ชนิดนี้ยังคงพบเห็นได้ทั่วไปในอินเดียและภูมิภาคใกล้เคียง เก็บตัวอย่างอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla ornate*) ทั้งหมด 62 ตัว ในอินเดีย เก็บตัวอย่างจากกล้ามเนื้อต้นขา (ตัวเต็มวัย/ตัวอ่อน) หรือหาง (ลูกอ๊อด) ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain Reaction :PCR) และการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (Molecular analysis) ใช้ไพรเมอร์ ได้แก่ 16Sar และ16Sbrและใช้ยีน 16S rRNA ผลการศึกษาพบว่าอนุกรมวิธานของอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla ornate*) นี้จำกัดเฉพาะในคาบสมุทรอินเดียและศรีลังกา และพบ 3 ชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ *Microhyla mukhlesuri*, *Microhyla mymensinghensis* และ *Microhyla nilphamariensis* ในอินเดีย สรุปว่า เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดเหมาะกับการระบุชนิดที่มีการกระจายพันธุ์อย่างรวดเร็ว และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla ornate*) ในเอเชียใต้ (Grag et al., 2018)

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างทางพันธุกรรม และความแปรผันทางสัณฐานของอึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย จากยีน 16S rRNA และ Cytochrome b พบว่า มีผลการศึกษาแสดงว่าแฮพโลไทป์จำเพาะ (unique haplotype) 6 จากทั้งหมด 9 แฮพโลไทป์ ในขณะที่อีก 2 แฮพโลไทป์ มีความถี่สูงและการกระจายอยู่ในบริเวณเทือกเขาภูพาน ความหลากหลายของแฮพโลไทป์และนิวคลีโอไทด์อยู่ระดับต่ำ ($h = 0.718$, $\pi = 0.00464$) แสดงให้เห็นว่าเทือกเขาภูพานไม่สูงพอที่จะเป็นอุปสรรคทาง ภูมิศาสตร์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างที่ราบสูงแอ่งโคราช

และสกลนคร นอกจากนี้การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันทางภูมิศาสตร์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาขอพบความสัมพันธ์กับแนวเส้นละติจูดที่เปลี่ยนแปลงโดยขนาดของความยาวหัวและความยาวกระดูกขาหลังมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Nonsriratch et al., 2019)

การศึกษาทางสายวิวัฒนาการของอึ่งขำ (Microhyla heymonsi Vogt, 1911) (Anura: Microhylidae) ในเกาะสุมาตรา จากยีนไมโทคอนเดรีย 16S rRNA มีกระจายตัวในทางตอนใต้ของจีน หมู่เกาะไต้หวัน อินโดจีน คาบสมุทรมลายู และเกาะสุมาตรา พบว่าการกระจายตัวมากแต่เป็นชนิดที่มีความซับซ้อนเนื่องจากอุปสรรคทางภูมิศาสตร์ส่งผลให้เกิดการแยกจากการสืบพันธุ์ การกลายพันธุ์ของยีน และมีการวิวัฒนาการ ใช้ข้อมูลตัวอย่างจาก Genbank โดยใช้ตัวอย่าง 29 ตัว ใช้โปรแกรม H3056 (5'-CTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAGG-3') และ L2606 (5'-CTGACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCACT-3') การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างกลุ่มประชากรอึ่งขำจากภายในเกาะสุมาตราและภายนอกเกาะสุมาตรา พบค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสองชนิดที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน เท่ากับ 3% จากนั้นจึงทำการศึกษาทางสายวิวัฒนาการด้วยการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ใช้หลักการ Neighbor joining Maximum Likelihood และ Bayesian Inference ผลการวิจัยพบว่า อึ่งขำจากเกาะสุมาตราเป็นกลุ่มพันธุกรรมเดียวในแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ จากการวิเคราะห์ทั้งหมดพบว่ามีค่า Bootstrap ที่มีนัยสำคัญ ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของอึ่งขำจากเกาะสุมาตรา กับ อึ่งขำจากสิงคโปร์และมาเลเซียยังน้อยกว่า 3% ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างอึ่งขำจากเกาะสุมาตรา และอึ่งขำจากไทย พม่า เวียดนาม และจีนมีค่ามากกว่า 3 % (Akbari et al., 2021)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนในวงศ์อึ่งทั้ง 3 ชนิดของสกุล *Kaloula* (*Kaloula indochinensis*, *Kaloula mediotineata* และ *Kaloula pulchra*) ที่อาศัยอยู่ในภาคใต้และภาคกลางของประเทศเวียดนาม มีลักษณะเด่นเฉพาะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างของส่วนปากและส่วนโค้งของฟัน และสีจะถูกวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวนทางภูมิศาสตร์ พบว่าตัวอ่อนของอึ่งอ่างมลายู (*K. indochinensis*) มีความแตกต่างทางรูปร่างของส่วนปาก ส่วนปลายของลูกออด และกะโหลกศีรษะ ซึ่งตัวอ่อนของอึ่งอ่างมลายู (*K. indochinensis*) และตัวอ่อนของอึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra*) จำนวนและขนาดของไข่ ระยะเวลาของการพัฒนาของตัวอ่อนและตัวอ่อน ขนาดตัวอ่อน และระยะในการฟักไข่ที่แตกต่างกัน (Vassilieva, 2021)

ผลกระทบจากการเกิดไมโอซินต่อสกุล *Kaloula* ทำให้การเกิดรังสีและการลี้ภัยของสัตว์ในท้องถิ่นต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม จากการวิเคราะห์พบว่าความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของสกุล *Kaloula* ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความคลุมเครือ และมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ใช้ยีนไมโทคอนเดรีย โดยใช้ยีน ยีน 12S rRNA และ 16S rRNA มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทป์ 1211 เบส พบว่ายุคอีโอซีนถึงโอลิโกซีน ประมาณ 38.47 ล้านปีก่อน (24.69–53.65). มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เพิ่มขึ้นในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในยุคไมโอซีนต่ำ ประมาณ 20.10 ล้านปีก่อน (8.73–30.65), น่าจะมีต้นกำเนิดจากการแยกตัวและการรังสีที่ถูกกระตุ้นโดยที่ราบของแผ่นดินทิเบตของชิงไห่-ทิเบต ในภายหลังการกระจายไปที่ทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในยุคไมโอซีนสูงเป็นต้นกำหนดเวลาของอิงอ่ามลายู (*K. borealis*) ประมาณ 9.01 ล้านปีก่อน (3.66–15.29) ประชากรที่อยู่กึ่งกลางของแผ่นดินแยกตัวตามเหตุการณ์การกำเนิดเขาและแยกตัวเป็นอิงอ่ามลายู (*K. rugifera*) ในยุคป्लीอocen ประมาณ 3.06 ล้านปีก่อน (0.02–10.90) สรุปได้ว่าความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียของอิงอ่ามลายู (*K. borealis*) ในทางตะวันออกของประเทศจีน และการลี้ภัย การอพยพและการกระจายตัวในทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีน (Othman et al., 2022)



ตารางที่ 2.1 ตารางการรวบรวมข้อมูลของวงศ์อิงอ่าง

	<i>K. medilineata</i>	<i>K. pulchra</i>	<i>G. molossus</i>	<i>G. guttulatus</i>	Microhylidae
Cyb			-Nonsiratch et al., 2019		-Yuan et al., 2016 (<i>M. fissipes</i>)
16S rDNA	- Matsui et al., 2011	-Matsui et al., 2011	-Matsui et al., 2011 -Nonsiratch et al., 2019	-Matsui et al., 2011	-Grag et al., 2018 (<i>M. ornata</i>) -Akbari et al., 2021 (<i>M. heymani</i>) -Othman et al., 2022 (<i>K. borealis</i> and <i>K. rugifera</i>) -ฮิโรชิ วาชิโน และ วิษณุ คุ้มเชื้อ, (2557) (<i>M. fissipes</i> , <i>M. heymani</i> and <i>M. butleri</i>)
COI					
ไมโทคอนเดรีย					-Yang et al., 2000 (<i>K. borealis</i>)
Morphology	-Lalremanga et al., 2017 -จารุณี พงศ์, นพคุณ ลักคิณพงศ์ และศรุต เล่าห์ประเสริฐ (2561) -Nonsiratch et al., 2019 -Vassilieva, 2021	-จารุณี พงศ์, นพคุณ ลักคิณพงศ์ และศรุต เล่าห์ประเสริฐ (2561) -Nonsiratch et al., 2019 -Vassilieva, 2021	-Lajumpon et al., 2012 -จารุณี พงศ์, นพคุณ ลักคิณพงศ์ และศรุต เล่าห์ประเสริฐ (2561)	-จักรพันธ์ ประจักษ์ (2560)	
Distribution			-Boontham & Naritoom, 2015		
Taxonomy			-Peloso et al., 2016	-Peloso et al., 2016	-Peloso et al., 2016
Behavior			-Altig & Rowley, 2014	-Altig & Rowley, 2014	
Karyotypic	-สรวิศ คอมกุล และอัสมิยา จิตติภูมิ, (2548) -จารุณี พงศ์, นพคุณ ลักคิณพงศ์ และศรุต เล่าห์ประเสริฐ (2561)	-จารุณี พงศ์, นพคุณ ลักคิณพงศ์ และศรุต เล่าห์ประเสริฐ (2561)	-ถาวร สุภาพรม, วาริน อรุณมงคล พล และแก้ว อรุณศิริราช, (2535) -สรวิศ คอมกุล และอัสมิยา จิตติภูมิ, (2548) -จารุณี พงศ์, นพคุณ ลักคิณพงศ์ และศรุต เล่าห์ประเสริฐ (2561)		-Mo et al., 2013 (สกุล <i>Kaloula</i> สปีชีส์ใหม่)

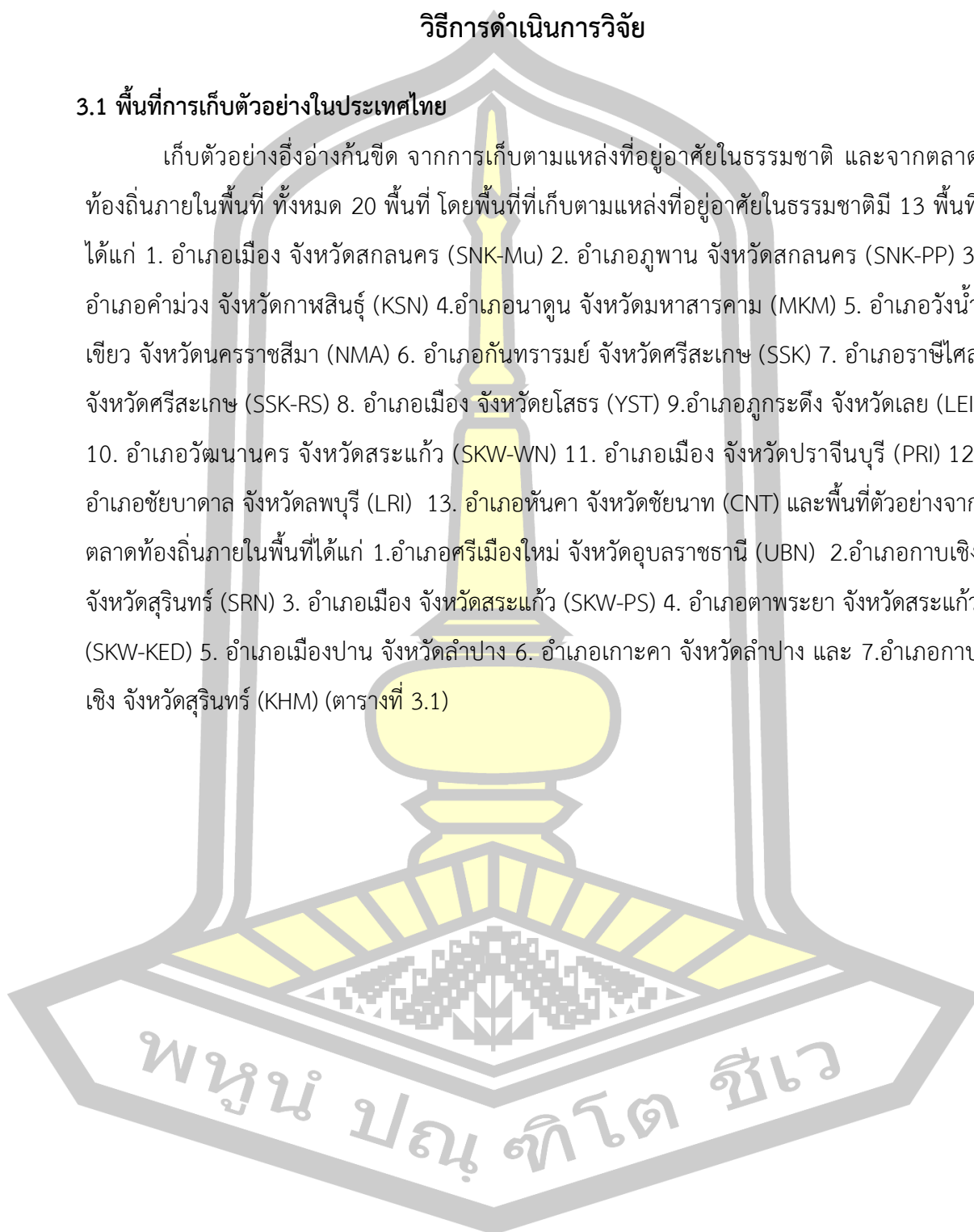
พหุ ประทีป ชีวะ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 พื้นที่การเก็บตัวอย่างในประเทศไทย

เก็บตัวอย่างอ้างอิงกันชนิด จากการเก็บตามแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติ และจากตลาดท้องถิ่นภายในพื้นที่ ทั้งหมด 20 พื้นที่ โดยพื้นที่ที่เก็บตามแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติมี 13 พื้นที่ ได้แก่ 1. อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร (SNK-Mu) 2. อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร (SNK-PP) 3. อำเภอมะนัง จังหวัดกาฬสินธุ์ (KSN) 4. อำเภอนาคู จังหวัดมหาสารคาม (MKM) 5. อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา (NMA) 6. อำเภอกันทรารมย์ จังหวัดศรีสะเกษ (SSK) 7. อำเภอรามัน จังหวัดศรีสะเกษ (SSK-RS) 8. อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร (YST) 9. อำเภอภูกระดึง จังหวัดเลย (LEI) 10. อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว (SKW-WN) 11. อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี (PRI) 12. อำเภอชัยบาดาล จังหวัดลพบุรี (LRI) 13. อำเภอหันคา จังหวัดชัยนาท (CNT) และพื้นที่ตัวอย่างจากตลาดท้องถิ่นภายในพื้นที่ ได้แก่ 1. อำเภอศรีเมืองใหม่ จังหวัดอุบลราชธานี (UBN) 2. อำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ (SRN) 3. อำเภอเมือง จังหวัดสระแก้ว (SKW-PS) 4. อำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว (SKW-KED) 5. อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง 6. อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง และ 7. อำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ (KHM) (ตารางที่ 3.1)



