

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

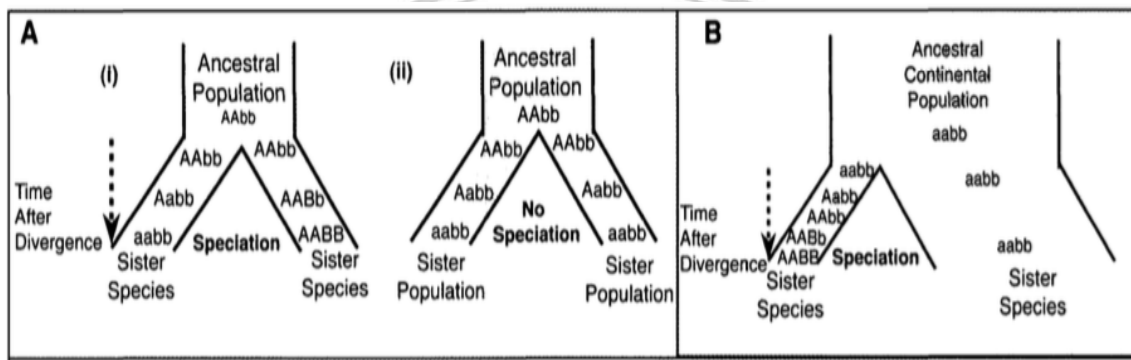
2.1 การกระจายตัวของสิ่งมีชีวิต

การเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (speciation) เป็นกระบวนการที่สำคัญที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพ ความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ที่ขวางกั้น (Geographic barrier) ที่อยู่อาศัยและระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเกิดจากการสะสมความแตกต่างทางพันธุกรรมไว้มากจนไม่สามารถผสมพันธุ์กับชนิดเดิมได้ (Tessier et al., 1979; White, 1968) กลไกในการแบ่งการเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่จะต้องใช้ระยะเวลาในการแยกชนิดเหมือนกันซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบด้วยกัน คือ วิวัฒนาการสายตรง (Anagenesis) และการแยกแขนงของชนิดหรือ speciation (Cladogenesis) (Coyne and Orr, 2004; Futuyma, 1987; Saether, 1979) ลักษณะของการเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่สามารถจำแนกโดยการศึกษาการกระจายตัวของสิ่งมีชีวิตใช้ระยะทางทางภูมิศาสตร์และลักษณะพันธุกรรมเป็นตัววัดแบ่งออกเป็น 4 รูปแบบ (Butlin et al., 2008) ได้แก่

1. Allopatric distribution เป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ โดยจะแยกสิ่งมีชีวิตสองชนิดขึ้นไปมีที่อยู่อาศัยที่ถูกรกั้นขวางด้วยลักษณะทางภูมิศาสตร์ เช่น ภูเขาหรือแม่น้ำ ทำให้กลุ่มประชากรไม่สามารถติดต่อสื่อสารกันได้เมื่อระยะเวลาผ่านไปลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้เปลี่ยนแปลงแตกต่างกันออกไปและไม่สามารถสืบพันธุ์กันได้อีก (Rivas, 1964) ตัวอย่างเช่น กบในสกุล *Leptopelis* ที่อาศัยอยู่บริเวณคนละฝั่งของเทือกเขาซึ่งมีลักษณะของสีผิวที่ต่างกันทำให้กบบริเวณนี้ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ จึงทำให้พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน โดย พบว่า กบ 3 ชนิด *L. anebos*, *L. fizensis*, *L. karissimbensis* มีบรรพบุรุษเดียวกันในขณะที่กบ *L. kivuensis* และ *L. mtoewaate* มีบรรพบุรุษร่วมกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทือกเขาเป็นลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่สำคัญในการทำให้เกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (Portillo et al., 2015)

2. Peripatric distribution จะมีลักษณะการกระจายตัวของกลุ่มประชากรขนาดเล็กที่แยกมาจากกลุ่มประชากรขนาดใหญ่ (ภาพที่ 2.1) ทั้งสองกลุ่มประชากรมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก (sister population) (Hickerson et al., 2006) เช่น การศึกษาเกิดชนิด

