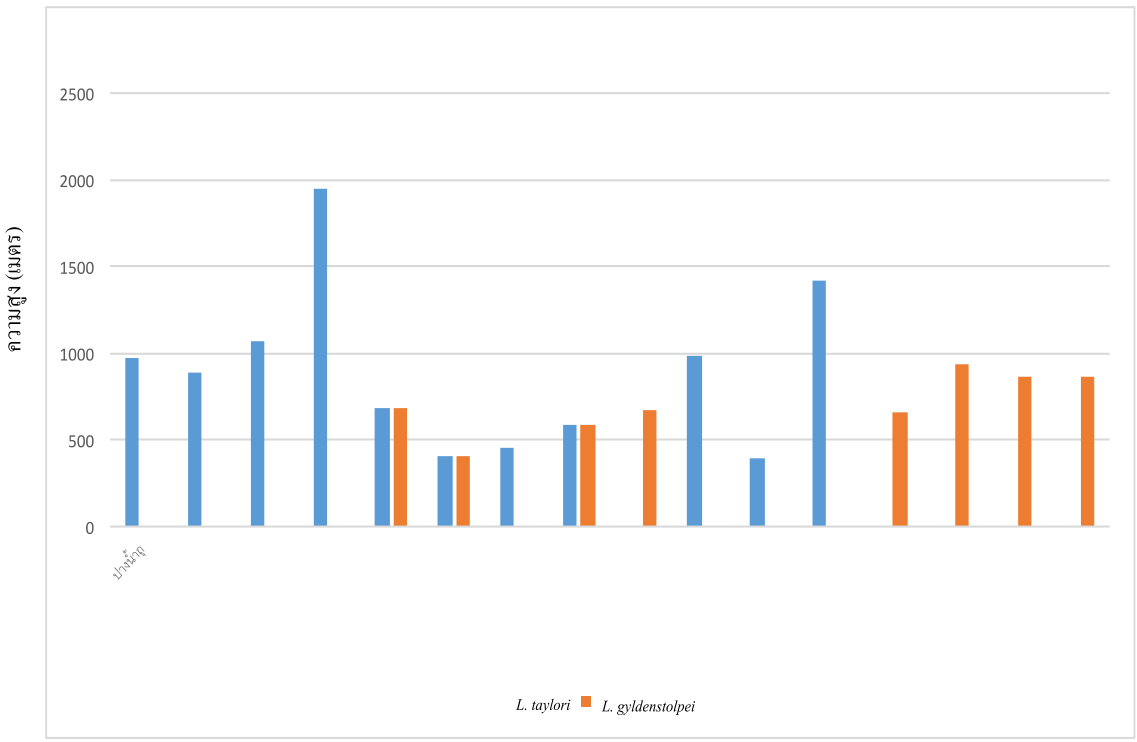
# บทที่4

# ผลงานวิจัย

ผลการทดลอง

## 4.1 การเก็บตัวอย่าง

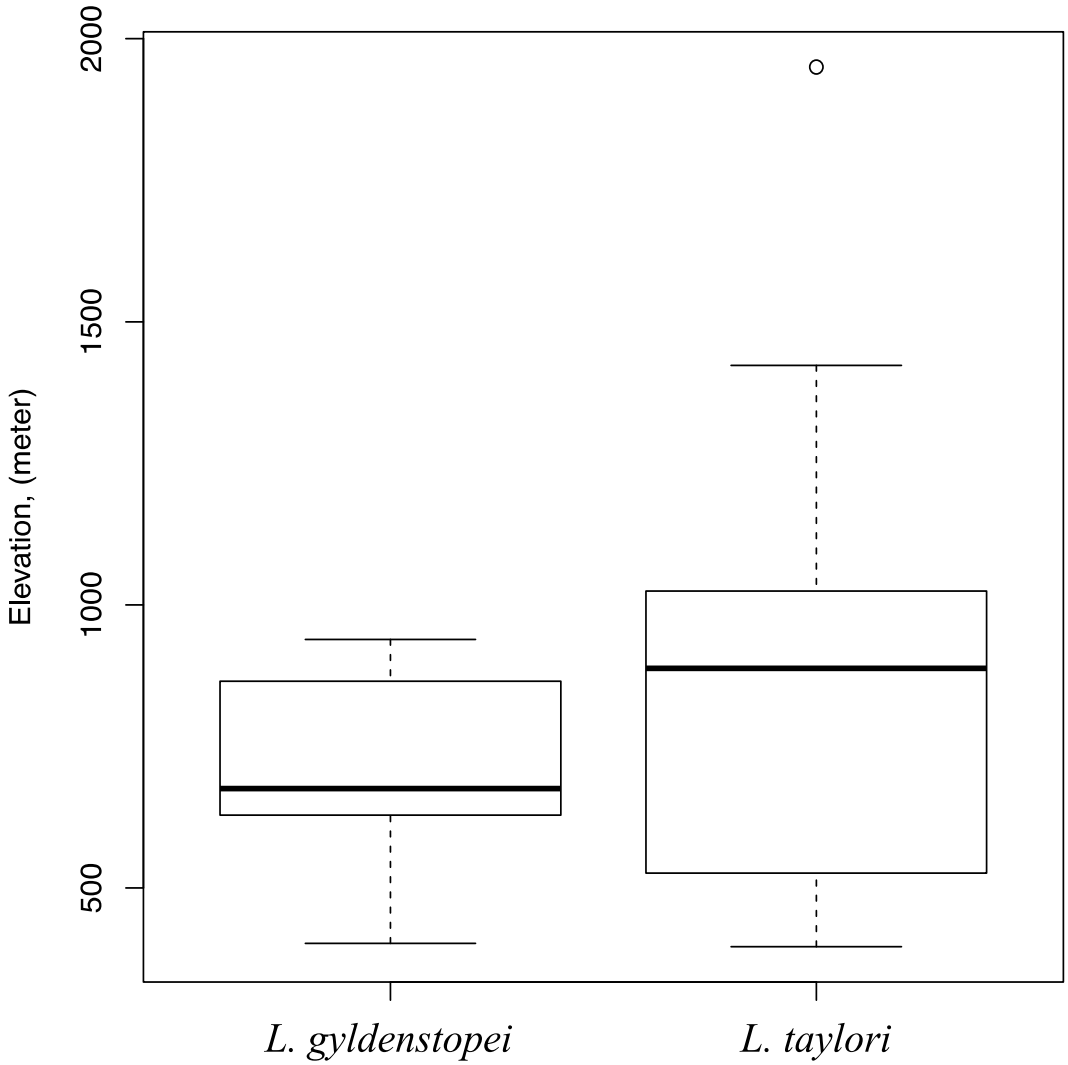



ภาพที่ 4.1 แผนภูมิแสดงความสูงของพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างของกบหงอน (*Limnonectes gyldenstopei*) และกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*Limnonectes taylori*)