ตารางที่ 3.1 ข้อมูลพื้นที่เก็บตัวอย่างอิงอ่างกันชืดในประเทศไทย

สัญลักษณ์	อำเภอ	จังหวัด	ภาค	ประเทศ	จำนวนตัวอย่าง	ละติจูด	ลองจิจูด
SNK-Mu	เมือง	สกลนคร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	8	17°12'48.1"N	103°59'44.4"E
SNK-PP	ภูพาน	สกลนคร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	6	16°58'15.8"N	103°48'42.6"E
KSN	คำม่วง	กาฬสินธุ์	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	5	16°57'44.2"N	103°41'42.5"E
MKM	นาตุ้ม	มหาสารคาม	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	10	15°42'50.8"N	103°13'37.2"E
NMA	วังน้ำเขียว	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	9	14°25'06.0"N	101°51'00.0"E
UBN	ศรีเมืองใหม่	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	5	15°38'58.8"N	105°29'04.3"E
SSK	กันทรารมย์	ศรีสะเกษ	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	4	15°06'46.2"N	104°34'55.9"E
SSK-RS	ราชโศภิต	ศรีสะเกษ	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	5	15°23'48.9"N	104°12'05.1"E
YST	เมือง	ยโสธร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	5	15°50'39.6"N	104°06'42.1"E
SRN	กาบเชิง	สุรินทร์	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	5	14°27'15.9"N	103°41'18.1"E
KHM	กาบเชิง	สุรินทร์	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	12	14°27'15.1"N	103°41'18.2"E
LEI	ภูกระดึง	เลย	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไทย	5	16°54'18.9"N	101°45'08.9"E
SKW-PS	เมือง	สระแก้ว	ตะวันออก	ไทย	5	13°59'41.2"N	102°12'21.2"E
SKW-KED	ตาพระยา	สระแก้ว	ตะวันออก	ไทย	4	14°07'16.3"N	102°40'26.1"E
SKW-WN	วัฒนานคร	สระแก้ว	ตะวันออก	ไทย	2	13°45'23.5"N	102°18'32.2"E
PRI	เมือง	ปราจีนบุรี	ตะวันออก	ไทย	11	14°07'53.5"N	101°19'57.9"E
LRI	ชัยบาดาล	ลพบุรี	กลาง	ไทย	5	15°12'59.1"N	101°08'23.3"E
CNT	หันคา	ชัยนาท	กลาง	ไทย	5	15°07'57.8"N	99°57'27.1"E
LPG	เมืองปาน	ลำปาง	เหนือ	ไทย	5	18°33'47.3"N	99°27'27.6"E
LPG-KK	เกาะคา	ลำปาง	เหนือ	ไทย	2	18°10'14.5"N	99°22'21.4"E
รวม					118		



3.2 การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บตัวอย่างอิงอ่างกันขี้ดทั้งหมด 118 ตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดถูกการุณยฆาต โดยการแช่ใน 3-amino benzoic acid ethyl ester methanesul- fonate salt (MS-222) (Park et al, 2017) ระบุหมายเลขภาคสนาม ถ่ายรูป จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ (ethanol alcohol) 80 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพตัวอย่าง และนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการ เก็บข้อมูลปัจจัยทางกายภาพ และพิกัดพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม หมายเลข MSUT No 8359 ถึง MSUT No 8476 ขั้นตอนการดำเนินการ ดังกล่าวข้างต้นนั้น ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับและส่งเสริมการ ดำเนินการต่อสัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (คกส. มมส) หมายเลข IACUC-MSU-15/2023



ภาพที่ 3.1 การเก็บตัวอย่างอิงอ่างกันขี้ด

3.3 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์

ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก ๆ ได้แก่

1. การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสัตว์ (DNA extraction)

ทำสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) จากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อต้นขาของอีงอังกั้นชิต จะถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอทีละตัวด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป E.Z.N.A Tissue DNA Kit (Omega bio-tek, GA, USA) ประมาณ 10 – 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติม Buffer TL 200 ไมโครลิตร และ Proteinase K 15 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีหรือจนกว่าชิ้นตัวอย่างจะละลายหมด (บ่มข้ามคืนใช้ 37 องศาเซลเซียส) เติม Buffer BL 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer) บ่มข้ามคืนใช้ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม absolute ethanol ปริมาตร 220 ไมโครลิตร นำไปเขย่าและดูสารละลายใส่ใน HiBind® DNA Mini Column ที่ใส่ collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่ใส่ และใส่ HiBind® DNA Mini Column กลับใน collection tube อันเดิม เติม HBC Buffer 400 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่ใส่ และใส่ HiBind® DNA Mini Column กลับใน collection tube อันเดิม เติม DNA Wash Buffer 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่ใส่ และใส่ HiBind® DNA Mini Column ใน collection tube อันเดิม เติม DNA Wash Buffer 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ที่ใส่ และใส่ HiBind® DNA Mini Column กลับใน collection tube อันเดิม ปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่า ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่ collection tube และใส่ HiBind® DNA Mini Column ในหลอด (ใหม่) 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำ Elution Buffer ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มาเติม 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

2. การเพิ่มจำนวนยีน Cytochrome b และ 16S rDNA

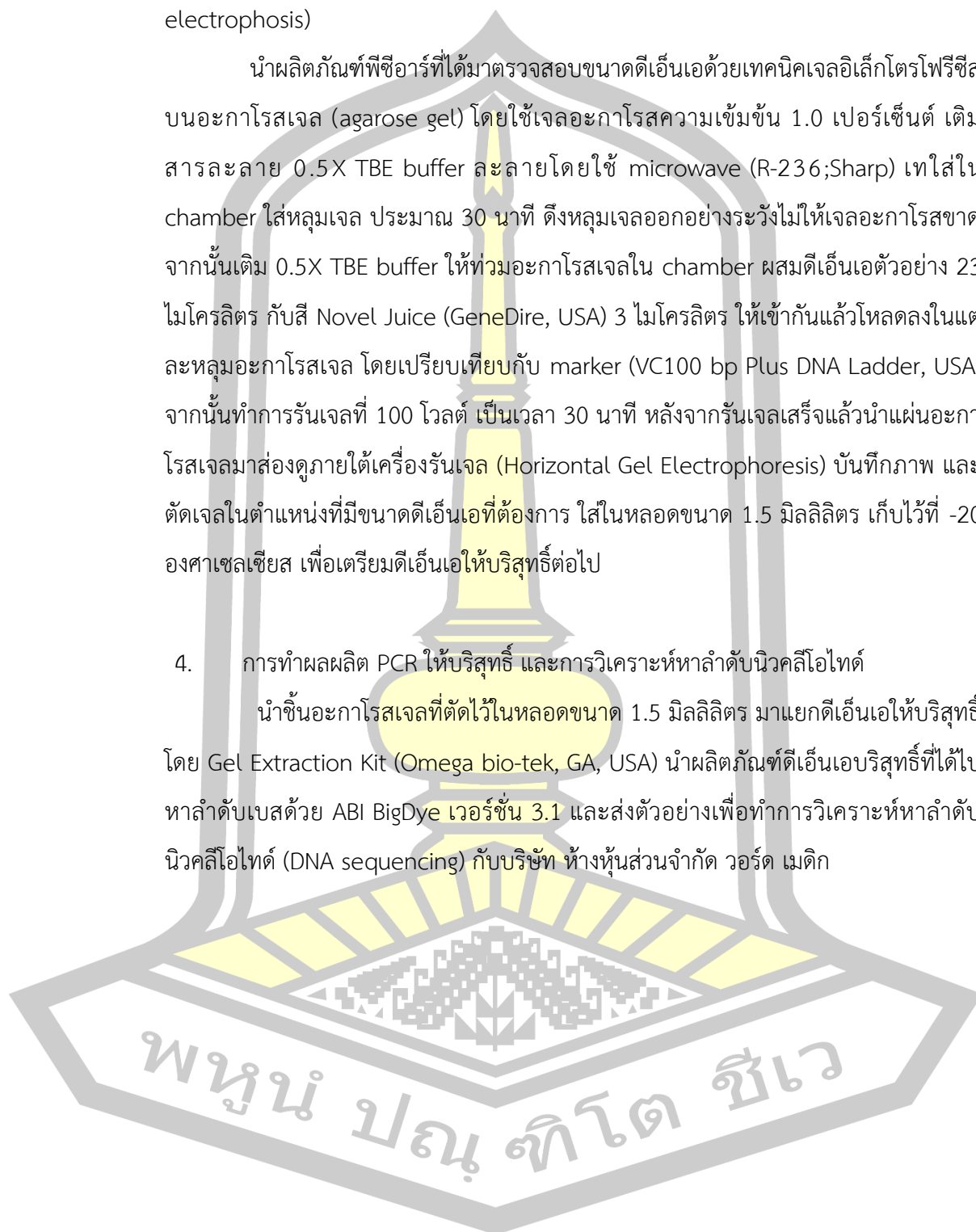
เพิ่มจำนวนยีน Cytochrome b และ 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain Reaction :PCR) แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของ อึ่งอ่างก้นขีด ด้วยคู่ไพรเมอร์โดยใช้ forward primer และ reverse primer ดัง นี้ L14883(5'-TCTGCTTAATTGCTCAAATCGC-3') และ H15548(5'-AATAGGAAGTAGCACTCTGGTTTAAT-3') ของยีนไซโตโครมบี (Cytochrome b gene) (Matsui et al., 2005), 16SAL (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') และ 16SAH (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi, 1996) ของยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA) ด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้เครื่อง MyCycler™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, London, UK) ทำส่วนผสมของ PCR (PCR mixture) ในปริมาตร reaction ละ 25 µl ซึ่งประกอบด้วย น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 18.875 µl, 10X Ex buffer ปริมาตร 2.5 µl, 10 µM dNTPs ปริมาตร 0.5 µl, forward และ reverse primer ที่มีความเข้มข้น 10 pM ปริมาตรอย่างละ 1 µl และเติม Ex Taq polymerase (Takara, Shiga, Japan) ความเข้มข้น 5 U/µl ปริมาตร 0.125 µl และใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นประมาณ 10 ถึง 50 ng/ul ปริมาตร 1 µl หลังจากนั้นใช้เครื่อง MyCycler™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, London, UK) มีขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยีน Cytochrome b ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ประกอบด้วย 5 ช่วงอุณหภูมิ ได้แก่ 1. initial denature 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 2. Denature 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที 35 รอบ 3. Annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 รอบ 4. Extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 รอบ 5. final extension step 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ส่วนขั้นตอนการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ประกอบด้วย 5 ช่วงอุณหภูมิ ได้แก่ 1. initial denature 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 2. Denature 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 35 รอบ 3. Annealing 50 องศาเซลเซียส 40 วินาที 35 รอบ 4. Extension 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที 35 รอบ 5. final extension step 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

3. การตรวจสอบผลของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophosis)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล (agarose gel) โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เติมสารละลาย 0.5X TBE buffer ละลายโดยใช้ microwave (R-236;Sharp) เทใส่ใน chamber ใส่หลุมเจล ประมาณ 30 นาที ดังหลุมเจลออกอย่างระมัดระวังไม่ให้เจลอะกาโรสขาด จากนั้นเติม 0.5X TBE buffer ให้ท่วมอะกาโรสเจลใน chamber ผสมดีเอ็นเอตัวอย่าง 23 ไมโครลิตร กับสี Novel Juice (GeneDire, USA) 3 ไมโครลิตร ให้เข้ากันแล้วโหลดลงในแต่ละหลุมอะกาโรสเจล โดยเปรียบเทียบกับ marker (VC100 bp Plus DNA Ladder, USA) จากนั้นทำการรันเจลที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากรันเจลเสร็จแล้วนำแผ่นอะกาโรสเจลมาส่องดูภายใต้เครื่องรันเจล (Horizontal Gel Electrophoresis) บันทึกภาพ และตัดเจลในตำแหน่งที่มีขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ต่อไป

4. การทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำชิ้นอะกาโรสเจลที่ตัดไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร มาแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดย Gel Extraction Kit (Omega bio-tek, GA, USA) นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปหาลำดับเบสด้วย ABI BigDye เวอร์ชัน 3.1 และส่งตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) กับบริษัท ห้างหุ้นส่วนจำกัด วอร์ด เมติก



3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างถูกตรวจสอบความถูกต้องด้วยตาเปล่าโดยใช้โปรแกรม ABI sequence scanner เวอร์ชัน 1.0 และ BioEdit นำมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ทางด้านพันธุศาสตร์เชิงประชากร ได้แก่ number of polymorphic sites, number of haplotypes (h), haplotype diversity (hd; Saitou & Nei, 1987) และ nucleotide diversity (π ; Saitou & Nei, 1987) และค่า mean number of nucleotide differences ระหว่าง haplotype ทั้งหมดด้วยโปรแกรม DnaSP เวอร์ชัน 5.00 (Librado & Rozas, 2009) ทำการวิเคราะห์ haplotype network (Network เวอร์ชัน 4.6.1.0) โดยใช้หลักการ median-joining algorithm (Bandelt et al., 1999) และการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้หลักการ maximum likelihood (ML) และ neighbor joining (NJ) และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) (Tajima & Nei, 1984) โดยใช้โปรแกรม MEGA X เวอร์ชัน 10 (Kumar et al., 2018)



บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไมโทคอนเดรีย โดยใช้ยีน Cytochrome b ซึ่งมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทป์ 652 เบส จากจำนวนตัวอย่าง 118 ตัวอย่าง และ ยีน 16S rDNA มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทป์ 544 เบส จากจำนวนตัวอย่าง 52 ตัวอย่าง ซึ่งมีการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (segregation site) ของยีน 16S rDNA จำนวน 11 ตำแหน่ง และพบตำแหน่งเกิดการแปรผันสูงสุดในประชากรอิงอ่างกันซิด คือ อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี และอำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว และชายแดน ไทย-กัมพูชา ส่วนของตำแหน่งเกิดการแปรผันต่ำที่สุดในประชากรอิงอ่างกันซิด คือ อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร อำเภอดำม่วง จังหวัดกาฬสินธุ์ อำเภอกันทรารมย์ จังหวัดศรีสะเกษ และอำเภอภูกระดึง จังหวัดเลย มีการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (segregation site) ของยีน Cytb จำนวน 90 ตำแหน่ง และพบตำแหน่งเกิดการแปรผันสูงสุดในประชากรอิงอ่างกันซิดในอำเภอเมือง จังหวัดสระแก้ว (29 ตำแหน่ง) รองลงมาเกิดการแปรผันในประชากรอิงอ่างกันซิดในอำเภอเกาะคาจังหวัดลำปาง (27 ตำแหน่ง) ส่วนอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว ไม่มีความแปรผันของประชากรอิงอ่างกันซิด และเมื่อนำยีน Cytochrome b ไปวิเคราะห์จัดรูปแบบแฮพโลไทป์ (Haplotype distribution) ปรากฏรูปแบบแฮพโลไทป์ ทั้งสิ้นจำนวน 52 แฮพโลไทป์ ได้แก่ Km1 ถึง Km52 โดยมีความถี่และการกระจายของแฮพโลไทป์ในแต่ละประชากรแตกต่างกัน และพบว่ากลุ่มตัวอย่างประชากรอิงอ่างกันซิดจากอำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี มีจำนวนแฮพโลไทป์ (Nh) มากที่สุดคือ 8 รูปแบบ รองลงมาได้แก่ 1.กลุ่มตัวอย่างประชากรจากอำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 2.กลุ่มตัวอย่างประชากรจากอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา 3.กลุ่มตัวอย่างประชากรจากอำเภอคาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ (KHM)ซึ่งมีจำนวนแฮพโลไทป์ 7 รูปแบบ ส่วนกลุ่มตัวอย่างจากอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว มีจำนวนแฮพโลไทป์น้อยที่สุดเพียง 1 รูปแบบเท่านั้น จากการวิเคราะห์ ความถี่ของแฮพโลไทป์พบว่ารูปแบบแฮพโลไทป์ที่ 21 (Km21) มีความถี่สูงและกระจายในตัวอย่างอิงอ่างกันซิดถึง 14 ตัวอย่าง จาก 118 ตัวอย่าง (%) รองลงมาคือรูปแบบแฮพโลไทป์ที่ 7 (H7) พบใน ตัวอย่างอิงอ่างกันซิด 8 ตัวอย่าง (%) และรูปแบบแฮพโลไทป์ที่พบความถี่น้อยที่สุดคือ รูปแบบแฮพโลไทป์ที่ Km2 Km4 Km6 Km9 Km11