ใหม่ของนกบนเกาะ ซึ่งอนุมานมาจากรูปแบบการกระจายตัวพบว่ารูปแบบพื้นฐานของการเกิดชนิดใหม่นั้นจะเป็นรูปแบบ Allopatric ในเวลาต่อมาจะเกิดในรูปแบบของ sympatric เนื่องจากแรงกดดันจากระบบนิเวศที่เกิดความเปลี่ยนแปลงทำให้จะต้องมีการปรับตัวเกิดการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ (hybridization) ขึ้นเพื่อความอยู่รอดและเกิดกลุ่มประชากรเล็กๆกลุ่มใหม่ขึ้นซึ่งเป็นรูปแบบ peripatric (Grant et al., 1996) ปัจจัยที่สำคัญในการเกิดชนิดใหม่นี้รูปแบบ paripatic คือลักษณะทางภูมิศาสตร์ถิ่นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ความแตกต่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถส่งผลสิ่งมีชีวิตปรับเปลี่ยนลักษณะพฤติกรรมไปจนถึงการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Malay and Paulay, 2010)



ภาพที่ 2.1 แสดงรูปแบบการเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ A คือ Allopatric B คือ Peripatric เป็นการจำลองโมเดลการแยกจากหนึ่งชนิดเป็นสองชนิดจาก Bateson-Dobzhansky-Muller (BDM) ที่มาจาก (Hickerson et al., 2006)

3. Parapatric distribution เป็นความสัมพันธ์การเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ติดกันและเกิดเป็นชนิดใหม่ในเวลาอันรวดเร็ว การกระจายตัวของสิ่งมีชีวิตจะทำให้มีลักษณะทางพันธุกรรมเกิดจาก genetic drift คือความแปรปรวนของความถี่อัลลีลทำให้มีโอกาสเปลี่ยนแปลงจากกลุ่มประชากรเดิมได้ (Endler, 1977; Gavrilov et al., 2000; Slatkin, 1994) เช่นกบในสกุล *Epipedobates* พบว่ากบชนิดที่อาศัยอยู่บนภูเขาและกบชนิดที่อาศัยอยู่ในที่ราบลุ่มมีลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายกัน จึงทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้ mitochondrial DNA *cyt b* 12S และ 16 rRNA และใช้สีของผิวหนังในการจำแนก สรุปได้ว่ากบจะมีลักษณะสีผิวเข้มขึ้นตามระดับความสูง (Roberts et al., 2006)

4. Sympatric distribution เป็นรูปแบบของการอาศัยอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตในพื้นที่หรือระบบนิเวศเดียวกัน ก็สามารถทำให้เกิดชนิดใหม่โดยการสะสมความถี่ความแตกต่างทางพันธุกรรมจนกลายเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ได้เช่นกัน (Mayr et al., 1963) ตัวอย่างเช่น ปลาในกลุ่ม cichlid ที่อาศัยอยู่ในทะเลสาบ Nicaraguan พบว่าปลา *Amphilophus zaliosus* เกิดจากปลาบรรพบุรุษ *A. citrinellus*

จากปัจจัยปลาทั้งสองชนิดนี้มีการกินอาหารที่แตกต่างกันและตำแหน่งที่อยู่อาศัยในทะเลสาบต่างกัน ปัจจุบันพบว่าปลาทั้งสองนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Pharyngeal jaws มีความแตกต่างกันด้วย (Barluenga *et al.*, 2006)