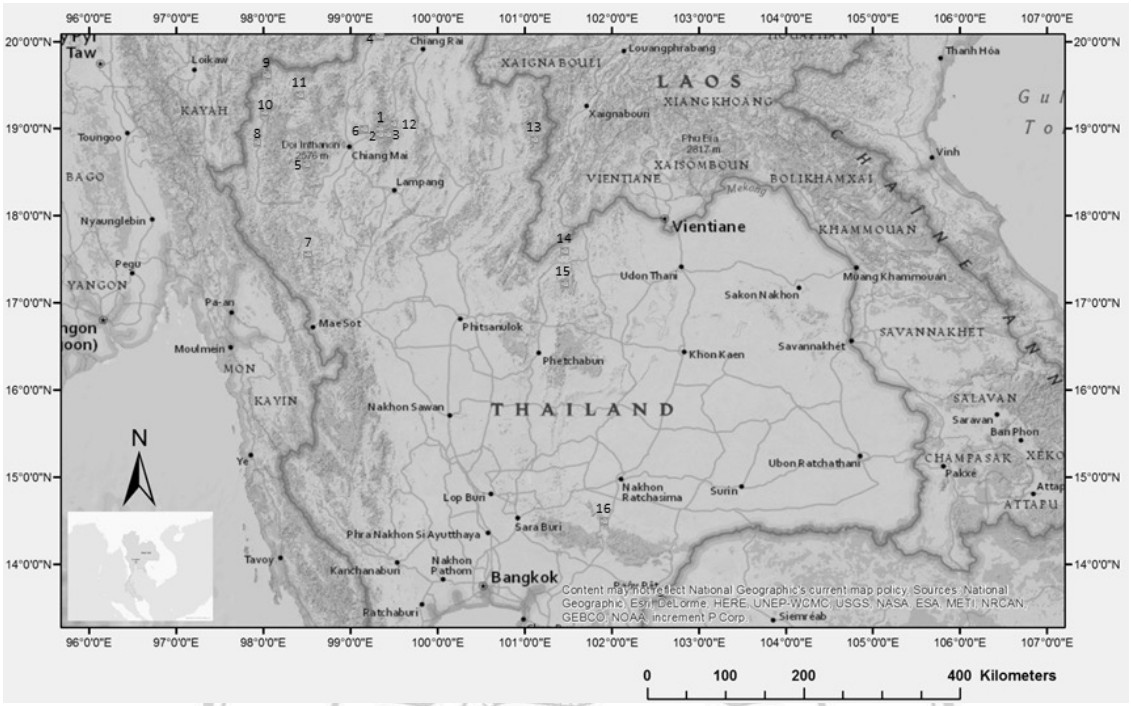
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำข้อมูลพิกัดจากการเก็บตัวอย่างมาสร้างแผนภูมิ (ภาพที่ 4.1) แสดงความสูงของแต่ละพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างและสร้างแผนภูมิ box plot (ภาพที่ 4.2) การกระจายตัวความสูงของพื้นที่เก็บตัวอย่าง โดยกบห้วยขาปุ่มเหนือมีการกระจายตัวในบริเวณที่มีความสูงมากกว่ากบหงอน โดยมีค่ากลาง (median) ของข้อมูลความสูงของกบห้วยขาปุ่มเหนืออยู่ที่ 888 เมตรและค่ากลางของข้อมูลความสูงของกบหงอนอยู่ที่ 675.5 เมตร และค่าเฉลี่ย (mean) ของข้อมูลความสูงของกบห้วยขาปุ่มเหนืออยู่ที่

891.45 และค่าเฉลี่ยของข้อมูลความสูงของกบหงอนอยู่ที่ 709.88 เมื่อทำการทดสอบทางสถิติมีค่า t test เท่ากับ 1.0256 และค่า p-value เท่ากับ 0.3194 คือความสูงของพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างของกบทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน แล้วจึงนำข้อมูลพิกัดสร้างแผนที่จุดที่เก็บของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ (ภาพที่ 4.3)




ภาพที่ 4.2 แผนภูมิ box plot แสดงค่ากลาง (median) ของข้อมูลความสูงของพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างทั้งหมดของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ

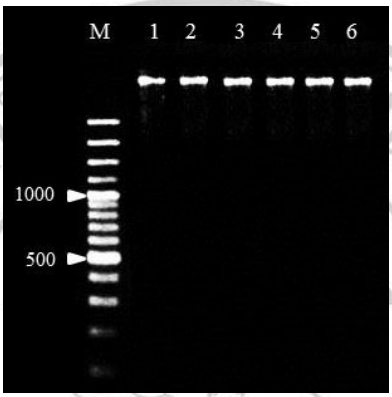



ภาพที่ 4.3 แสดงจุดพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ พื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ได้แก่ 1 คือ ปางน้ำถุ (ความสูง 968 เมตร) 2 คือ ปางบง (ความสูง 888 เมตร) 3 คือ ปางกำแพงหิน (ความสูง 1067) 4 คือ ดอยลาง (ความสูง 1950 เมตร) 5 คือ อุทยานแห่งชาติแม่วาง (ความสูง 678 เมตร) 6 คือ บ้านป่าสักงาม (ความสูง 402 เมตร) 7 คือ อมก๋อย (ความสูง 460 เมตร) พื้นที่ในจังหวัดแม่ฮ่องสอนได้แก่ 8 คือ ขุนยวม (ความสูง 673 เมตร) 9 คือ บ้านนาป่าแปก (ความสูง 982 เมตร) 10 คือ อุทยานแห่งชาตินำ้ตกแม่สุรินทร์ (ความสูง 396 เมตร) 11 คือ ดอยผักกูด (ความสูง 1423 เมตร) 12 คือ อุทยานขุนแจ (ความสูง 592 เมตร) จังหวัดเชียงราย 13 คือ ดอยภูฟ้า (ความสูง 665 เมตร) จังหวัดน่าน พื้นที่ในจังหวัดเลยได้แก่ 14 คือ อุทยานแห่งชาติภูเรือ (ความสูง 939 เมตร) 15 คือ ภูหลวง (ความสูง 865 เมตร) 16 คือ สะแกราช (ความสูง 865 เมตร) จังหวัดนครราชสีมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**4.2 การสกัดดีเอ็นเอ**