Km12 Km13 Km15 Km16 Km17 Km18 Km19 Km20 Km24 Km25 Km27 Km28
Km29 Km30 Km33 Km34 Km36 Km37 Km38 Km40 Km44 Km45 Km46 Km47
Km48 Km50 และ Km51 พบเพียงอย่างละ 1 ตัวอย่าง โดย

แอฟโพลไทป์ที่ Km2 พบในกลุ่มประชากรจากจังหวัดชัยนาท

แอฟโพลไทป์ที่ Km7 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอกะลา จังหวัดลำปาง

แอฟโพลไทป์ที่ Km9 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอกู่กระดิ่ง จังหวัดเลย

แอฟโพลไทป์ที่ Km 10 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง

แอฟโพลไทป์ที่ Km14 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอดาพระยา จังหวัดสระแก้ว

แอฟโพลไทป์ที่ Km18 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์

แอฟโพลไทป์ที่ Km19 พบในกลุ่มประชากรจากปราจีนบุรี

แอฟโพลไทป์ที่ Km20 และ Km21 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอบางสีดา
จังหวัดสระแก้ว

แอฟโพลไทป์ที่ Km23 Km24 Km25 Km26 Km27 และ Km28 พบในกลุ่ม
ประชากรจากอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา

แอฟโพลไทป์ที่ Km29 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอกันทรารมย์ จังหวัดศรีสะเกษ

แอฟโพลไทป์ที่ Km30 Km31 และ Km32 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอป่าศรี
เมืองใหม่ จังหวัดอุบลราชธานี

แอฟโพลไทป์ที่ Km33 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี
รูปแบบแอฟโพลไทป์ที่ Km34 Km35 และ Km37 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอดำม่วง
จังหวัดกาฬสินธุ์ รูปแบบแอฟโพลไทป์ที่ Km41 Km42 Km43 Km44 และ Km45 พบใน
กลุ่มประชากรจากอำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร รูปแบบแอฟโพลไทป์ที่ Km48 และ Km49
พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ (KHM) รูปแบบแอฟโพลไทป์ที่
Km50 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอดาพระยา จังหวัดสระแก้ว รูปแบบแอฟโพลไทป์ที่
Km51 พบในกลุ่มประชากรจากอำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ (ตารางที่ 4.1)

นอกจากนี้การวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรอิงอ่างกัน
จัดจาก 20 พื้นที่ในประเทศไทย โดยใช้ส่วนของยีน Cytb พบค่าความหลากหลายทางของ
แฮพโลไทป์ (haplotype diversity, Hd) อยู่ในช่วงระหว่าง 0.000 และ 1.000 ± 0.500
โดยมีค่าเฉลี่ย 0.969 ± 0.007 และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide
diversity; Nd) อยู่ในช่วงระหว่าง 0.000 และ 0.04141 ± 0.02071 โดยมีค่าเฉลี่ย
 0.01511 ± 0.00089 และเมื่อวิเคราะห์ด้วยยีน 16S rDNA พบค่าความหลากหลายทางของ
แฮพโลไทป์ อยู่ในช่วงระหว่าง 0.000 และ 1.000 ± 0.500 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.964 ± 0.014
และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ อยู่ในช่วงระหว่าง 0.0000 และ
 0.00797 ± 0.00222 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.00531 ± 0.00037 ในส่วนของยีน 16S rDNA มีบางพื้นที่
ที่มี 2 ตัวอย่างและ 1 ตัวอย่างจะไม่สามารถนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบได้ (ตารางที่ 4.1)



4.2 การวิเคราะห์เครือข่ายแฮพโลไทป์และแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (haplotype network and Phylogenetic tree)

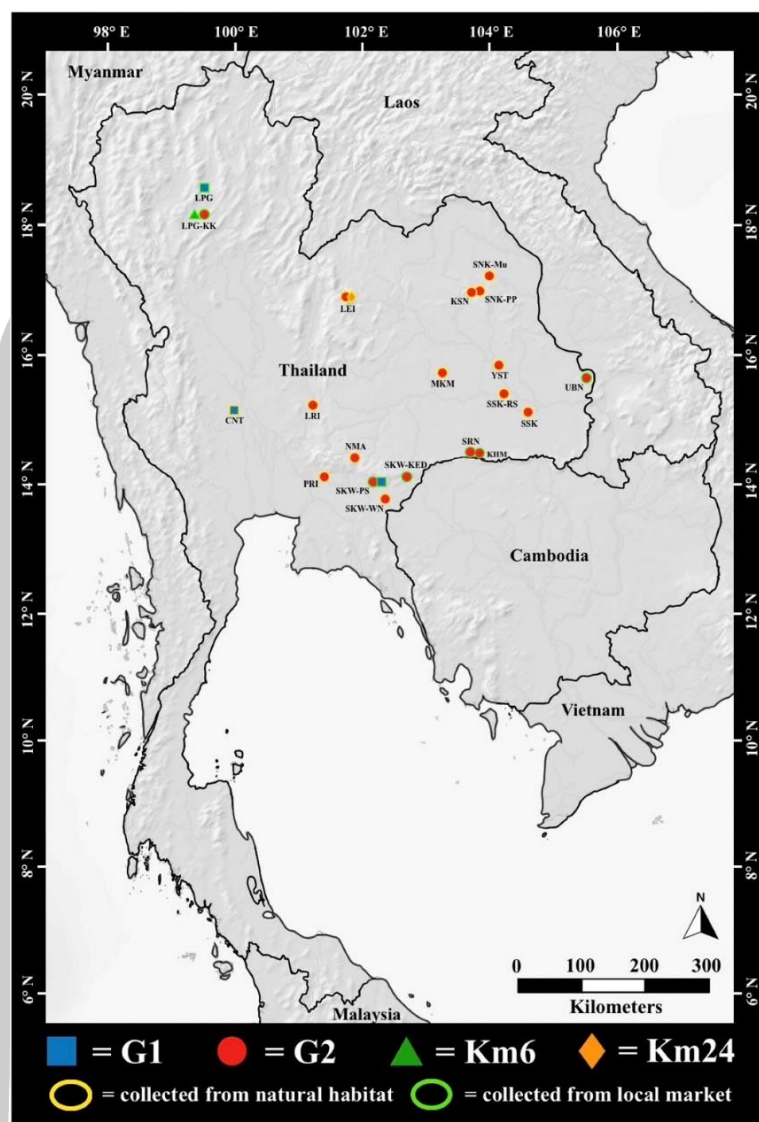
การวิเคราะห์ในการจำแนกกลุ่มทางพันธุกรรมด้วยวิธีการสร้างเครือข่ายแฮพโลไทป์ โดยใช้จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 118 ตัวอย่าง จำแนกตามลักษณะแฮพโลไทป์ที่ตรวจพบของยีน Cytb (Km1 – Km52) สามารถแยกกลุ่มพันธุกรรมของอิงอ่างกันชิดจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย ออกได้เป็น 2 กลุ่มพันธุกรรม ได้แก่ กลุ่มพันธุกรรม G1 ประกอบด้วย 5 แฮพโลไทป์ ได้แก่ Km1, Km2, Km3, Km4 และ Km9 จากอำเภอหันคา จังหวัดชัยนาท อำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง และอำเภอเมือง จังหวัดสระแก้ว กลุ่มพันธุกรรม G2 ประกอบด้วย 45 แฮพโลไทป์ ได้แก่ Km5, Km7-Km23, Km25-Km52 จากอำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร อำเภอดำม่วง จังหวัดกาฬสินธุ์ อำเภอนาคู จังหวัดมหาสารคาม อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา อำเภอศรีเมืองใหม่ จังหวัดอุบลราชธานี อำเภอกันทรารมย์ จังหวัดศรีสะเกษ อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร อำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ อำเภอภูกระดึง จังหวัดเลย อำเภอเมือง จังหวัดสระแก้ว อำเภอตาพระยา จังหวัดสระแก้ว อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี อำเภอชัยบาดาล จังหวัดลพบุรี อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง และ อำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ ซึ่งมีอีก 2 กลุ่มพันธุกรรม คือ Km6 (อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง) และ Km24 (อำเภอภูกระดึง จังหวัดเลย) (รูปที่ 4.1) เนื่องจากมีเพียง 1 ตัวอย่างจึงไม่สามารถเรียกว่ากลุ่มพันธุกรรมได้ แต่สามารถนำไปเป็นความรู้ในการศึกษาต่อไปได้ (รูปที่ 4.2) ในส่วนของค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มพันธุกรรม G1 และ G2 ของอิงอ่างกันชิด มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.028 และ มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.608 (ตารางที่ 4.2) และในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 52 ตัวอย่าง จำแนกตามลักษณะแฮพโลไทป์ที่ตรวจพบของยีน 16S rDNA (Km1 – Km31) ไม่สามารถแยกกลุ่มพันธุกรรมของอิงอ่างกันชิดเป็นกลุ่มพันธุกรรมเดียว

ทำการสุ่มตัวอย่างอิงอ่างกันชิดจากแต่ละแฮพโลไทป์ จำนวน 52 ตัวอย่าง ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน Cytb มาวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (Phylogenetic tree) โดยใช้อิงอ่างมลายู (*Kaloula baleata* (Müller, 1833)) KY132187 ที่พบอยู่ในฐานข้อมูล GenBank จากจังหวัดชูลาเวซี ประเทศอินโดนีเซียเป็น out-group พบว่าประชากรอิงอ่างกันชิดจาก 20 พื้นที่ในประเทศไทย สามารถแบ่งกลุ่มพันธุกรรมออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม G1 และ G2 (รูปที่ 4.3) และพบว่า G1 ประกอบด้วย ได้แก่ Km1, Km2, Km3, Km4, Km6 และ Km9 ในขณะที่ G2 มี 2 subclades ประกอบด้วย subclade G2A ได้แก่ Km8, Km11, Km12, Km13, Km21-Km31,

Km34, Km37, Km39-Km52 และ subclade G2B ได้แก่ Km5, Km7, Km10, Km14, Km15, Km16, Km17, Km18, Km19, Km20, Km32, Km33, Km35 และ Km36

จากการสุ่มตัวอย่าง ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จำนวน 31 แอสโพลไทป์ โดยมี ของอิงอ่างมลายู (*Kaloula baleata* (Müller, 1833)) KY180032.1 ที่พบอยู่ในฐานข้อมูล GenBank จาก ประเทศแคนาดาเป็น out-group พบว่าไม่สามารถแยกกลุ่มพันธุกรรมของอิงอ่างกัน ชัดจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย เช่นเดียวกับการวิเคราะห์เครือข่ายแอสโพลไทป์





ภาพที่ 4.1 แผนที่การกระจายความถี่ของอึ่งอ่างกันขี้ต ซึ่งสามารถจำแนกกลุ่มพันธุกรรมได้ 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มพันธุกรรม G1 และ G2 สำหรับ Km6: อำเภอกะลา จังหวัดลำปาง และ Km24: อำเภอกู่กระดิง จังหวัดเลยนั้นพบตัวอย่างพื้นที่ละ 1 ตัวอย่าง จึงไม่สามารถ เรียกว่ากลุ่มพันธุกรรมได้

พูน บณ ทิโต ชเว

ตารางที่ 4.1 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงอ่างกันซีต 20 กลุ่มประชากรจาก วิเคราะห์ โดยใช้ส่วนของยีน Cytb ขนาดความยาว 652 คู่เบส และ 16S rDNA ขนาดความยาว 544 คู่เบส

ประชากร	Cytb						16S							
	N	S	H	Uh	Haplotype distribution	Hd ± SD	Nd ± SD	N	S	H	Uh	Haplotype distribution	Hd ± SD	Nd ± SD
Km-Th-SNK-Mu	8	11	7	4	H21, H39, H42, H44, H45, H46, H47	0.964±0.077	0.00603±0.00103	3	2	3	0	H2, H13,H14	1.000±0.272	0.00245±0.00082
Km-Th-SNK-PP	6	9	4	1	H21, H39, H42, H48	0.867±0.129	0.00634±0.00127	2	0	1	0	H15	0	0
Km-Th-KSN	5	9	4	3	H37, H38, H39, H40	0.900±0.161	0.00583±0.00193	2	0	1	0	H2	0	0
Km-Th-MKM	10	14	4	0	H35, H41, H42, H43	0.800±0.089	0.00818±0.00259	3	2	2	0	H4, H5	0.667±0.314	0.00245±0.00116
Km-Th-NMA	9	15	7	6	H21, H39, H42, H44, H45, H46, H47	0.917±0.092	0.00613±0.00137	3	6	3	2	H6, H7, H8	1.000±0.272	0.00797±0.00222
Km-Th-UBN	5	4	4	3	H21, H27, H28, H29	0.900±0.161	0.00245±0.00073	3	2	3	1	H2, H5, H219	1.000±0.272	0.00306±0.00096
Km-Th-SSK	4	5	3	2	H21, H25, H26	0.833±0.222	0.00383±0.00160	1	0	1	1	H16	0	0
Km-Th-SSK-RS	5	11	2	0	H7, H52	0.600±0.175	0.01012±0.00296	2	1	2	1	H17, H18	1.000±0.500	0.00184±0.00092
Km-Th-LEI	5	21	4	1	H21, H22, H23, H24	0.900±0.161	0.01350±0.00576	2	0	1	0	H14	0	0
Km-Th-YST	5	2	2	0	H21, H22	0.600±0.175	0.00184±0.00054	3	3	2	1	H2, H27	0.667±0.314	0.00368±0.00173

หมายเหตุ: n, จำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์; S, จำนวนตำแหน่งที่เกิดการแปรผัน (segregation sites); H, จำนวนแฮโลไทป์; Uh, จำนวนแฮโลไทป์ที่พบจำเพาะในแต่ละประชากร; Hd, ความหลากหลายแฮโลไทป์ (haplotype diversity); Nd, ความหลากหลายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity)