2.2 กบสกุล *Limnodynastes*

กบสกุล *Limnodynastes* ตามรายงานที่ผ่านมามีพบ 50 ชนิดที่มีการกระจายตัวอยู่ในแถบเอเชีย เช่น จีน อินเดีย บรูไน เวียดนาม อินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย เป็นต้น (Emerson *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2003) กบในสกุล *Limnodynastes* จะมีลักษณะเด่นคือบริเวณริมฝีปากล่างจะมีติ่งเนื้อยาวคล้ายเขี้ยว (fanged frogs) มีการกระจายตัวแถบเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Emerson, 1994; Emerson *et al.*, 2000) กบ *L. khulii* เป็นกบที่มีความคลุมเครือในการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาอย่างมาก จัดเป็น cryptic species complex คือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างคล้ายกันแต่ลักษณะทางพันธุกรรมอาจจะเหมือนกันหรือต่างกัน (McLeod, 2010) ในนั้นประเทศไทยถือได้ว่าเป็นฮอตสปอตของความหลากหลายทางชีวภาพและมีความหลากหลายอย่างมากของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Myers *et al.*, 2000) ประเทศไทยมีรายงานสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำมากกว่า 130 ชนิดและมีอย่างน้อย 32 ชนิดที่เป็นสายพันธุ์ประจำถิ่น (Frost, 2015) ปีที่ผ่านมาความสนใจเกี่ยวกับลักษณะของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำที่มีความคลุมเครือแบบ Complexes species โดยเฉพาะภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (McLeod 2008; McLeod 2010; Matsui *et al.* 2010) เช่นกบสกุล *Limnodynastes* ปัจจุบันมีพบ 64 ชนิดและยังมีชนิดใหม่ๆที่ได้รับการอธิบายเพิ่มขึ้นมาเรื่อยๆ กบสกุลนี้มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์มากในปัจจุบัน เมื่อเปรียบเทียบขนาดของกบในสกุลนี้ตัวผู้มักจะมีขนาดใหญ่กว่าตัวเมียเป็นลักษณะเด่นในกบสกุลนี้ (Inger, 1966; McLeod *et al.*, 2012)

ปัจจุบันมีรายงานในประเทศไทย 17 ชนิด (อ้างอิงจาก Amphibian Species of the World 6.0, an Online Reference)