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ทำการเก็บมาจาก 16 พื้นที่ ใน 6 จังหวัด กบหงอน (*L. gyldenstolpei*) 64 ตัวอย่างและกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori* ) 59 ตัวอย่าง (ภาคผนวก) ด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Jiwyam et al., (2005) จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรฟอรีซิล (ภาพที่ 4.4) พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเอ ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอมีค่า Purity A260/A280 อยู่ที่ 1.44-1.73 (ภาคผนวก)

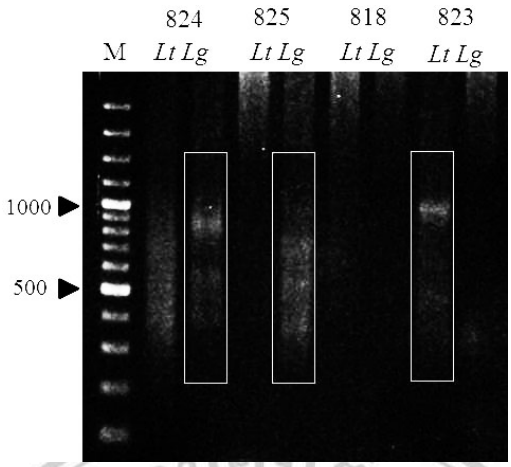



ภาพที่ 4.4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด kit M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder เลนที่ 1-3 คือ ดีเอ็นเอของกบหงอน และ เลนที่ 4-6 คือ ดีเอ็นเอของกบห้วยขาปุ่มเหนือ ที่ทำการปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

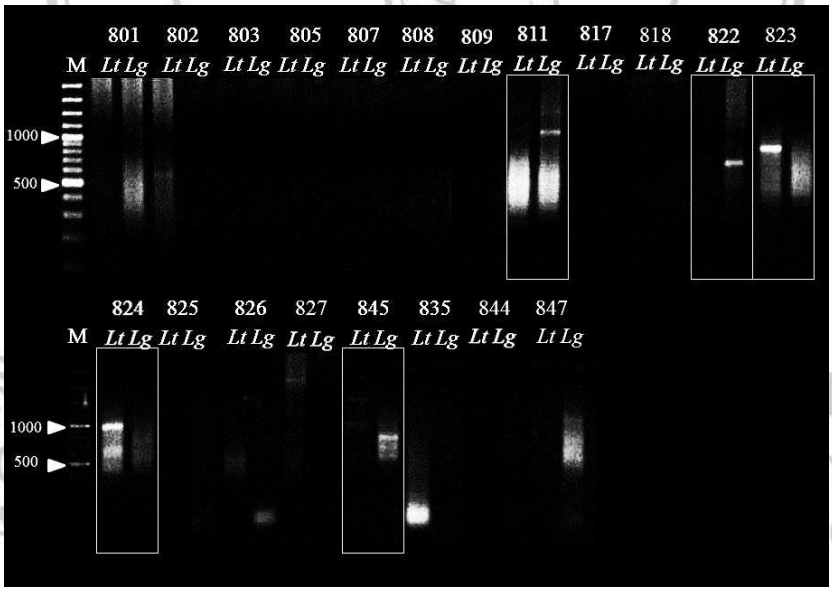
**4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR**

เริ่มจากการทดสอบหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ทั้งหมด 20 ตำแหน่งไพรเมอร์ ด้วยเทคนิค touch down PCR (คือการลดอุณหภูมิขั้น annealing ลงรอบละ 1 °C จำนวน 5 รอบ อีก 30 รอบ) ในช่วงอุณหภูมิ 45-64 °C พบว่า ไพร์เมอร์ UBC811 ให้ผลผลิต PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ช่วงอุณหภูมิ 55-59 °C ไพร์เมอร์ UBC822 ให้ผลผลิตPCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ช่วงอุณหภูมิ 50-59 °C ไพร์เมอร์ UBC823 ให้ผลผลิตPCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ช่วงอุณหภูมิ 55-59 °C ไพร์เมอร์ UBC824 ให้ผลผลิต PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ช่วงอุณหภูมิ 45-59 °C ไพร์เมอร์ UBC845 ให้ผลผลิต PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ช่วงอุณหภูมิ 50-54 °C ดังตาราง 4.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