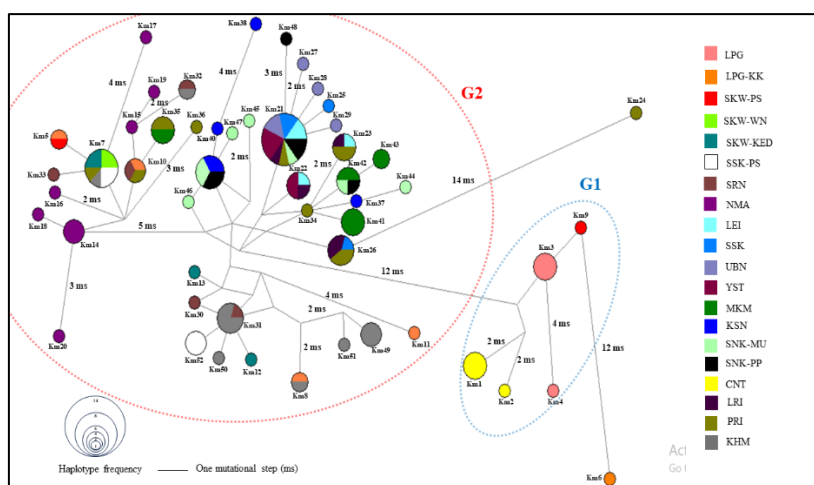


ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ประชากร	Cytb						16S							
	N	S	H	Uh	Haplotype distribution	Hd ± SD	Nd ± SD	N	S	H	Uh	Haplotype distribution	Hd ± SD	Nd ± SD
Km-Th-SRN	5	15	5	2	H10, H30, H31, H32, H33	1.000±0.126	0.01227±0.00254	2	2	2	1	H18, H26	1.000±0.500	0.00368±0.00184
Km-KHM	12	20	7	2	H7, H8, H31, H32, H49, H50, H51	0.864±0.079	0.00948±0.00222	4	5	3	1	H1,H2,H3	0.833±0.222	0.00521±0.00141
Km-Th-PRI	11	19	8	2	H7, H10, H21, H23, H26, H34, H35, H36	0.945±0.054	0.01154±0.00117	4	5	4	1	H6,H11,H13, H20	1.000±0.177	0.00521±0.00131
Km-Th-LRI	5	7	4	0	H21, H22, H23, H26	0.900±0.161	0.00521±0.00093	2	2	2	0	H2, H4	1.000±0.500	0.00368±0.00184
Km-Th-SKW-PS	5	29	5	2	H5, H8, H9, H10, H11	1.000±0.126	0.02055±0.00433	3	4	3	2	H14, H24, H25	1.000±0.272	0.00551±0.00171
Km-Th-SKW-KED	4	13	3	2	H7, H12, H13	0.833±0.222	0.01227±0.00328	3	5	3	1	H5, H18, H23	1.000±0.272	0.00613±0.00208
Km-Th-SKW-WN	2	0	1	0	H7	0	0	4	4	4	3	H9, H10, H11, H12	1.000±0.177	0.00429±0.00097
Km-Th-CNT	5	4	2	1	H1, H2	0.400±0.237	0.00245±0.00146	2	1	2	2	H30, H31	1.000±0.500	0.00184±0.00092
Km-Th-LPG	5	4	2	1	H3, H4	0.400±0.237	0.00245±0.00146	2	2	2	2	H28, H29	1.000±0.500	0.00368±0.00184
Km-Th-LPG-KK	2	27	2	1	H5, H6	1.000±0.500	0.04141±0.02071	2	4	2	2	H21, H22	1.000±0.500	0.00735±0.00368
รวม	118	90	52	33		0.969±0.007	0.01511±0.00089	52	11	31	21		0.964±0.014	0.00531±0.00037

หมายเหตุ: n, จำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์; S, จำนวนตำแหน่งที่เกิดการแปรผัน (segregation sites); H, จำนวนแฮโลไทป์; Uh, จำนวนแฮโลไทป์ที่พบจำเพาะในแต่ละประชากร; Hd, ความหลากหลายแฮโลไทป์ (haplotype diversity); Nd, ความหลากหลายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity)



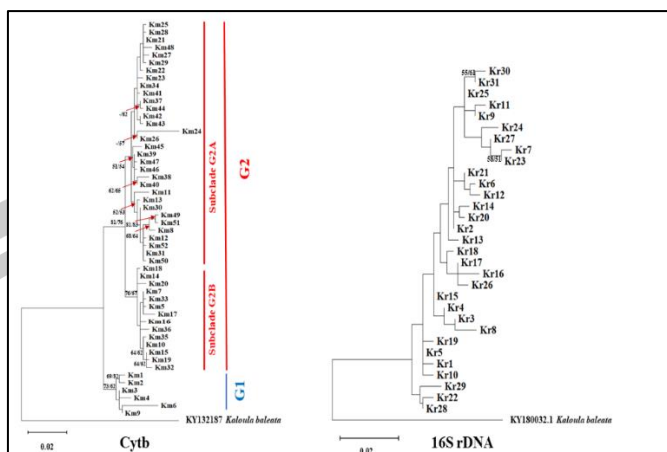


ภาพที่ 4.2 เครือข่ายแฮพลไทป์ของอิงอ่างกันชนิดจำนวน 52 แฮพลไทป์ (Km1 – Km52) วิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytb ขนาดความยาว 652 คู่เบส สามารถจำแนกกลุ่ม พันธุกรรมออกได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ G1 ถึง G2 ที่ค่าความแตกต่างมากกว่า 10 mutational steps ดัง แสดงบนเส้นแขนง

แฮพลไทป์

อิงอ่างกัน (Km1 – Km52)





ภาพที่ 4.3 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำแนกตามลักษณะแฮพลไทป์ของยีน *Cyb* (Km1 – Km52) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มพันธุกรรม (G1 – G2) และ 16S rDNA (Km1 – Km31) ของอึ่งอ่างกันขี้ดจากประเทศไทย และข้อมูลของอึ่งอ่างมลายู (*Kaloula baleata* (Müller, 1833)) KY132187 และ KY180032.1 ที่พบอยู่ในฐานข้อมูล GenBank จากเกาะซูลาเวซี ประเทศอินโดนีเซีย และประเทศแคนาดา ตามลำดับค่า bootstrap โดยใช้หลักการ maximum likelihood (ML) และ neighbor joining (NJ) แสดงบนแขนแต่ละกิ่งของแผนภูมิมีค่า bootstrap มากกว่า 50 และ - แทนค่า bootstrap น้อยกว่า 50

ภาพที่ 4.3 แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์



4.3 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง 20 กลุ่มประชากรของอึ่งอ่างกันขี้ด

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) โดยใช้ข้อมูลของยีน Cytb ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่าง 20 กลุ่มประชากร ส่วนค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ของยีน Cytb เปรียบเทียบระหว่าง 20 กลุ่มประชากรของอึ่งอ่างกันขี้ดในประเทศไทย พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ของยีน Cytb โดยพบว่าอึ่งอ่างกันขี้ดจากอำเภอหันคา จังหวัดชัยนาทและอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา มีค่าความแตกต่างสูงที่สุด โดยพบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) เท่ากับ 0.031 หรือ 3.1% และพบว่าอึ่งอ่างกันขี้ดจากอำเภอหันคา จังหวัดชัยนาทและอำเภอภูกระดึง จังหวัดเลย มีค่าความแตกต่างสูงที่สุด โดยพบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) เท่ากับ 0.031 หรือ 3.1% (Tajima & Nei, 1984) (ตารางที่ 4.3)

4.4 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสกุล *Kaloula* 3 ชนิด

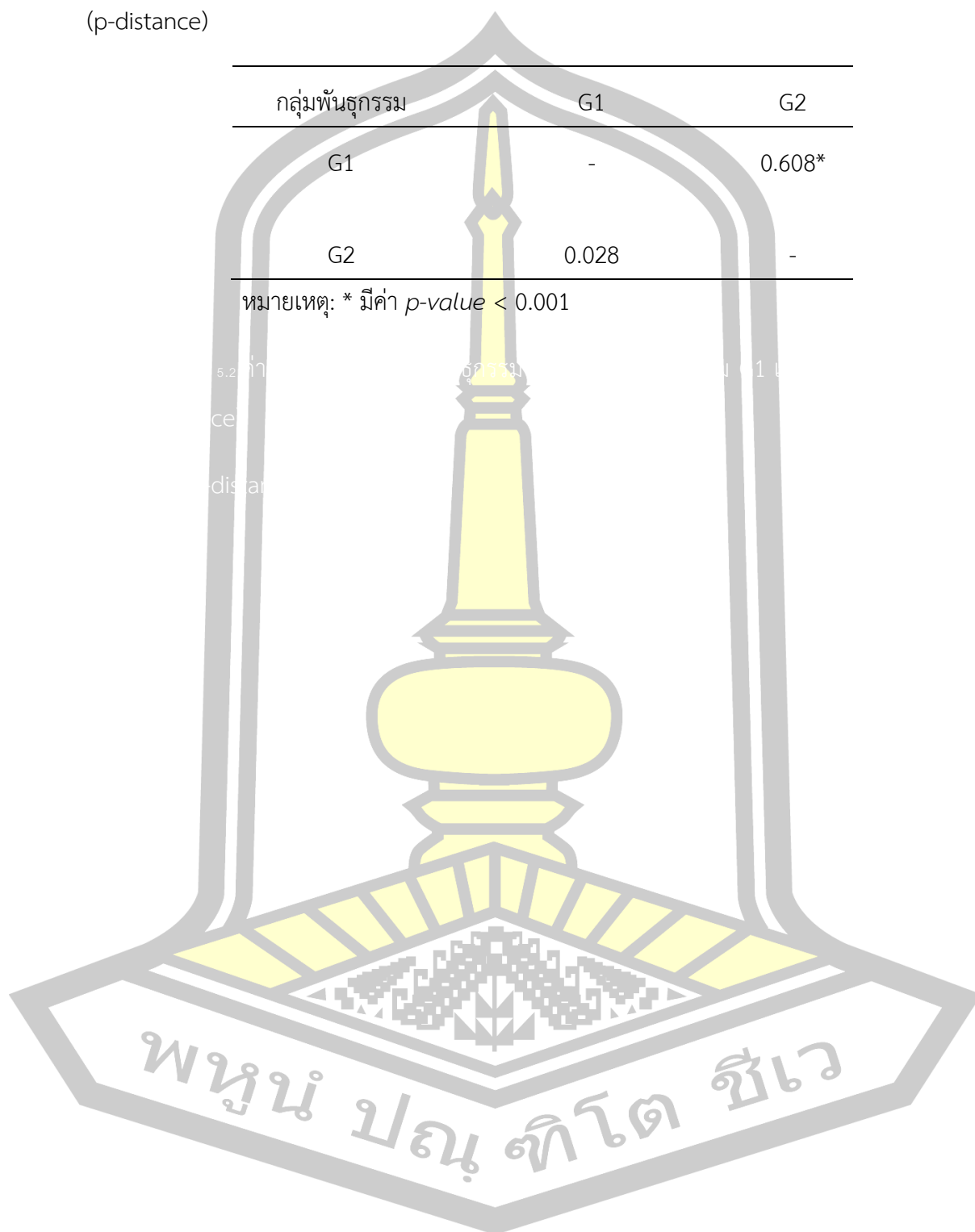
เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) โดยใช้ข้อมูลของยีน Cytb ประกอบด้วย 1. *Kaloula taprobanica* (Parker, 1934) AF249085.1 ที่พบอยู่ในฐานข้อมูล GenBank จากประเทศศรีลังกา 2. *Kaloula pulchra* (Gray, 1831) AB819033.1 ที่พบอยู่ในฐานข้อมูล GenBank จากประเทศบังกลาเทศ 3. *Kaloula borealis* (Barbour, 1908) JQ798754.1 ที่พบอยู่ในฐานข้อมูล GenBank จากจังหวัดเชจู ประเทศเกาหลี พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ของยีน Cytb ระหว่างสกุล *Kaloula* 3 ชนิด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.154 ถึง 0.188 หรือ มีค่าอยู่ระหว่าง 15.4% ถึง 18.8% ของสกุล *Kaloula* ที่เป็นคนละชนิดกัน (Tajima & Nei, 1984) (ตารางที่ 4.4)

พญ. ปณ. จิตโต ชีเว

ตารางที่ 4.2 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มพันธุกรรม G1 และ G2 ของอิงอังกั้นซีด (p-distance)

กลุ่มพันธุกรรม	G1	G2
G1	-	0.608*
G2	0.028	-

หมายเหตุ: * มีค่า $p\text{-value} < 0.001$



ตารางที่ 4.3 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ของยีน Cytb เปรียบเทียบระหว่าง 20 กลุ่มประชากรของอีแร้งก้นขีดในประเทศไทย

	ยีน 1	ยีน 2	ยีน 3	ยีน 4	ยีน 5	ยีน 6	ยีน 7	ยีน 8	ยีน 9	ยีน 10	ยีน 11	ยีน 12	ยีน 13	ยีน 14	ยีน 15	ยีน 16	ยีน 17	ยีน 18	ยีน 19	ยีน 20
ยีน 1	0.00																			
ยีน 2	0.00	0.00																		
ยีน 3	0.00	0.00	0.00																	
ยีน 4	0.00	0.00	0.00	0.00																
ยีน 5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00															
ยีน 6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00														
ยีน 7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00													
ยีน 8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00												
ยีน 9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00											
ยีน 10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00										
ยีน 11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00									
ยีน 12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00								
ยีน 13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							
ยีน 14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00						
ยีน 15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00					
ยีน 16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				
ยีน 17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
ยีน 18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
ยีน 19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
ยีน 20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 4.4 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) เปรียบเทียบระหว่างสกุล *Kaloula* 3 ชนิด ของยีน Cytb

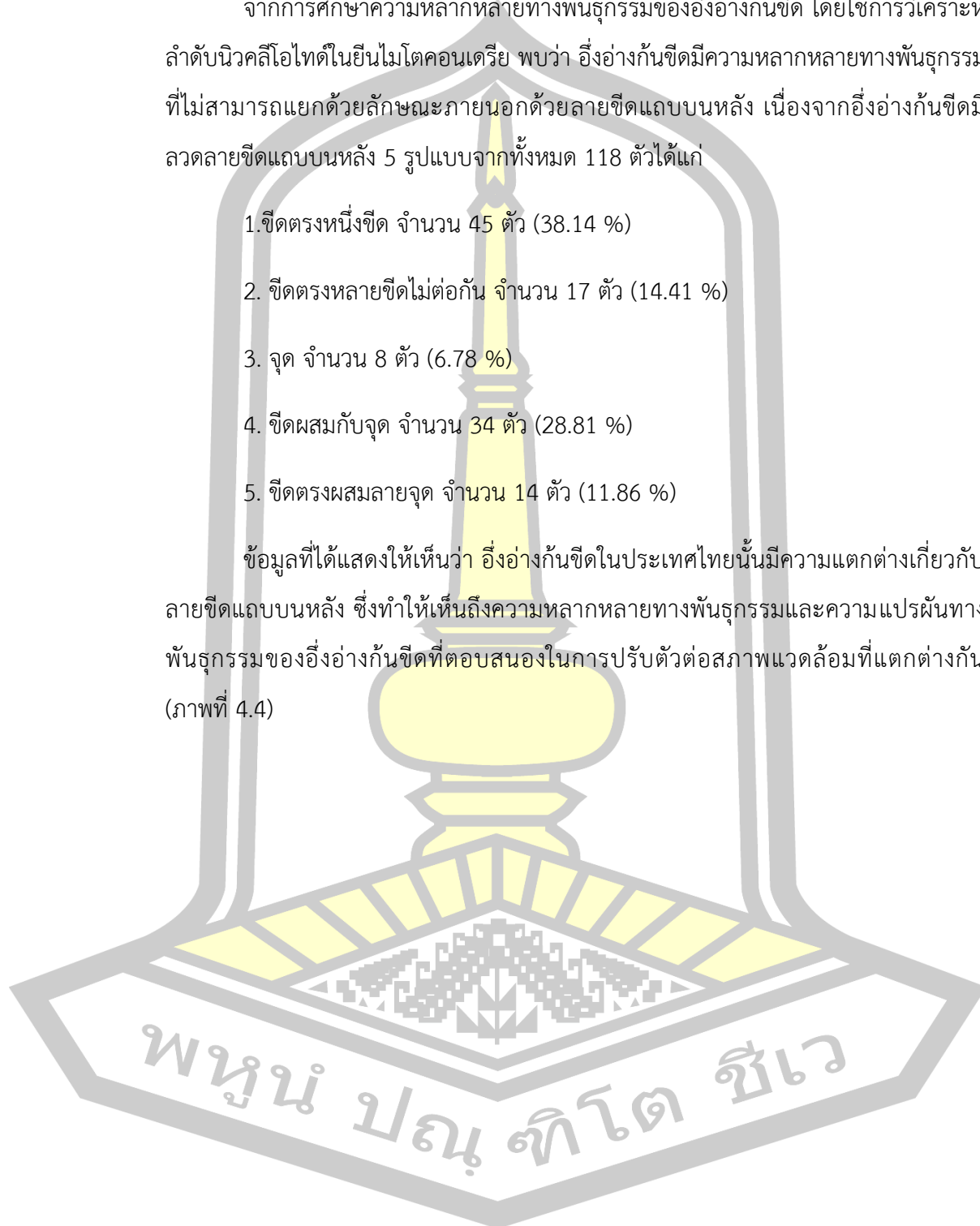
	<i>Kaloula taprobanica</i> AF249085.1	<i>Kaloula pulchra</i> AB819033.1
<i>Kaloula taprobanica</i> AF249085.1		
<i>Kaloula pulchra</i> AB819033.1	0.188	
<i>Kaloula borealis</i> JQ798754.1	0.182	0.154