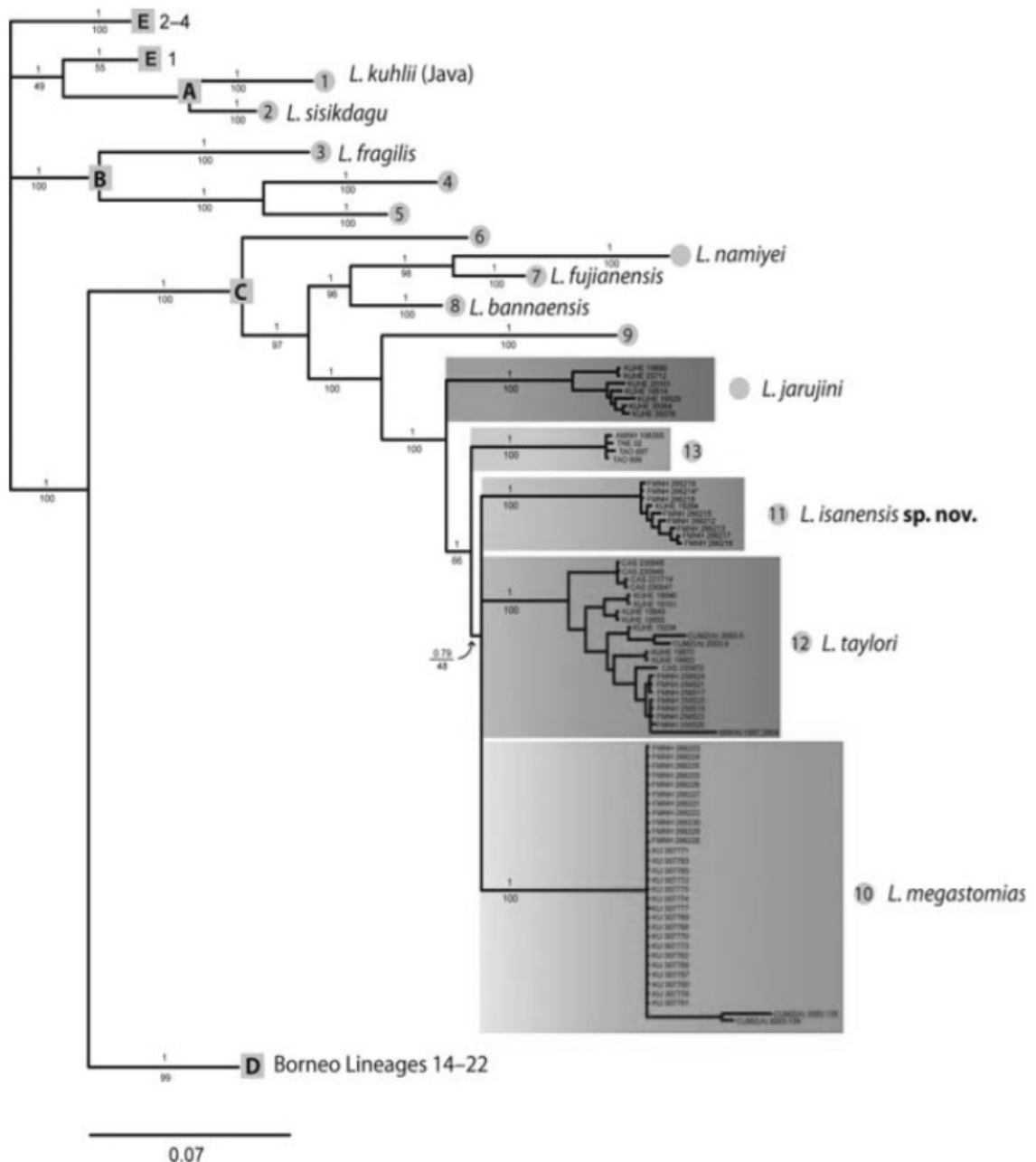
ได้แก่

1. *Limnodynastes blythii* (Boulenger, 1920)
2. *Limnodynastes deinodon* (Dehling, 2014)
3. *Limnodynastes doriae* (Boulenger, 1887)

4. *Limnonectes gyldenstolpei* (Andersson, 1916)
5. *Limnonectes hascheanus* (Stoliczka, 1870)
6. *Limnonectes isanensis* (McLeod, Kelly, and Barley, 2012)
7. *Limnonectes jarujini* (Matsui, Panha, Khonsue, and Kuraishi, 2010)
8. *Limnonectes khasianus* (Anderson, 1871)
9. *Limnonectes kohchangae* (Smith, 1922)
10. *Limnonectes lauhachindai* (Aowphol, Rujirawan, Taksinum, Chuaynkern, and Stuart, 2015)
11. *Limnonectes limborgi* (Sclater, 1892)
12. *Limnonectes macrognathus* (Boulenger, 1917)
13. *Limnonectes malesianus* (Kiew, 1984)
14. *Limnonectes megastomias* (McLeod, 2008)
15. *Limnonectes paramacrodon* (Inger, 1966)
16. *Limnonectes plicatellus* (Stoliczka, 1873)
17. *Limnonectes taylori* (Matsui, Panha, Khonsue, and Kuraishi, 2010)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางอนุชีววิทยามาทำการศึกษพบว่า มีกบมากกว่าหนึ่งชนิดในกบ *L. khulii* (McLeod, 2010) ในปี 2008 David S. McLeod ได้พบกบชนิดใหม่ในสกุล *Limnonectes* จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้ยีน 12S และ 16S ไมโทคอนเดรีย และลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนก ชื่อว่า *L. megastomias* มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับกบหางอน *L. gyldenstolpei* 15% และในปี 2010 Masafumi Masui และคณะได้ทำการศึกษากบ *L. megastomias* ภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทยโดยศึกษาไมโทคอนเดรียยีน 12S rRNA, tRNA และ 16S rRNA อีกทั้งทำการศึกษายีนในนิวเคลียส POMC และ RAG-1 พบว่า *L. megastomias* ในภาคเหนือและภาคใต้แตกต่างกัน ทำการจำแนกเป็นชนิดใหม่ในภาคเหนือชื่อว่า *L. taylori* เพื่อให้เกียรติแก่ Edward Taylor และภาคใต้ชื่อว่า *L. jarujini* เพื่อให้เกียรติแก่ ดร.จารุจินต์ นภิตะภักดิ์ ซึ่งเป็นนักอนุกรมวิธานคนสำคัญของไทย ส่วนภาคตะวันออกเฉียงเหนือยังคงต้องทำงานศึกษาลักษณะทางสัณฐาน