ภาพที่ 4.5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ กบหงอน (*L. gyldenstolpei*) และกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori* ) โดยใช้ไพรเมอร์ UBC824, UBC825, UBC818, UBC823 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder Lt คือ กบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori* ) Lg คือ กบหงอน (*L. gyldenstolpei*)]




ภาพที่ 4.6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค touch down PCR ของกบหงอน (*L. gyldenstolpei*) และกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori* ) โดยใช้ไพรเมอร์ UBC801, UBC802, UBC803, UBC805, UBC807, UBC808, UBC809, UBC811, UBC817, UBC818, UBC822, UBC823, UBC824, UBC825, UBC826, UBC827, UBC835, UBC844, UBC845, UBC847 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder Lt คือ กบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori* ) Lg คือ กบหงอน (*L. gyldenstolpei*)]

ตารางที่ 4.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ และmelting temperature ของไพรเมอร์ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์

| Primer name | Primer sequences (5'-3') | $T_m$ (C°) | 45-49 C° | 50-54 C° | 55-59 C° | 60-64 C° |
|---|---|---|---|---|---|---|
| UBC801 | $(AT)_8T$ | 25.3 | - | - | - | - |
| UBC802 | $(AT)_8G$ | 27.8 | - | - | - | - |
| UBC803 | $(AT)_8C$ | 27.8 | - | - | - | - |
| UBC805 | $(TA)_8C$ | 27.8 | - | - | - | - |
| UBC807 | $(AG)_8T$ | 44.6 | - | - | - | - |
| UBC808 | $(AG)_8C$ | 47.1 | - | - | - | - |
| UBC809 | $(AG)_8G$ | 47.1 | - | - | - | - |
| UBC811 | $(GA)_8C$ | 47.1 | * | ** | *** | - |
| UBC817 | $(CA)_8A$ | 44.6 | - | - | - | - |
| UBC818 | $(CA)_8G$ | 47.1 | - | - | - | - |
| UBC822 | $(TC)_8A$ | 44.6 | - | *** | *** | - |
| UBC823 | $(TC)_8C$ | 47.1 | - | ** | *** | - |
| UBC824 | $(TC)_8G$ | 47.1 | ** | ** | ** | - |
| UBC825 | $(AC)_8T$ | 44.6 | * | - | - | - |
| UBC826 | $(AC)_8C$ | 47.1 | * | - | - | - |
| UBC827 | $(AC)_8G$ | 47.1 | * | * | - | - |
| UBC835 | $(AG)_8YG$ | 49.2 | - | - | - | - |
| UBC844 | $(CT)_8RC$ | 49.2 | - | - | - | - |
| UBC845 | $(TC)_8RG$ | 49.1 | - | *** | ** | - |
| UBC847 | $(CA)_8RC$ | 49.2 | - | - | - | - |

หมายเหตุ

* คือปรากฏ smear (ตัวอย่างภาพที่ 4.5 ไพรเมอร์ UBC825 ตัวอย่าง *Lg*)

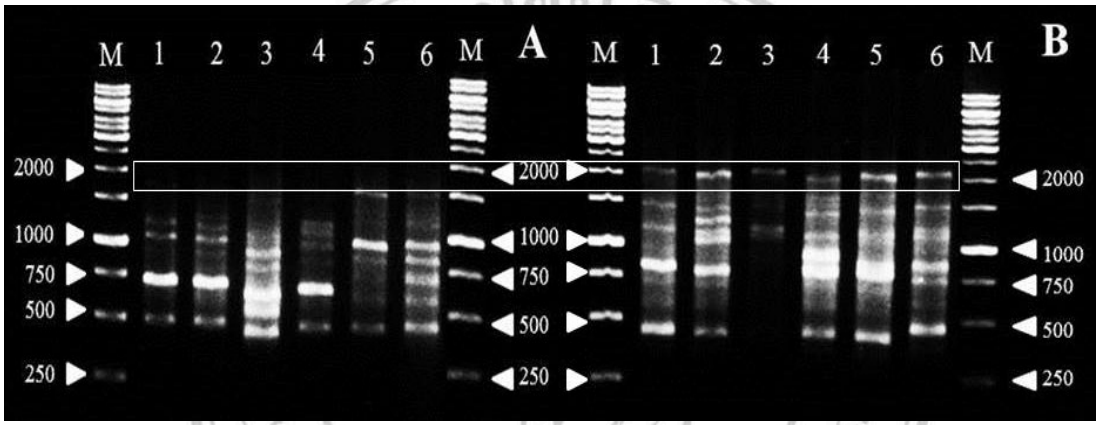
** คือปรากฏแถบแบนจางและเกิด smear (ตัวอย่างภาพที่ 4.5 ไพรเมอร์ UBC824 ตัวอย่าง *Lg*)