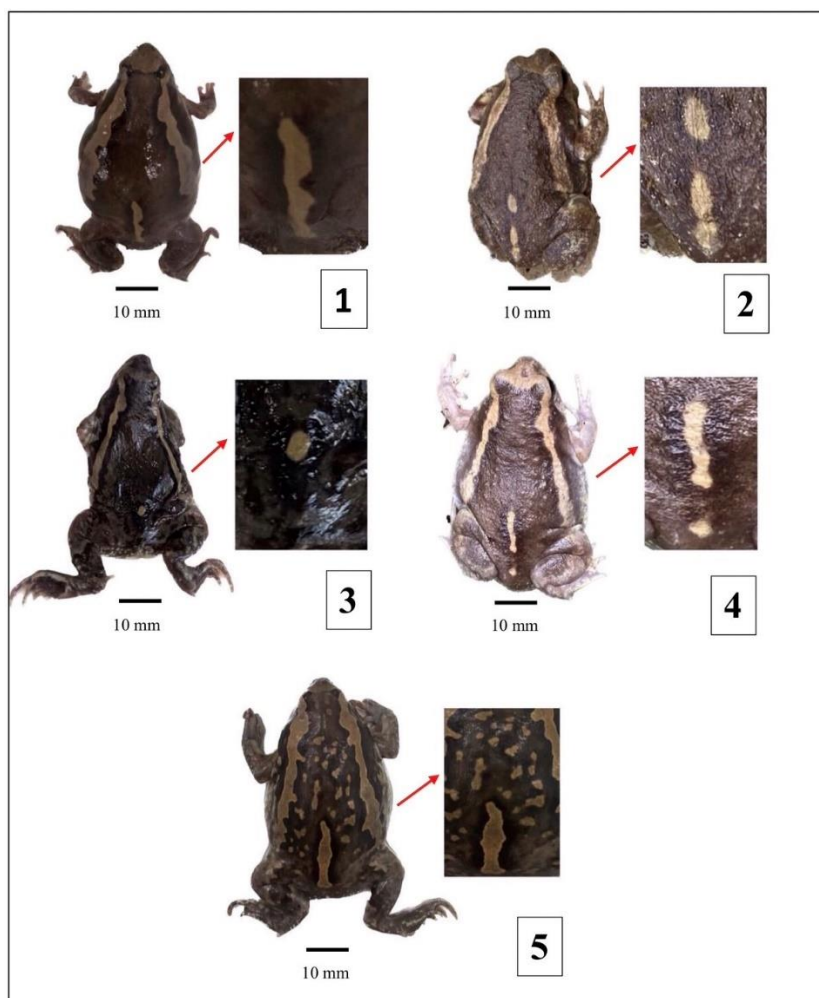
4.5 ลักษณะความแตกต่างของลายขีดบนหลังของอิงอ่างกันขีด

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงอ่างกันขีด โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนไมโทคอนเดรีย พบว่า อิงอ่างกันขีดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ไม่สามารถแยกด้วยลักษณะภายนอกด้วยลายขีดแถบบนหลัง เนื่องจากอิงอ่างกันขีดมีลวดลายขีดแถบบนหลัง 5 รูปแบบจากทั้งหมด 118 ตัวได้แก่

1. ขีดตรงหนึ่งขีด จำนวน 45 ตัว (38.14 %)
2. ขีดตรงหลายขีดไม่ต่อกัน จำนวน 17 ตัว (14.41 %)
3. จุด จำนวน 8 ตัว (6.78 %)
4. ขีดผสมกับจุด จำนวน 34 ตัว (28.81 %)
5. ขีดตรงผสมลายจุด จำนวน 14 ตัว (11.86 %)

ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่า อิงอ่างกันขีดในประเทศไทยนั้นมีความแตกต่างเกี่ยวกับลายขีดแถบบนหลัง ซึ่งทำให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแปรผันทางพันธุกรรมของอิงอ่างกันขีดที่ตอบสนองต่อการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน (ภาพที่ 4.4)





ภาพที่ 4.4 มีลวดลายขีดแถบบนหลัง 5 รูปแบบ ได้แก่ 1.ขีดตรงหนึ่งขีด 2. ขีดตรงหลายขีด ไม่ต่อกัน 3. จุด 4. ขีดผสมกับจุด 5. ขีดตรงผสมลายจุด

ยขีดแบบ 5 รูปแบบ



บทที่ 5

สรุปผลและอภิปรายผล

5.1 สรุปผลและอภิปรายผล

จากการศึกษาพบว่าประชากรอีอ่างกันชิดในประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จากการวิเคราะห์ด้วยยีน Cytb จำนวน 118 ตัวอย่าง สามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมออกได้ถึง 52 แฮพโลไทป์ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มพันธุกรรม ได้แก่ 1. กลุ่มพันธุกรรม G1 2.กลุ่มพันธุกรรม G2 ซึ่งคล้ายกับการศึกษาปาดจิวศรีราชา (*Chiromantis hansenae*) ในประเทศไทย ด้วยการวิเคราะห์ด้วยยีน 16S rDNA ที่พบว่ามีความหลากหลายของแฮพโลไทป์สูงถึง 57 แฮพโลไทป์ มีแบ่งกลุ่มพันธุกรรมออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Haplogroup 1 จากจังหวัดกาญจนบุรี (KCB) จังหวัดตาก2 (TK2) จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (PK) และจังหวัดแม่ฮ่องสอน (MHS) ส่วนกลุ่ม Haplogroup 2 จากจังหวัดเลย (LE) จังหวัดนครราชสีมา (NRS) จังหวัดจันทบุรี (CB) จังหวัดตาก1 (TK1) และจังหวัดสุราษฎร์ธานี (SRT) ซึ่งคล้ายกับการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของอีอ่างกันชิด เนื่องจากทั้ง 2 กลุ่มพันธุกรรมไม่ได้ถูกแบ่งพื้นที่จากภูมิภาคตามสภาพภูมิประเทศ (Yodthog et al., 2014) สำหรับรูปแบบแฮพโลไทป์ที่ถูกพบมากที่สุดหรือมีความถี่สูงสุดของอีอ่างกันชิดคือ แฮพโลไทป์ H21 โดยมี 1 ประชากรที่ไม่แสดงความหลากหลายของประชากร คือ อำเภอดอนนาค จังหวัดสระแก้ว ทั้งนี้เกิดจากกลุ่มประชากรที่มีขนาดเล็ก เนื่องจากอีอ่างกันชิดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีการกระจายอยู่ทั่วไปและเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคตามต่างจังหวัด จึงมีการขนส่งทำให้อีอ่างกันชิดเกิดการไหลของยีน (gene flow) ด้วยความไม่ตั้งใจของกิจกรรมมนุษย์ มีโอกาสแลกเปลี่ยนยีนส่งผลต่อค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมและรูปแบบการกระจายของแฮพโลไทป์ของกลุ่มพันธุกรรม

จากข้อมูลวิเคราะห์เครือข่ายแฮพโลไทป์ของยีน Cytb พบว่าแฮพโลไทป์ Km6 จากอำเภอกะเคา จังหวัดลำปาง มีความสัมพันธ์กับเครือข่ายแฮพโลไทป์ Km 9 จากอำเภอมือง จังหวัดสระแก้ว และกลุ่มพันธุกรรม G2 มีความสัมพันธ์กับเครือข่ายแฮพโลไทป์ในบริเวณภาคเหนือ (จากอำเภอกะเคา จังหวัดลำปาง) ภาคกลาง (จากอำเภอยะบาตล จังหวัดลพบุรี) ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแนวกันตามธรรมชาติ (natural barrier) เช่น เทือกเขาขนาดใหญ่ อาจจะเป็นลักษณะของภูมิศาสตร์ที่ไม่ส่งผลต่อการขวางกั้นทางภูมิศาสตร์ (geographic barrier) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nonsrirach et al., (2019) พบว่า อีอ่างกันชิดสามารถ

แพร่กระจายในภูเขาสูงและพื้นที่ราบ ซึ่งเทือกภูพานไม่สูงพอที่จะแยกระหว่างแอ่งสกลนครและแอ่งโคราชออกจากกันได้ จึงไม่สามารถเป็นอุปสรรคทางภูมิศาสตร์ได้

จากการศึกษาประชากรอึ่งอ่างกันชิตในประเทศไทย มีการวิเคราะห์ด้วยยีน Cytb จำนวน 118 ตัวอย่าง สามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมออกได้ถึง 52 แฮพโลไทป์ และถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มพันธุกรรม และเมื่อวิเคราะห์ด้วยยีน 16S rDNA จำนวน 52 ตัวอย่าง สามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมออกได้ 31 แฮพโลไทป์ แต่ไม่สามารถแยกกลุ่มพันธุกรรมของอึ่งอ่างกันชิตจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยได้ เนื่องจากยีน 16S rDNA เป็นยีนกึ่งอนุรักษ์ ในกรณีที่ยีน 16S rDNA สามารถแยกเป็นสองกลุ่มพันธุกรรมได้นั้นแสดงว่า สองกลุ่มพันธุกรรมที่เกิดจากการวิเคราะห์ด้วยยีน Cytb น่าจะเป็นคนละชนิด อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ ยีน 16S rDNA ไม่สามารถจำแนกกลุ่มพันธุกรรมได้ ดังนั้นแสดงว่า กลุ่มพันธุกรรม G1 และกลุ่มพันธุกรรม G2 ของยีน Cytb น่าจะเกิดจากความแปรผันทางพันธุกรรมเท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีน Cytb และ 16S rDNA พบว่ามีความแปรผันของยีนทั้งสองไม่เท่ากัน เนื่องจากยีน Cytb มีความแปรผันทางพันธุกรรมมากกว่ายีน 16S rDNA มีผลการศึกษาที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Matsui et al., (2005) ที่มีการศึกษาการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน 12S rDNA 16S rDNA และ Cytb ในกลุ่มสะเทินน้ำสะเทินบกวงศ์ Microhylidae และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nonsrirach et al., (2019) ที่มีการศึกษาการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย จากยีน Cytb และ 16S rDNA ของอึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่ายีน Cytb มีความแปรผันทางพันธุกรรมมากกว่ายีน 16S rDNA

การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร พบว่าค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ของยีน Cytb เปรียบเทียบระหว่าง 20 กลุ่มประชากรของอึ่งอ่างกันชิตในประเทศไทย พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ของยีน Cytb โดยพบว่าอึ่งอ่างกันชิตจากอำเภอหันคา จังหวัดชัยนาทและอำเภอมโนรมย์ จังหวัดนครราชสีมา มีค่าความแตกต่างสูงที่สุด โดยพบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) เท่ากับ 0.031 หรือ 3.1% และพบว่าอึ่งอ่างกันชิตจากอำเภอหันคา จังหวัดชัยนาทและอำเภอมโนรมย์ จังหวัดเลย มีค่าความแตกต่างสูงที่สุด โดยพบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) เท่ากับ 0.031 หรือ 3.1% เมื่อเทียบกับค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ของยีน Cytb ระหว่างสกุล *Kaloula* 3 ชนิด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.154 ถึง 0.188 หรือ มีค่าอยู่ระหว่าง 15.4% ถึง 18.8% แสดงว่าเป็นคนละชนิดกัน

(Tajima & Nei, 1984) ซึ่งพบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรของอิงอ่างกัน ซิดมีค่าที่ค่อนข้างต่ำ จึงไม่สามารถแยกเป็นชนิดใหม่ได้

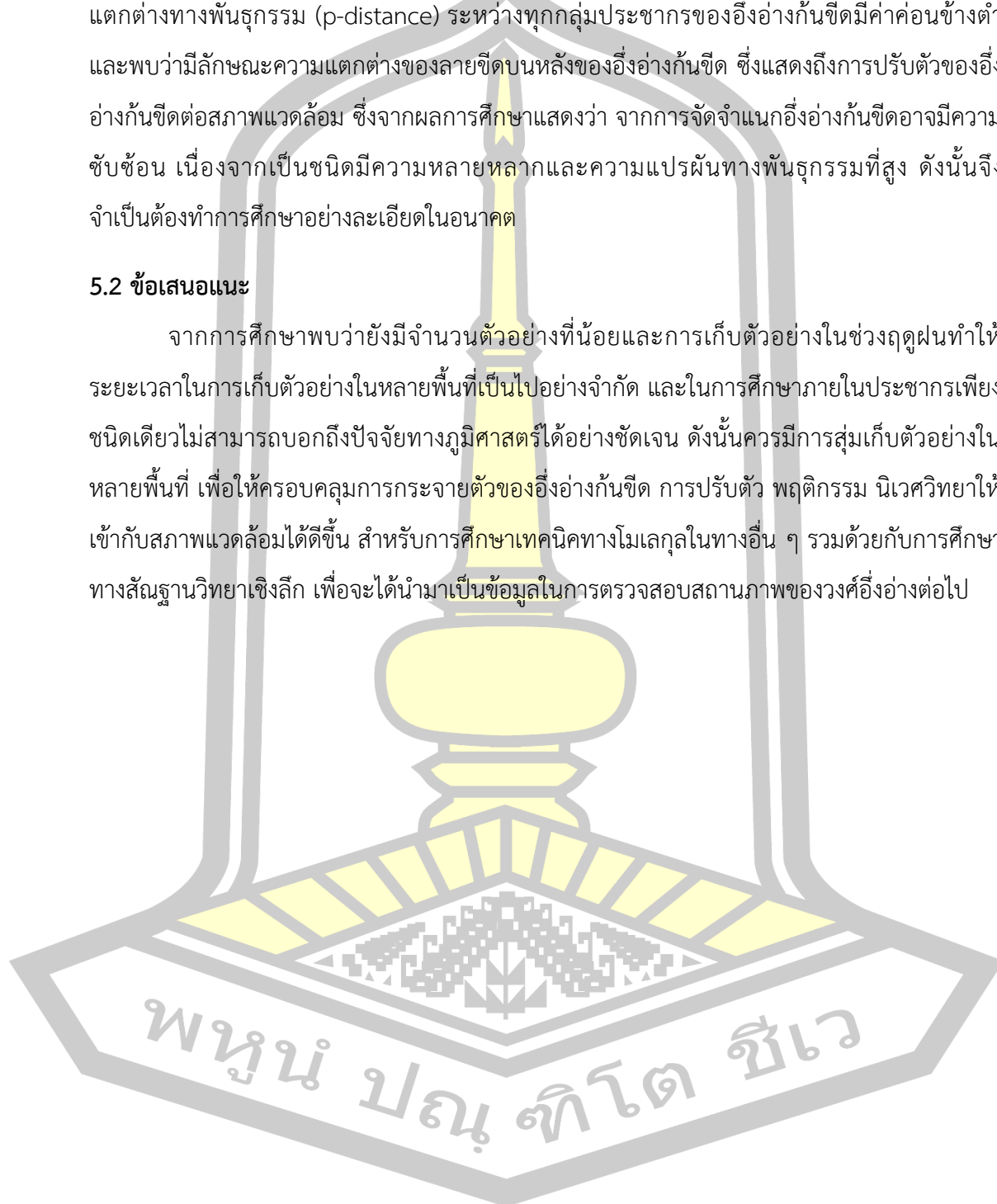
จากการศึกษาอิงอ่างกันซิดมีโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ไม่สามารถแยกด้วยลักษณะภายนอก ด้วยลายขีดแถบบนหลัง เนื่องจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอิงอ่างกันซิด พบว่า ไม่สามารถแยกสองกลุ่มพันธุกรรมเป็นคนละชนิดได้ แม้จะมีลวดลายขีดแถบบนหลังที่แตกต่างกัน แต่ลวดลายขีดเป็นเพียงลักษณะฟีโนไทป์ (Phenotypic) เป็นลักษณะที่ปรากฏให้เห็นภายนอก ซึ่งเป็นผลมาจากยีนเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และสิ่งแวดล้อมในช่วงวิวัฒนาการ และความแปรผันทางพันธุกรรมของลวดลายขีด จากการศึกษาค้นพบว่าอิงอ่างกันซิดมีลวดลายขีดแถบบนหลัง 5 รูปแบบ ได้แก่ 1. ขีดตรงหนึ่งขีด 2. ขีดตรงหลายขีดไม่ต่อกัน 3. จุด 4. ขีดผสมกับจุด 5. ขีดตรงผสมจุด แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของอิงอ่างกันซิดในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thaewnon-ngiw & Klahan, (2018) มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบหนอง (*Fejervarya limnocharis*, Gravenhorst, 1829) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเทคนิค PCR-RFLP พบว่ากบหนอง มีเส้นขีดที่หลัง 3 ลักษณะ ได้แก่ 1. เส้นกว้าง (a broad line) 2. เส้นแคบ (a narrow line) 3. ไม่มีเส้น (absent line) ซึ่งเป็นผลจากความแปรผันทางพันธุกรรมของเส้นขีดที่หลังในกบหนอง ที่เกิดขึ้นเพื่อการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้นที่ต่างกันออกไป