ต่อไปเนื่องจากยังมีลักษณะที่คลุมเครือ ต่อมาในปี 2012 ได้ทำการศึกษา *L. megastomias* จากจังหวัด
 เลขต่อจากการศึกษาของ Masafumi Masui และคณะ โดยพบว่าปูมบริเวณขาหลังมีลักษณะที่แตกต่าง
 จาก *L. megastomias* พบว่าเป็นชนิดใหม่โดยมีชื่อว่า *L. isanensis* ซึ่งมีระยะห่างทางพันธุกรรม
 ใกล้เคียงกับ *L. taylari* (ภาพที่ 2.2) (McLeod et al., 2012)

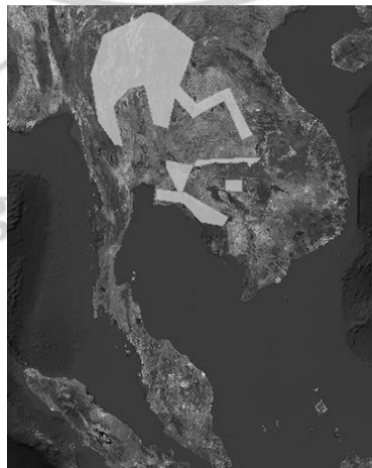


ภาพที่ 2.2 แสดงแผนผังวิวัฒนาการของกบสกุล *Limnonectes* ชนิดใหม่ของประเทศไทยเทียบกับ *Limnonectes kuhlii* complex ที่ตำแหน่งยีน 12S และ 16S ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ที่มาจาก (McLeod et al., 2012)

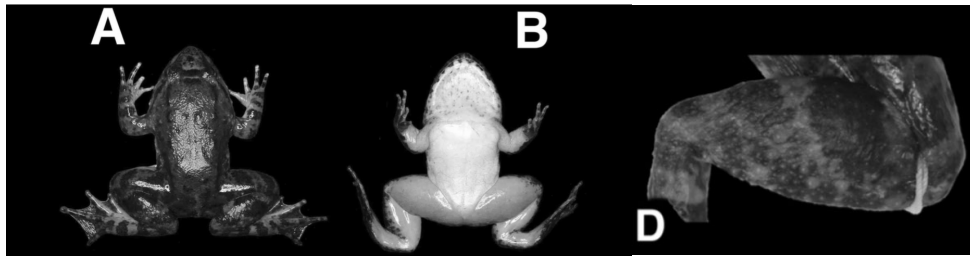


ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของกบหงอน (*L. gyldenstoepei*) รูปซ้ายแสดงด้าน dorsal ของ ลำตัวและรูปขวาแสดงด้านหน้าส่วนหัว และด้านข้างส่วนหัว ที่มาจาก (Lambertz et al., 2014)