*** คือปรากฏแถบแบนอย่างเดียวแต่ไม่คมชัด (ตัวอย่างภาพที่ 4.5 ไพรเมอร์ UBC823 ตัวอย่าง *Lt*)

– คือไม่ปรากฏเลย (ตัวอย่างภาพที่ 4.5 ไพรเมอร์ UBC818)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากผลการทดลอง PCR ให้ผลผลิต PCR ไม่คมชัดจึงเลือกไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอและปรากฏแถบดีเอ็นเอจางๆ หรือเป็น smear (ตัวอย่างจากภาพที่ 4.5) จากนั้นนำมาทำ gradient PCR (กำหนดช่วงอุณหภูมิ annealing ต่างๆใน block เดียวกัน) ในช่วงอุณหภูมิที่ทำการทดสอบด้วยเทคนิค touch down ผลปรากฏว่ามี 5 ไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจนได้แก่ UBC811 ที่อุณหภูมิ 55 ˚C UBC822 ที่อุณหภูมิ 52 ˚C UBC823 ที่อุณหภูมิ 55 ˚C (ภาพที่ 4.7) UBC824 ที่อุณหภูมิ 45 ˚C และUBC845 ที่อุณหภูมิ 54 ˚C จึงนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทุกตัวอย่าง




ภาพที่ 4.7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gradient A คือ กบหงอน (*L. gyldenstolpei*) และ B คือ กบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori* ) โดยใช้ไพรเมอร์ UBC823

**4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยยีน Tyrosinase**

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยยีน Tyrosinase ในนิวเคลียส ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาด 612 bp จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นไฟล์ .txt ใส่ลงในโปรแกรม BioEdit version 7.2 ทำการแปลงสกุลไฟล์ให้เป็น (.fas) จากนั้นจึงโหลดข้อมูลทั้งหมดรวมทั้งข้อมูลจาก GenBank ลงในโปรแกรม ClustalX 2.1 ทำการ Alignment โปรแกรมจะทำการเปรียบเทียบข้อมูลที่โหลดลงไป จะแสดงลำดับเบสที่มีความคลุมเครือโดยเบสตัวที่เหมือนกันจะแสดงเป็นลักษณะ (*) ทางด้านบนของข้อมูล บางตัวอย่างจะแสดง เครื่องหมาย (–) เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์หายไป (base deletion) (ภาคผนวก ค)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม**

4.5.1 การแปลผลข้อมูลจากภาพผลผลิต PCR

การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเจลอิเล็กโทรฟอรีซิลนำภาพที่ได้มาเรียงต่อกัน ทำการนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและแปลงผลข้อมูลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปรากฏแถบให้เป็น 1 ไม่ปรากฏเป็น 0 จากตัวอย่างภาพที่ 4.7 และบันทึกข้อมูลแบบตาราง 4.3 พบว่าให้ Polymorphic band โดย UBC811 ให้ 14 แถบดีเอ็นเอ ช่วงขนาด 100 – 1000 base pair UBC822 ให้ 21 แถบดีเอ็นเอ ช่วงขนาด 200 – 1200 base pair UBC823 ให้ 22 แถบดีเอ็นเอ ช่วงขนาด 300 – 2000 base pair UBC824 ให้ 15 แถบดีเอ็นเอ ช่วงขนาด 400 – 1400 base pair และ UBC845 ให้ 24 แถบดีเอ็นเอ ช่วงขนาด 500 – 2000 base pair (ตาราง 4.2) และพบว่าในกบหงอนพบ Monomorphic band ที่ไพรเมอร์ UBC811 จำนวน 1 แถบ มีขนาด 300 base pair และกบห้วยขาปุ่มเหนือพบ Monomorphic band ที่ไพรเมอร์ UBC824 จำนวน 1 แถบ มีขนาด 1,500 base pair