จากความหลากหลายของลวดลายขีดแถบบนหลังของตัวอย่างอิงอ่างกันซิดที่พบนี้ ทำให้การระบุชนิดของอิงอ่างที่มีจะดูเฉพาะขีดตรงกลางหลังส่วนท้ายอาจจะเกิดความผิดพลาดได้ เนื่องจากอิงอ่างกันซิดมีรูปร่างลักษณะและลวดลายค่อนข้างคล้ายกับอิงอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra*) โดยเฉพาะลวดลายแบบที่ 3 ที่ไม่มีแถบกลางหลัง ($n = 8$; 6.78%) กลับแสดงเป็นรูปจุดกลมบริเวณส่วนท้ายของหลัง ซึ่งอาจทำให้เกิดความสับสนได้หากไม่มีข้อมูลทางพันธุศาสตร์มายืนยัน ดังนั้นการจำแนกชนิดระหว่างอิงอ่างกันซิดกับอิงอ่างบ้านด้วยสายตา จึงควรจะต้องใช้ลักษณะความแตกต่างของปลายนิ้วและ metatarsal tubercles เข้ามาช่วยในการพิจารณาจำแนกด้วย

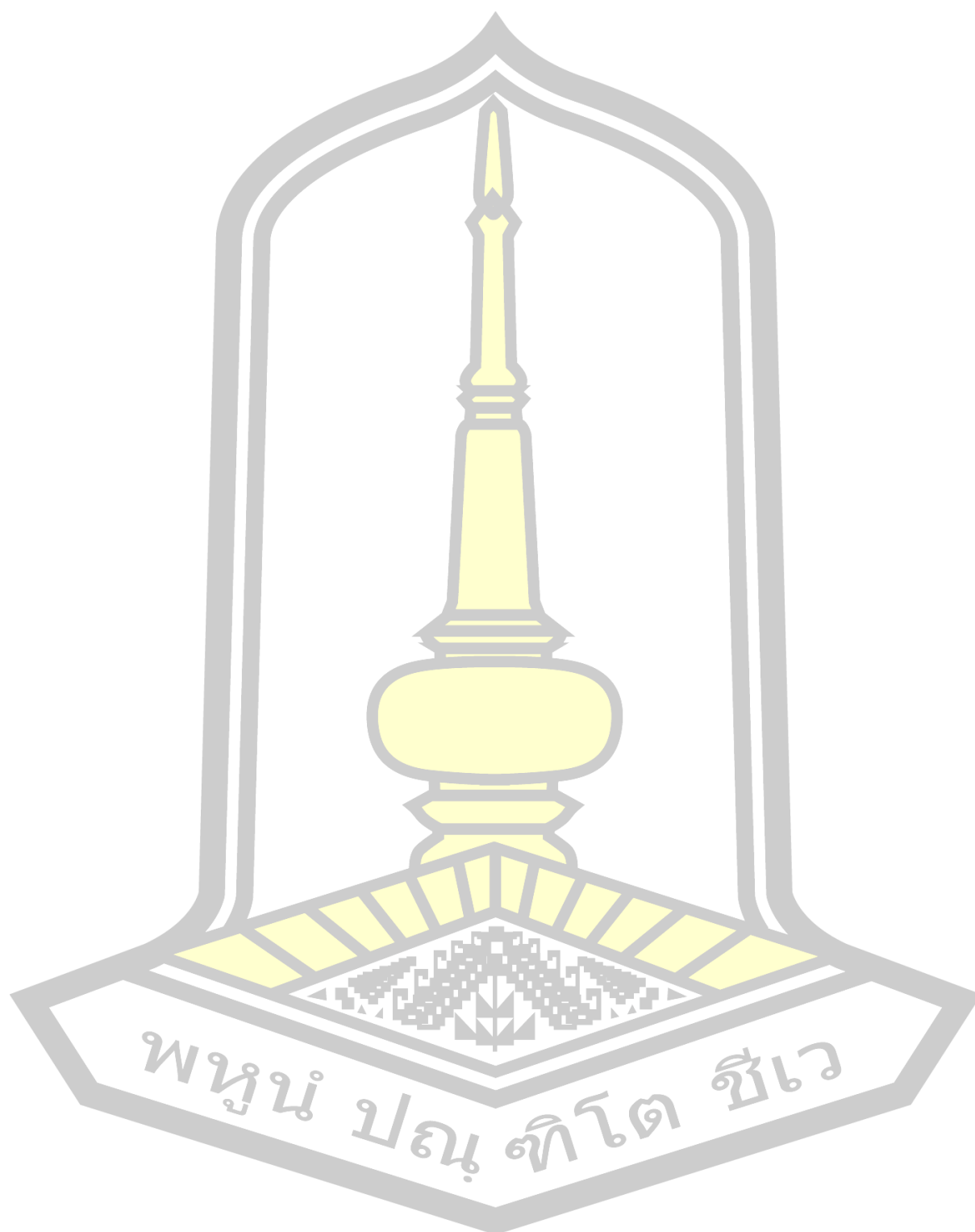
จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า อีอีอีกันชิตที่พบในประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับสูง สามารถจำแนกกลุ่มพันธุกรรมออกได้ 2 กลุ่มพันธุกรรม แต่พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (p-distance) ระหว่างทุกกลุ่มประชากรของอีอีอีกันชิตมีค่าค่อนข้างต่ำ และพบว่ามีลักษณะความแตกต่างของลายขีดบนหลังของอีอีอีกันชิต ซึ่งแสดงถึงการปรับตัวของอีอีอีกันชิตต่อสภาพแวดล้อม ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงว่า จากการจัดจำแนกอีอีอีกันชิตอาจมีความซับซ้อน เนื่องจากเป็นชนิดที่มีความหลากหลายและความแปรผันทางพันธุกรรมที่สูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาอย่างละเอียดในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่ายังมีจำนวนตัวอย่างที่น้อยและการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูฝนทำให้ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างในหลายพื้นที่เป็นไปได้ยาก และในการศึกษาภายในประชากรเพียงชนิดเดียวไม่สามารถบอกถึงปัจจัยทางภูมิศาสตร์ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นควรมีการสุ่มเก็บตัวอย่างในหลายพื้นที่ เพื่อให้ครอบคลุมการกระจายตัวของอีอีอีกันชิต การปรับตัว พฤติกรรม นิเวศวิทยาให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น สำหรับการศึกษาเทคนิคทางโมเลกุลในทางอื่น ๆ รวมตัวกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยาเชิงลึก เพื่อจะได้นำมาเป็นข้อมูลในการตรวจสอบสถานภาพของวงศ์อีอีอีต่อไป



บรรณานุกรม



จันทร์ทิพย์ ช่วยเงิน, ดนุพล มาจันทร์, ประทีป ดั่งแคน และ ยอดชาย ช่วยเงิน. (2560).

สัณฐานวิทยาภายนอก และโพรงปากของอึ่งแดง อึ่งงา และอึ่งลายแต้ม. *วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย*. 24.

จารุพันธ์ พากักดี, นพคุณ ภักดีณรงค์ และคมศร เล่าห์ประเสริฐ. (2561). พันธุศาสตร์ของเซลล์อึ่งอ่างที่นิยมบริโภคในจังหวัดกาฬสินธุ์. ใน: การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยมหาสารคามวิจัย ครั้งที่ 14. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม. 702-710.

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และนนทรี ปานพรหมมินทร์. (2557). ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดปลาวงศ์เสือ ตอ. *แก่นเกษตร*. 7(3). 226-232.

ถาวร สุภาพรม, วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร. (2535). การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอึ่งปากขวดและปาดบ้าน. ในรายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30 สาขาเศรษฐศาสตร์และ บริหารธุรกิจ สังคมศาสตร์ ศึกษาศาสตร์ มนุษยศาสตร์ สิ่งแวดล้อม วิศวกรรมศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ได้จาก: http://kukr.lib.ku.ac.th:80/proceedings/KUCON/search_detail/exportBibTex/5407 [สืบค้นเมื่อวันที่ 14 มิถุนายน 2565]

ธวัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รัชชริจิ. (2548). คาริโอไทป์ของเซลล์ตับในกบ ภูเขา เขียดบัว เขียดกาญจนบุรีเขียดน้ำนอง และอึ่งเผ้า. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 43 สาขาสัตวแพทยศาสตร์สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 544-551.

ธัญญา จันอาจ. (2546). *คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย*. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: บริษัทด้านสุทธาการพิมพ์ จำกัด.

ปรวีร์ พรหมโชติ และวิเชษฐ คนชื้อ. (2562). *สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว*. พิมพ์ครั้งที่1. 80 หน้า.

ปิยวรรณ นิยมวัน,ไพโรวัลย์ ศรีสม และปริญญา ภาวังคะนันท์. (2562). *สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของประเทศไทย (Amphibians of Thailand)*. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: ภาพพิมพ์.

วุฒิพงศ์ มหาคำ. (2554). DNA barcodes ของฟิซ: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. *วารสารพิษศาสตร์ไทย*. 3(1): 1–30.

สมชาติ ธรรมขันทา, ฐาปกรณ์ ลิ้มบรรจง, พนมเทียน นาควิจิตร และ วิทยา ดินนังวัดนะ. (2548). ชีวิตวิทยาบางประการของพันธุ์อึ่งที่พบในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน. *สารวิชาการประมง*.

อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และคณะ.(2548). *ปทานุกรมพันธุ์ศาสตร์*. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด.

อัมพร วิเวกแว่ว และวิเชษฐ์ คนชื้อ. (2557). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอึ่งบางชนิดในสกุล *Microhyla* ในพื้นที่สวนสัตว์ เปิดเขาเขียวจังหวัดชลบุรี โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน COI และ ยีน 16S rRNA ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ. มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์.

Akbari, G. W., Hamidy, A., Maryanto, A. E., Munir, M., & Smith, E. N. (2021).

Phylogenetic study of Sumatran *Microhyla heymonsi* Vogt, 1911 (Anura: Microhylidae) based on 16S rRNA mitochondrial gene. *In Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1725, No. 1, p. 012063). IOP Publishing.

Altig, R., & Rowley, J. J. (2014). The breeding behavior of *Glyphoglossus molossus* and the tadpoles of *Glyphoglossus molossus* and *Calluella guttulatus* (Microhylidae). *Zootaxa*, 3811(3), 381-386.

Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.

Boontham, T., & Naritoom, C. (2015). Blunt-headed burrowing frog (*Glyphoglossus molossus*) raising in a sustainable agricultural system. *Journal of ISSAAS* (International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences), 21(2), 167-174.

Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A., & De Mattia, F. (2010). DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in bioinformatics*, 11(4), 440-453.

Garg, S., Das, A., Kamei, R. G., & Biju, S. D. (2018). Delineating *Microhyla ornata* (Anura, Microhylidae): mitochondrial DNA barcodes resolve century-old taxonomic misidentification. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(2), 856-861.

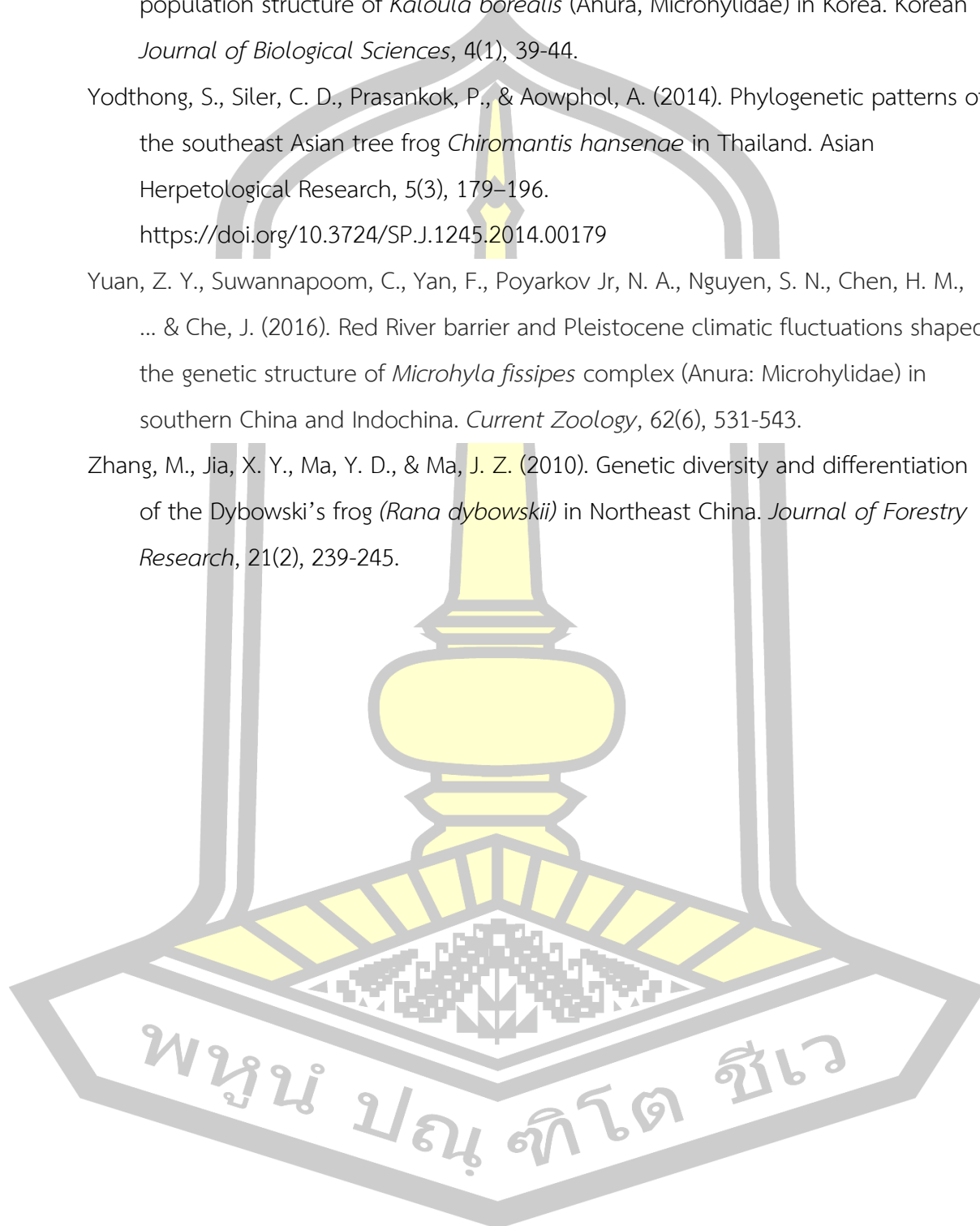
Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.