Limnodynastes dorsalis (กบหงอน), *L. macrognathus* และ *L. plicatellus* เป็นกบที่มี ลักษณะเด่นในส่วนหัวที่เหมือนฝาครอบที่ใช้ในการจัดจำแนก (Lambertz et al., 2014) *L. gyldenstoepei* ที่ได้ชื่อว่า กบหงอน เพราะมีดั่งเนื้อมันมีลักษณะคล้ายกับหงอนสามารถเปิดปิดได้ ลักษณะเด่นนี้ ทำให้สามารถจัดจำแนกกบหงอนได้ง่ายในการศึกษาการจำแนกในสกุล *Limnodynastes* มักนำมาใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบ เช่นการศึกษาจัดจำแนกกบมีเขี้ยวที่พบบนภูเขาที่มีการกระจายตัวอยู่ทางตอนใต้ของ ประเทศกัมพูชาพบว่าเป็นกบชนิดใหม่ได้แก่ *Rana (Sylvirana) faber*, *Philautus cardamonus* และ *Megophrys (Xenophrys) auralensis* (Ohler et al., 2002) ซึ่งกบหงอนจะพบการกระจายตัวในประเทศ ไทย กัมพูชาและทางตอนเหนือของประเทศลาว พบที่ความสูงตั้งแต่ 200-800 เมตร เหนือ ระดับน้ำทะเล ลำตัวยาวถึง 50-60 มิลลิเมตร มักอาศัยอยู่ในระบบนิเวศน้ำนิ่ง แอ่งน้ำเล็กๆ มีการ กระจายตัวบริเวณภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย (ภาพที่ 2.4) ปัจจุบันมีจำนวนประชากร ลดลง (IUCN, 2004)

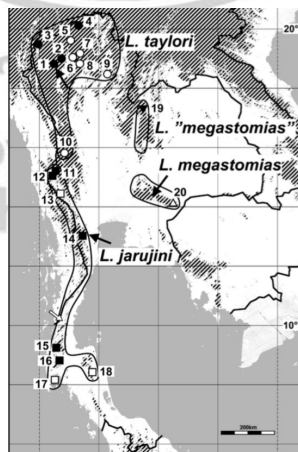


ภาพที่ 2.4 แผนที่การกระจายตัวของกบหงอน (*L. gyldenstoepei*) โดยแถบสีเหลืองแสดงการกระจาย ตัวบริเวณภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย (เข้าถึงได้จาก<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=58337>)



ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของกบหัวขาป้อมเหนือ A แสดงด้าน dorsal ของลำตัว B แสดงด้าน ventral ของลำตัว C แสดงลักษณะปุ่มบริเวณขาหลังซึ่งเป็นลักษณะเด่นในการจำแนก ที่มา (Matsui et al., 2010)

กบหัวขาป้อมเหนือ (*Limnodynastes dorsalis*) มีขนาดตัวปานกลาง ตัวผู้จะมีขนาดใหญ่และส่วนหัวยาวกว่าตัวเมีย มีปุ่มอัดแน่นบริเวณขา (ภาพที่ 2.5) มักจะอาศัยบริเวณแอ่งน้ำเล็ก (กว้างประมาณ 2 เมตร) อยู่ในระดับความสูง 650-1650 เมตร (เหนือระดับน้ำทะเล) มีการกระจายตัวภาคเหนือของประเทศไทย (ภาพที่ 2.6) ในป่าทุติยภูมิที่มีต้นสักและต้นสนอยู่เป็นจำนวนมาก ผลสมพันธุ์ในช่วงเดือน (Matsui et al., 2010) มีการศึกษาพบในสกุล *Limnodynastes* พบการกระจายตัวทางตอนเหนือของเวียดนามโดยใช้ยีน 12S และ 16S ไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับ *L. isanensis*, *L. jarujini*, *L. megastomias* และ *L. taylori* พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความแตกต่างเป็นชนิดใหม่ชื่อว่า *L. nguyenorum* (McLEOD et al., 2015) และล่าสุดในปี 2016 ได้พบในสกุล *Limnodynastes* ชนิดใหม่ที่มีการกระจายตัวทางตอนใต้ของประเทศไทยและพม่า โดยได้ตั้งชื่อว่า *L. longchuanensis* ทำการจัดจำแนกโดยใช้ยีน 12S rRNA tRNA และ 16S rRNA ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับกบสกุล *Limnodynastes* ที่พบประเทศไทยและจีนได้แก่ *L. taylori*, *L. megastomias*, *L. isanensis*, *L. nguyenorum* และ *L. jarujini* และมีลักษณะการกระจายตัวแบบ Sympatric (Suwannapoom et al., 2016)



ภาพที่ 2.6 ภาพการกระจายตัวของกบหัวขาป้อมเหนือ (*Limnodynastes dorsalis*) มีการกระจายตัวบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย (Matsui et al., 2010)

2.3 เครื่องหมายโมเลกุล inter simple sequence repeat (ISSR)

มีการเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุล ในการตรวจหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะการกระจายตัวแบบ sympatric โดยใช้เทคนิคดังต่อไปนี้ เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) เพื่อตรวจสอบ X-linked ribosomal DNA (rDNA) ในยุงก้นปล่อง (*Anopheles gambiae*) ซึ่งเป็นพาหะของไข้มาลาเรีย ที่มีลักษณะของโครโมโซมแบบ sympatric ในสามพื้นที่ ได้แก่ Bamako, Mopti และ Savanna พบว่า *A. gambiae* ไม่มีการกระจายตัวของยีนเข้าหากันทั้งสามพื้นที่ (Favia et al., 1997) อีกทั้งยังมีการใช้เทคนิค amplified fragment length polymorphisms (AFLP) ในการทดสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าปลาทั้ง 5 ชนิดในทะเลสาบวิกตอเรียที่มีการศึกษาทางสัตววิทยาสามารถแบ่งปลาออกเป็นสองกลุ่ม ยังมีการกระจายตัวของยีนร่วมกันอยู่ (Wagner et al., 2013) แต่ทั้งเทคนิค RFLP และ AFLP มีข้อจำกัดคือรูปแบบของ DNA มีความหลากหลายสูงในสัตว์ แต่เป็นยีน dominance ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสัตว์ที่มียีนในสภาพ homozygous และ heterozygous ได้ ทำให้มีความนิยมใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับสัตว์น้อยลง (Montaldo and Meza-Herrera, 1998) จึงมีการใช้เทคนิค microsatellite ที่มีโครงสร้างเป็นคู่เบสซ้ำๆกันอยู่ในช่วง 2-5 เบส มีคุณสมบัติกระจายทั่วทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตซึ่งมีความจำเพาะและเป็นยีน co-dominant (Pejic et al., 1998) มีการใช้เทคนิคนี้ในกบ *Rana arvalis* ที่อาศัย microhabitat ต่างกัน ในพื้นที่ราบสูงทางตอนกลางของประเทศสวีเดนจำนวน 17 ตำแหน่งพื้นที่ชุ่มน้ำ เพื่อศึกษาว่าปัจจัยใดบ้างที่ทำให้กบมีการปรับตัวในระบบนิเวศ จึงทำให้เกิดการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ตำแหน่งยีน microsatellite และ thyroid hormone receptor (TRB) gene เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ พบว่าลักษณะทางภูมิศาสตร์ไม่เป็นตัวปิดกั้นการกระจายตัวของยีน แต่ช่วงเวลาของฤดูผสมพันธุ์และคุณภาพของสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันเป็นตัวปิดกั้นการกระจายตัวของยีนเนื่องจากเลือกใช้พื้นที่อาศัยใน microhabitat ที่ต่างกันทำให้กบชนิดนี้ไม่มีการกระจายตัวของยีน แสดงให้เห็นถึงการคัดเลือกทางธรรมชาติโดยมีการถ่ายเทยีนแบบสูง (Richter-Boix et al., 2013) และยังมีการใช้เทคนิค DNA metabarcoding ศึกษาอาหารของสัตว์ฟันแทะ (subterranean rodents) สองชนิด *Ctenomys minutus* และ *C. flamarioni* ว่า มีลักษณะการกินอาหารอย่างไรถึงสามารถอาศัยอยู่ร่วมกันได้ พบว่า *C. minutus* ปรับตัวกินอาหารได้หลากหลายตามสภาพพื้นที่อาศัยได้เป็นอย่างดี แต่ใน *C. flamarioni* มีความจำเพาะต่อการเลือกกินอาหารเพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Lopes et al., 2015) นอกจากนี้มีการใช้เทคนิค Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) มีลักษณะเป็น dominance marker ที่พัฒนาไพรเมอร์เป็นส่วนของตำแหน่งยีน microsatellite (Yao et al., 2008) ในการตรวจหาอัลลีลที่จำเพาะต่อสิ่งมีชีวิต ทำการศึกษาใน กบ *Rana pipiens* ตรวจสอบยีนที่แสดงออกลักษณะของสีลำตัวกบซึ่งพบว่าในกลุ่มประชากรของกบชนิดนี้มีสีลำตัวต่างกันแต่มีอัลลีลไม่แตกต่างกัน (Hoffman et al., 2006) ดังนั้นวิธีการ