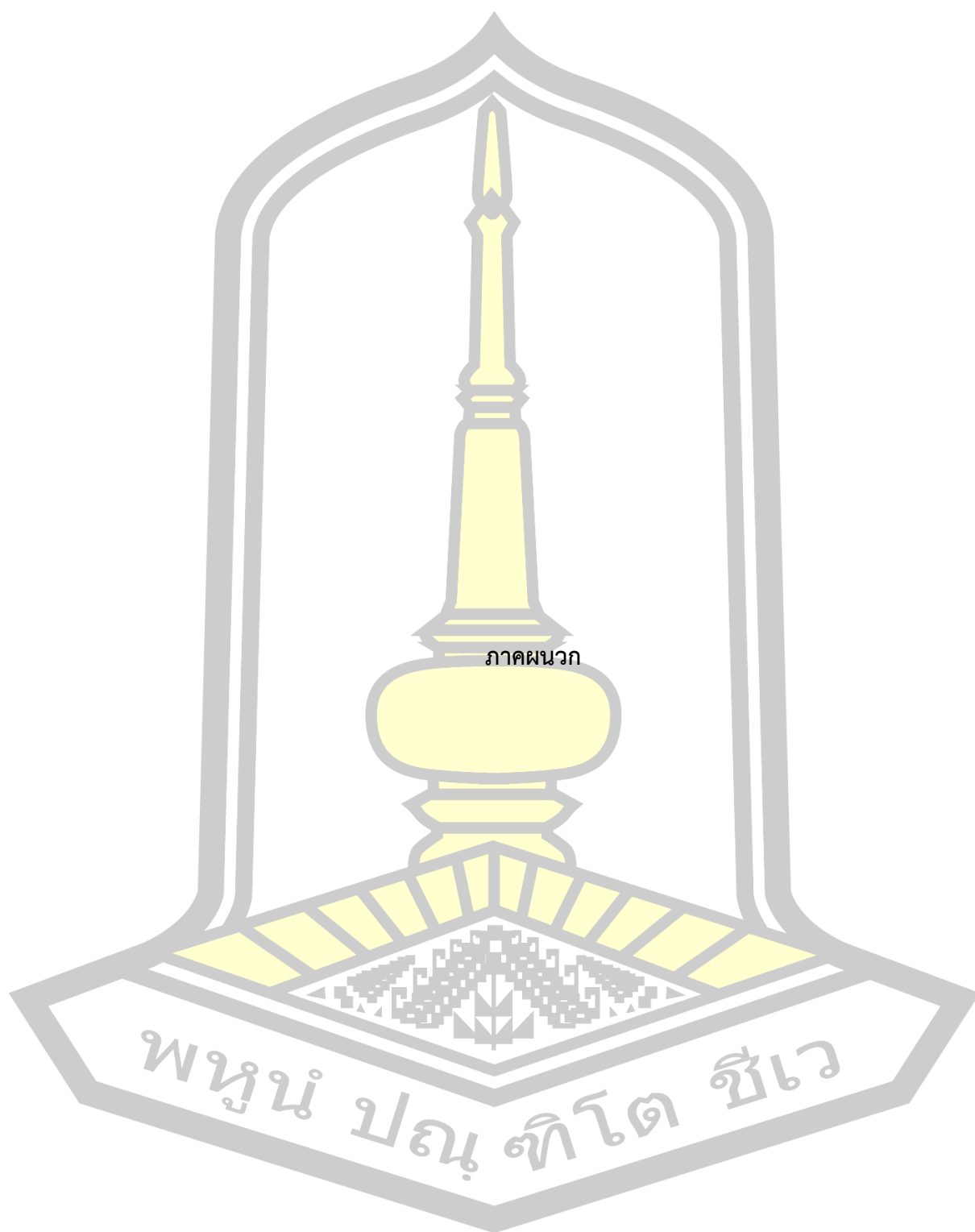
Lalremsanga, H. T., Sailo, S., & Hooroo, R. N. K. (2017). External morphology, oral structure and feeding behaviour of *Kaloula pulchra* tadpoles Gray, 1831 (Amphibia:Anura: Microhylidae). *Science and Technology Journal*, 5, 97-103.

- Laojumpon, C., Suteethorn, S. and Lauprasert, K. 2012. Morphological Variation of Truncate-Snouted Burrowing Frog (*Glyphoglossus molossus*) of Thailand. The Proceedings of the 4th Science Research Conference, Naresuan University, Thailand, (March 12-13, 2012), 56-61 p.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Marsh, W. M., & Grossa Jr, J. (1996). Environmental geography: science, land use, and earth systems. John Wiley and Sons.
- 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.
- Matsui, M., Hamidy, A., Belabut, D. M., Ahmad, N., Panha, S., Sudin, A., ... & Nishikawa, K. (2011). Systematic relationships of Oriental tiny frogs of the family Microhylidae (Amphibia, Anura) as revealed by mtDNA genealogy. *Molecular phylogenetics and evolution*, 61(1), 167-176.
- Neang, T. (2010). An Investigation into Frog Consumption and Trade in Cambodia. Fauna & Flora International Cambodia Programme. 24 pp.
- Nomura, F., Rossa-Feres, D. C., & Langeani, F. (2009). Burrowing behavior of *Dermatonotus muelleri* (Anura, Microhylidae) with reference to the origin of the burrowing behavior of Anura. *Journal of Ethology*, 27(1), 195.
- Nonsrirach, T., & Lauprasert, K. (2019). Genetic Diversity, Genetic Structure and Morphological Variation of Truncate-snouted Burrowing Frog (*Glyphoglossus molossus*) in Northeastern Thailand (Doctoral dissertation, Mahasarakham University).
- Omega Bio-tek, Inc. 400 Pinnacle Way, Suite 450 Norcross, GA30071 [Online]. Available from: <http://www.omegabiotek.com> [accessed 22 June 2022]
- Othman, S. N., Putri, E. T., Messenger, K. R., Bae, Y., Yang, Y., Bova, T., ... & Borzée, A. (2022). Impact of the Miocene orogenesis on *Kaloula* spp. radiation and implication of local refugia on genetic diversification. *Integrative zoology*, 17(2), 261-284.

- Palumbi, S. R. (1997). Molecular biogeography of the Pacific. *Coral Reefs*, 16, S47-S52.
- Park, I. K., Koo, K. S., Moon, K. Y., Lee, J. G., & Park, D. (2017). PCR detection of ranavirus from dead *Kaloula borealis* and sick *Hyla japonica* tadpoles in the wild. *Korean Journal of Herpetology*, 8, 10-14.
- Peloso, P.L.V., Frost, D.R., Richards, S.J., Rodrigues, M.T., Donnellan, S.C., Matsui, M., Raxworthy, C.J., Biju, S.D., Lemmon, E.M., Lemmon, A.R. & Wheeler, W.C. (2016). The impact of anchored phylogenomics and taxon sampling on phylogenetic inference in narrow-mouthed frogs (Anura, Microhylidae). *Cladistics* 32: 113–140.
- Phung, T. M., Nguyen, T. Q., Rauhaus, A., & Ziegler, T. (2013). The first record of the middle back-stripe bullfrog, *Kaloula medilineata* (Anura: Microhylidae), from Phu Qui Island, Binh Thuan Province, southern Vietnam. *Herpetology Notes*, 6, 463-465.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Shneyer, V. S. (2009). DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. *Russian Journal of Genetics*, 45(11), 1267-1278.
- Smith, J. S. C. (1989). The characterization and assessment of genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) hybrids that are widely grown in France: Chromatographic data and isozymic data. *Euphytica*, 43(1), 73-85.
- Smith, M. A. (1917). Descriptions of new reptiles and a new batrachian from Siam. *Journal of the Natural History Society of Siam*, 2(3), 221-225.
- Tajima F. & Nei M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1:269-285.
- Thaewnon-ngiw, B., & Klahan, P. (2018). Genetic diversity of the grass frog (*Fejervarya limnocharis*, Gravenhorst, 1829) in northeastern Thailand using PCR-RFLP. *Interdisciplinary Research Review*, 13(1), 1-7.
- Thailand Amphibian Checklist. (2011 – 2020). Amphibians of Thailand [Online]. Available form: <http://www.norththailandbirding.com> [accessed 11 May 2022]
- Vassilieva, A. B. (2021). Larval morphology of three syntopic species of *Kaloula* Gray (Anura: Microhylidae) from Vietnam. *Zootaxa*, 4952(1), 71-86.

- Yang, S. Y., Kim, J. B., Min, M. S., Sun, J. H., & Kang, Y. J. (2000). Genetic diversity and population structure of *Kaloula borealis* (Anura, Microhylidae) in Korea. *Korean Journal of Biological Sciences*, 4(1), 39-44.
- 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>
- Yuan, Z. Y., Suwannapoom, C., Yan, F., Poyarkov Jr, N. A., Nguyen, S. N., Chen, H. M., ... & Che, J. (2016). Red River barrier and Pleistocene climatic fluctuations shaped the genetic structure of *Microhyla fissipes* complex (Anura: Microhylidae) in southern China and Indochina. *Current Zoology*, 62(6), 531-543.
- Zhang, M., Jia, X. Y., Ma, Y. D., & Ma, J. Z. (2010). Genetic diversity and differentiation of the Dybowski's frog (*Rana dybowskii*) in Northeast China. *Journal of Forestry Research*, 21(2), 239-245.





ภาคผนวก

พูน ปณ ฑิต ชีวะ

ภาคผนวก ก

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytb จำนวน 52 แฮปโลไทป์ (Km1 – Km52)

>Km1

CTATACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCCCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
 GGCGCCTCATTCTTTTATCTGCATCTACCTCCATATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
 CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
 CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACGCGATTCTTCA
 CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCTGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
 AACGCCAACCCAGATAAAATCCCTTCCAGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTACCTCACTAT
 CAACTTTTGCCCCAAACATCCTAGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCCCTTGTTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km2

CTATACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCCCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
 GGCGCCTCATTCTTTTATCTGCATCTACCTCCATATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
 CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
 CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGAGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACGCGATTCTTCA
 CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCTGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
 AACGCCAACCCAGATAAAATCCCTTCCAGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTACCTCACTAT
 CAACTTTTGCCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCCCTTGTTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km3

CTATACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCCCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
 GGCGCCTCATTCTTTTATCTGCATCTACCTCCATATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
 CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
 CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACGCGATTCTTCA
 CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCTGGCTCAACTAACCCACAGGTCTC
 AACGCCAACCCAGATAAAATCCCTTCCAGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTAT
 CAACTTTTGCCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCCCTTGTTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km4

CTATACAGCTGACACCAATGGCATTTCATCAGTCGCCCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
 GGCGCCTCATTCTTTTATCTGCATCTACCTCCATATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
 CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
 CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTGGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACGCGATTCTTCA
 CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCTGGCTCAACTAACCCACAGGTCTC
 AACGCCAACCCAGATAAAATCCCTTCCAGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTCGACGCCCTTGCCCTCACTAT
 CAACTTTTGCCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCCCTTGTTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km5

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTTCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCTTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTCGCCTACTA
TCAACTTTTGCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTACACCACCCACATTAACCAGAG

>Km6

CATCATGATCTGAACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCCCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTACCTCCATATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTTCCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCTTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACGCGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACGGCTCAACTAACCCACAGGTCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCACGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTACACCACCCACATTAACCAGAG

>Km7

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCTTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTCACTA
TCAACTTTTGCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTACACCACCCACATTAACCAGAG

>Km8

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAACC
TACTCTCAGCAGCCCTTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCTACCCTCACACGATTCTTCA
ATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTCA
ACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTCACTATC
AACTTTTGCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCTTGTACACCACCCACATTAACCAGAG

>Km9

CTATACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCCCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTACCTCCATATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTTCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAACC
TACTCTCAGCAGCCCTTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACGCGATTCTTCA
ATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACGGCTCAACTAACCCACAGGTCTCA
ACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCACGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTCACTATC
AACTTTTGCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTACACCACCCACATTAACCAGAG

>Km10

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

> Km11

CTACACAGCTGATACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACTCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGCCAGCATAATTCACCTCTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGAGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTCGAGCCCTTGCCCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km12

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCTAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCTACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGAGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km13

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCTAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGAGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km14

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGAGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km15

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCCTCCCATTCATCATTGCGGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
TCAACTTTTGCCCAAACATTCTGGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km16

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTTGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCCTCCCATTCATCATTGCGGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
TCAACTTTTGCCCAAACATCTGGGAGATCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km17

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCCCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTACCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCCTCCCATTCATCATTGCGGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACACCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
TCAACTTTTGCCCAAACATCTGGGAGACCCAGACAATTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km18

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCCTCCCATTCATCATTGCGGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
CAACTTTTGCCCAAACATCTGGGAGACCCAGACAATTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km19

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCCTCCCATTCATCATTGCGGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
CAACTTTTGCCCAAACATCTGGGAGACCCAGACAATTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km20

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTTCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCCTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTTCTACCGTGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGGGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAACATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km21

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCCTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km22

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCCTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km23

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCCTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCTCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km24

CTACACTTTTATATTTGAAGGAATTTTCATGAGGCGCTCGCATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAACG
GCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGTC
ATCCTCTTATTCCTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAACCT
ACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTACA
TTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTCAA
CGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTACTATCA
ACTTTTGCCCCGAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCTCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km25

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATCACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCTCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km26

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATCACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCCGAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAATCCCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km27

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTACCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATCACCAA
CCTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTC
ACATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTA
TCAACTTTTGCCCCAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCTCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km28

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATCACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCTCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km29

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATCACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTTCACACCAGCCAACCTCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km30

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCTAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCTACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCCTTGTCACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km31

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCTAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCTACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCCTTGTCACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km32

CTACACAGCCGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTA
TCAACTTTTGCCCAAACATTCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km33

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGTGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTA
TCAACTTTTGCCCAAACATCTCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km34

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGAGAGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGACGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCTCTTGTCACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km35

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATCTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAACATCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km36

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTACAAAGAAACATGAAACATCGGAG
TCATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCTCCTACATCGGCAACGATCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCATTCCATGCCTACTACTCTACAAGGATGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAACATCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km37