ISSR เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างส่วนของไมโครแซทเทลไลต์สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตนั้นมาก่อน ไพรมเมอร์ของ ISSR จะจับกับตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์แบบสุ่ม ซึ่งตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิตและมีความหลากหลายสูงทำให้มีประโยชน์มากในการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลมีความสำคัญในการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดในระดับประชากร (อรุณรัตน์, 2552)

2.4 ยีน Tyrosinase

สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่มีความหลากหลายสูง (Young et al., 2005) การใช้ข้อมูลทางอนุชีววิทยามาเสริมทำให้ข้อมูลในการจำแนกทางสัณฐานชัดเจนยิ่งขึ้น (Chek et al., 2001; Cherry et al., 1977; Hass et al., 1995; Maxson, 1984; Richards and Moore, 1996; Stuart et al., 2006) เนื่องจากมีความผันแปรของสีผิวมากซึ่งสามารถบอกการวิวัฒนาการของสายพันธุ์ได้อีกด้วย (Wang and Shaffer, 2008) สีผิวเกิดจากสารเมลานินเป็นสารที่อยู่ในเซลล์ทำให้เห็นสีผิวเข้มขึ้น เมลาโทนินเป็นสารที่ทำให้เม็ดสีผิวกระจายตัวทำให้สีผิวอ่อนลงหรือดูสว่างขึ้น (Lerner and Case, 1959)

Tyrosinase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างเมลานินถูกสร้างมาจาก Melanocyte (Ferguson and Kidson, 1997) ซึ่งเป็นนิวเคลียสดีเอ็นเอ (Lerner and Case, 1959) ตำแหน่งที่ตั้งของยีนบนโครโมโซมในกบสกุล *Limnodynastes* นั้นยังไม่มีการศึกษา แต่มีการศึกษาในกบสกุล *Xenopus* ในบางชนิด เช่น *X. tropicalis* พบยีน *tyrosinase* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 กบ *X. laevis* ยีน *tyrosinase* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 (Klein et al., 2002) ปัจจุบันได้มีการนำยีน *Tyrosinase* มาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตที่ลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันโดยเฉพาะในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ในทวีปอเมริกาจัดได้ว่ามีความหลากหลายของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำมากซึ่งมักจะมีลักษณะที่เป็น Cryptic ทำให้การจำแนกทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวไม่พอ ต้องอาศัยการศึกษาทางพันธุกรรมด้วย จึงทำการศึกษากบกลุ่ม *Scinax ruber* และกบกลุ่ม *Rhinella margaritifera* ด้วยยีน *Tyrosinase* และยีน 18S rDNA พบว่าสามารถจัดกบสองกลุ่มได้จำแนกได้ (Fouquet et al., 2007) มีการศึกษาในคางคก narrow-mouthed toads (Family: Microhylidae) ที่มีการกระจายตัวเป็นวงกว้างทั่ว Gondwanan (อเมริกา บริเวณแอฟริกาใต้ ฮาวาย มาดากัสการ์ อินเดีย พบมากที่สุดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงนิวกินี และตอนเหนือออสเตรเลีย) โดยใช้ยีน *Tyrosinase* ในการจำแนก (van der Meijden et al., 2007) จะเห็นได้ว่ายีน *Tyrosinase* มีความสามารถในการจำแนกชนิดของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำได้ดี