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGAGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGAGGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCTCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km38

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTTACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGAGGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTA
TCATCTTTTGCCCCACATATCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCTTGTCACACCACCCACATTAAGAAGAT

>Km39

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTGCGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGCTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTTACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGAGGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCTTGTCACACCACCCACATTAACCCAGAG

>Km40

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTTACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGGGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTTACACCAGCCAATCCCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAT

>Km41

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTTACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTTACACCAGCCAATCCTCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km42

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTTACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGGACCCAGACAACCTTACACCAGCCAATCCTCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km43

CTACACAGCCGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTTACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGGACCCAGACAACCTTACACCAGCCAATCCTCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km44

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTTACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCAGGAGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCCCTACTAT
CAACTTTTGCCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAACCTTACACCAGCCAATCCTCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km45

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTGGCTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTGACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGAGGGGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCCTTGTCACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km46

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTTACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGAGGGGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAACCCCTTGTCACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km47

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTATCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTTACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGAGGGGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
TCAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCCTTGTCACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km48

CTATACTGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGACGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCCACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCGAGGGGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
CAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCCTTGTCACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km49

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCTTACTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCCTACCATGAGGACAAATGTCATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCTACCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGGCCAGCATAATCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATCCCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCTTGACGCCCTTGCTCTACTA
CAACTTTTGCCCCAAATATCCTGGGAGACCCAGACAACCTCACACCAGCCAATCCCCTTGTCACACCACCCACATTAAACCAGAG

>Km50

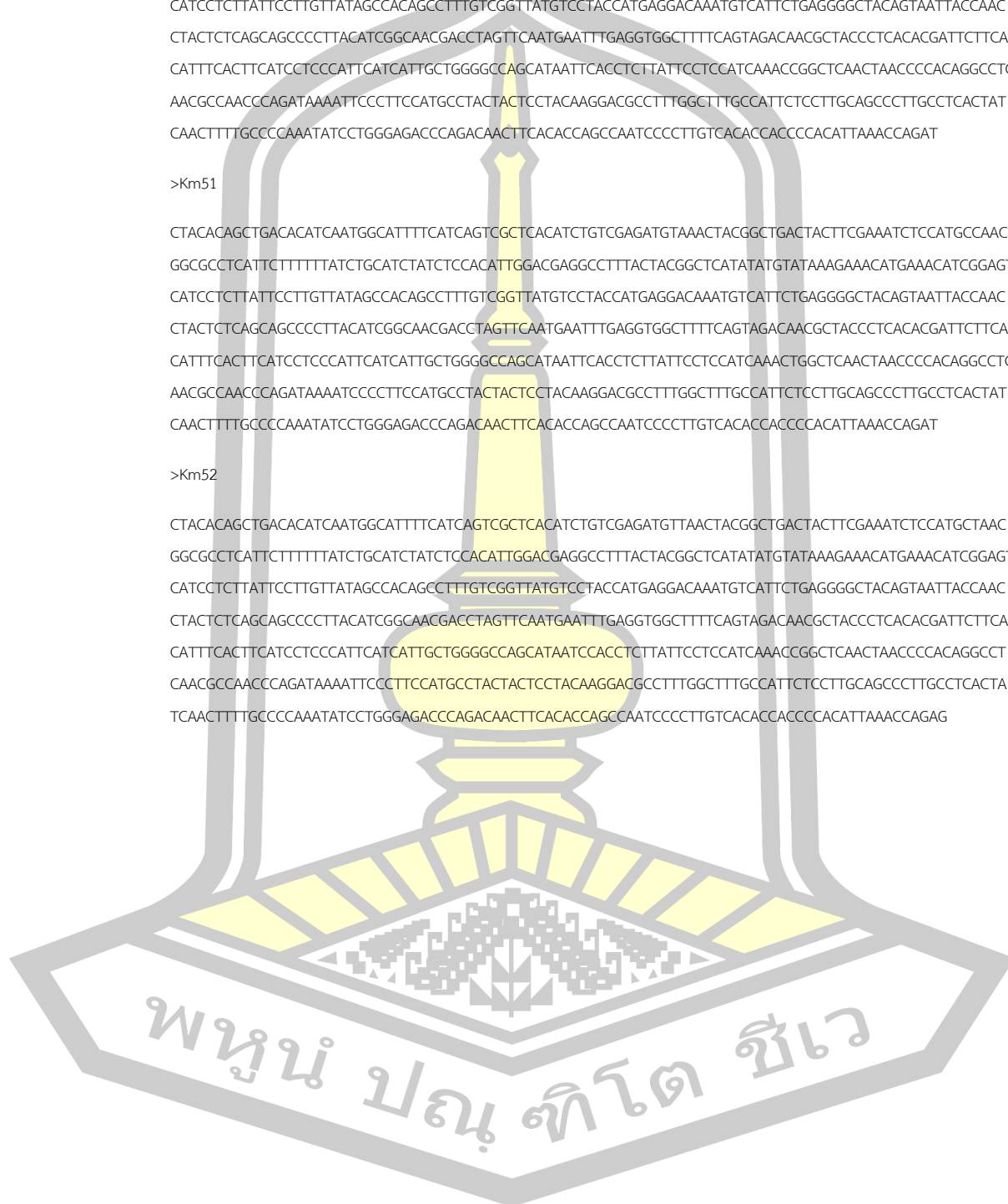
CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCTAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCTACCCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGCAGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAATTCACACCAGCCAATCCCCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAT

>Km51

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCCAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCTACCCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACGCTCAACTAACCCACAGGCCTC
AACGCCAACCCAGATAAAATCCCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGCAGCCCTTGCCCTCACTAT
CAACTTTTGCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAATTCACACCAGCCAATCCCCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAT

>Km52

CTACACAGCTGACACATCAATGGCATTTCATCAGTCGCTCACATCTGTCGAGATGTTAACTACGGCTGACTACTTCGAAATCTCCATGCTAAC
GGCGCCTCATTCTTTTTATCTGCATCTATCTCCACATTGGACGAGGCCTTTACTACGGCTCATATATGTATAAAGAAACATGAAACATCGGAGT
CATCTCTTATTCTTGTATAGCCACAGCCTTTGTCGGTTATGTCTACCATGAGGACAAATGTATTCTGAGGGGTACAGTAATTACCAAC
CTACTCTCAGCAGCCCCCTACATCGGCAACGACCTAGTTCAATGAATTTGAGGTGGCTTTTCAGTAGACAACGCTACCCCTCACACGATTCTTCA
CATTTCACTTCATCTCCCATTCATCATTGCTGGGGCCAGCATAATTCACCTCTTATTCTCCATCAAACCGGCTCAACTAACCCACAGGCCT
CAACGCCAACCCAGATAAAATTCCTTCCATGCCTACTACTCTACAAGGACGCCTTTGGCTTTGCCATTCTCCTTGCAGCCCTTGCCCTCACTA
TCAACTTTTGCCCAAATATCTGGGAGACCCAGACAATTCACACCAGCCAATCCCCTTGTACACCACCCACATTAAACCAGAG



ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จำนวน 31 แฮปโลไทป์ (Km – Km31)

>Km1

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGTTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCAGAAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTGTTTGTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGAGTTT

>Km2

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGTTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCAGAAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTGTTTGTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTC

>Km3

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGTTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCAGAAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTGTTTGTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGATTCC

>Km4

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGTTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCAGAAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTGTTTGTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGATTCC

>Km5

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGTTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCAGAAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTGTTTGTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGAGTTC

>Km6

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTT

>Km7

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTT

>Km8

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAGCTTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTCC

>Km9

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTT

>Km10

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGAGTTC

>Km11

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGATTTTC

>Km12

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTC

>Km13

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTC

>Km14

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTC

>Km15

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGATTTTC

>Km16

CGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGGAACCTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGGTTCT

>Km17

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGGAACCTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGGTTCC

>Km18

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGGAACCTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGGTTCC

>Km19

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGGAACCTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGCGTTC

>Km20

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATTAACTTGGAACCTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTT

>Km21

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTC

>Km22

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGAGTCC

>Km23

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCATACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGGTTTA

>Km24

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGGTCTT

>Km25

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTC

>Km26

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTCA

>Km27

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTCA

>Km28

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGAGTCC

>Km29

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCACACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGAGTAT

>Km30

AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGTGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCGCACACCATCTTAACCTGGTAACTCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTCGTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTT

>Km31

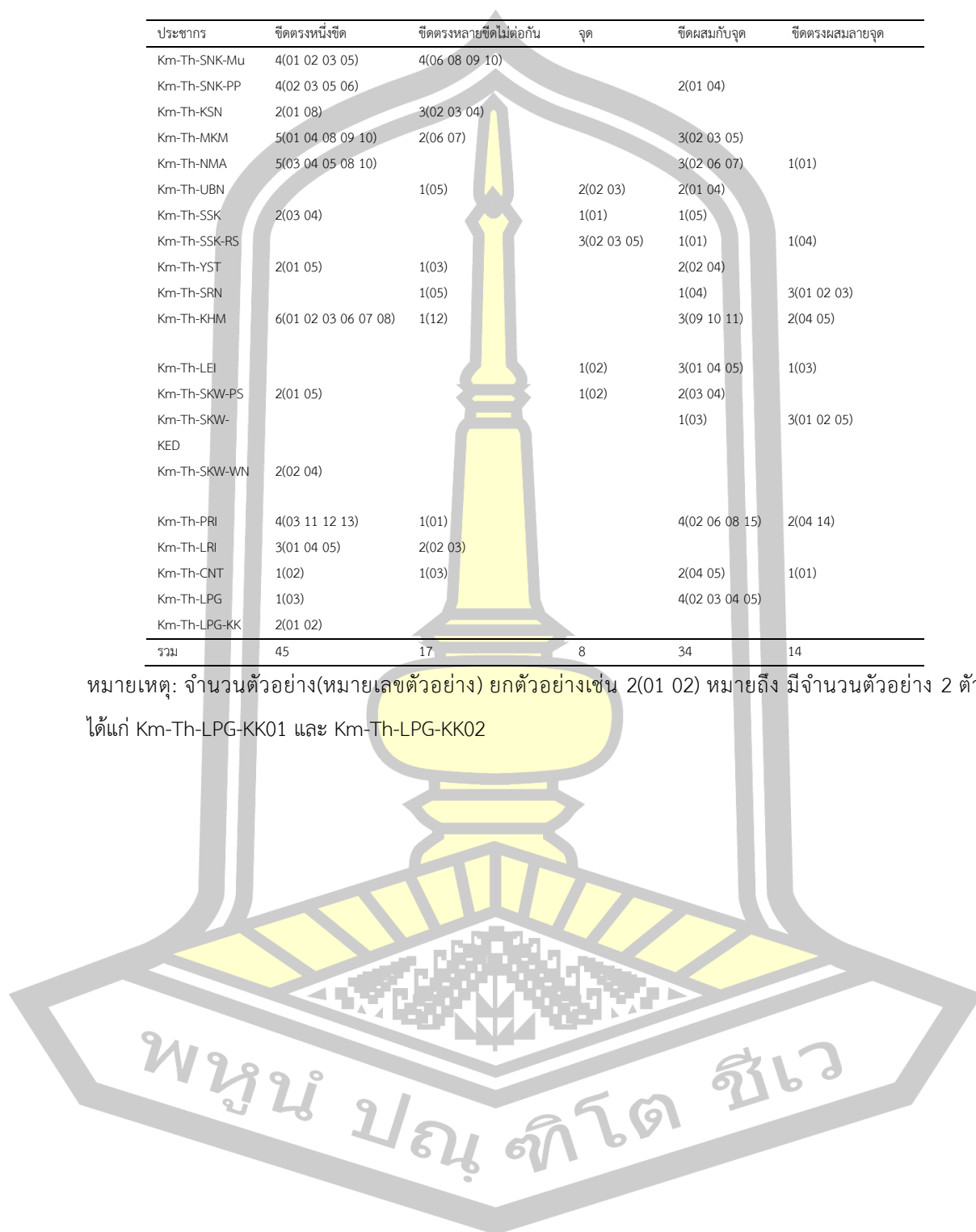
AGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCGAAGGTAGCGCAATCACTTGTCTTTAAATGAGGACTAGTATGAATG
GCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCTCTTCCAATCAATGAACTGACCTCCCCGGAAGAGGCGGGGATAAGACTATAAGACGAGAAGACCCC
ATGGAGCTTTAACTCAGTATCAATTACCTTACCGCACCATCTTAACCTTGTAACCTGATTACTGGTTTTCGGTTGGGGTGACCGCGGAGT
AAAACAAAACCTCCACGATGAACGGACCAATGCTCCTAATCATAGAGCCACAGCTCACAGAATCAAAAAATTGACATAAATTGATCCAATTAAT
TTTGATCAACGAACCAAGTTACCTGGGGATAACAGCGCAATCCACTTCAAGAGCTCCTATCGACAAGTGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATC
AGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTGTTTTGTTCAACGATTAACCCCTACGTGATCTGTTTTC



ตาราง A ข้อมูลลายชิตบนหลังของตัวอย่างอิงอ่างกันชิตทั้งหมด 118 ตัว

ประชากร	ชิตตรงหนึ่งชิต	ชิตตรงหลายชิตไม่ต่อกัน	จุด	ชิตผสมกับจุด	ชิตตรงผสมลายจุด
Km-Th-SNK-Mu	4(01 02 03 05)	4(06 08 09 10)			
Km-Th-SNK-PP	4(02 03 05 06)			2(01 04)	
Km-Th-KSN	2(01 08)	3(02 03 04)			
Km-Th-MKM	5(01 04 08 09 10)	2(06 07)		3(02 03 05)	
Km-Th-NMA	5(03 04 05 08 10)			3(02 06 07)	1(01)
Km-Th-UBN		1(05)	2(02 03)	2(01 04)	
Km-Th-SSK	2(03 04)		1(01)	1(05)	
Km-Th-SSK-RS			3(02 03 05)	1(01)	1(04)
Km-Th-YST	2(01 05)	1(03)		2(02 04)	
Km-Th-SRN		1(05)		1(04)	3(01 02 03)
Km-Th-KHM	6(01 02 03 06 07 08)	1(12)		3(09 10 11)	2(04 05)
Km-Th-LEI			1(02)	3(01 04 05)	1(03)
Km-Th-SKW-PS	2(01 05)		1(02)	2(03 04)	
Km-Th-SKW-KED				1(03)	3(01 02 05)
Km-Th-SKW-WN	2(02 04)				
Km-Th-PRI	4(03 11 12 13)	1(01)		4(02 06 08 15)	2(04 14)
Km-Th-LRI	3(01 04 05)	2(02 03)			
Km-Th-CNT	1(02)	1(03)		2(04 05)	1(01)
Km-Th-LPG	1(03)			4(02 03 04 05)	
Km-Th-LPG-KK	2(01 02)				
รวม	45	17	8	34	14

หมายเหตุ: จำนวนตัวอย่าง(หมายเลขตัวอย่าง) ยกตัวอย่างเช่น 2(01 02) หมายถึง มีจำนวนตัวอย่าง 2 ตัว ได้แก่ Km-Th-LPG-KK01 และ Km-Th-LPG-KK02



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	มณีนีศิลา โพธิ์วัฒนางค์กูร
วันเกิด	วันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2542
สถานที่เกิด	เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	483/3 ถ.รัฐบำรุง ต.ธาตุเชิงชุม อ.เมืองสกลนคร จ.สกลนคร
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นิสิต
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2564 หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ.2567 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนนักวิจัยหลังปริญญาตรี (Postgraduate)
ผลงานวิจัย	-