ตารางที่ 4.2 ไพรเมอร์และ Annealing temperature ของไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชัดเจน

| Primer name | Reference | Primer sequences (5'-3') | Annealing temperature (˚C) | Polymorphic band | Size range (bp) |
|---|---|---|---|---|---|
| UBC 811 | (Fonseca-Salamanca et al., 2006) | $(GA)_8C$ | 55.0 | 14 | 100-1000 |
| UBC 822 | (Fonseca-Salamanca et al., 2006) | $(TC)_8A$ | 52.0 | 21 | 200-1200 |
| UBC 823 | (Fonseca-Salamanca et al., 2006) | $(TC)_8C$ | 55.0 | 22 | 300-3000 |
| UBC 824 | (Kojima et al., 1998) | $(TC)_8G$ | 45.0 | 15 | 400-1400 |
| UBC 845 | (Yao et al., 2008) | $(CT)_8RG$ | 54.0 | 24 | 500-3000 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.3 แสดงการนับแถบดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ UBC823 (ภาพที่ 4.7) โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้เท่า 1 และไม่ปรากฏเท่ากับ 0 Sample A คือ กบหงอนและSample B คือ กบห้วยขาปุ่มเหนือ

| band | Sample A | | | | | | band | Sample B | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |

4.5.2 การวิเคราะห์ทางสถิติการประมาณความหลากหลายทางพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ

1. ค่าความแปรปรวนของพันธุกรรมโดยใช้การวิเคราะห์วิธี Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

การทดสอบความแปรปรวนของพันธุกรรม ของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ พบว่ากบหงอนมีค่าความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากร 9.908 และความแปรปรวนภายในประชากร มีค่าเท่ากับ 225.201 และค่าความแปรปรวนระหว่างจังหวัดมีค่าเท่ากับ 42.467 (ดังตาราง4.4) และในกบห้วยขาปุ่มเหนือมีค่าความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากรมีค่าเท่ากับ 34.270 ความแปรปรวนภายในประชากร มีค่าเท่ากับ 245.952 และค่าความแปรปรวนระหว่างจังหวัดมีค่าเท่ากับ 13.381 (ดังตาราง 4.5.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4 ค่าความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ AMOVA ภายในประชากร และระหว่างประชากรทั้ง 8 กลุ่มของกบหงอน

| แหล่งความแปรปรวน | d.f. | Sum of square | เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวน |
|---|---|---|---|
| ระหว่างจังหวัด | 5 | 42.467 | 8 |
| ระหว่างกลุ่ม | 2 | 9.908 | 2 |
| ภายในกลุ่ม | 51 | 225.201 | 91 |
| ทั้งหมด | 58 | 277.576 | 100 |

ตารางที่ 4.5 ค่าความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ AMOVA ภายในประชากร และระหว่างประชากรทั้ง 11 กลุ่มของกบห้วยขาปุ่มเหนือ

| แหล่งความแปรปรวน | d.f. | Sum of square | เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวน |
|---|---|---|---|
| ระหว่างจังหวัด | 2 | 13.381 | 2 |
| ระหว่างกลุ่ม | 7 | 34.270 | 1 |
| ภายในกลุ่ม | 53 | 245.952 | 97 |
| ทั้งหมด | 62 | 293.603 | 100 |

2. แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method Using Arithmatic Averages (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม POPTREE 2 (Takezaki et al., 2010) และจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี principal coordinate analysis (PCoA) ด้วย โปรแกรม GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012)

แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ ด้วยวิธี UPGMA พบว่ากบสองชนิดนี้แยกกันอย่างชัดเจน โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม A และ B (ดังภาพที่ 4.8) คือ

กลุ่ม A ซึ่งสามารถออกเป็น 3 กลุ่มด้วยกัน คือ

1. กลุ่ม A1 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

1.1. A1-ii คือ กบหงอนที่ทำการเก็บตัวอย่างมาจากภาคเหนือและภาคอิสาน 8 กลุ่มประชากร แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

- อุทยานแห่งชาติแม่วาง จ.เชียงใหม่ ขุนยวม จ.แม่ฮ่องสอน บ้านป่าสักงาม จ.เชียงใหม่ อุทยานขุนแจ จ.เชียงราย อุทยานแห่งชาติภูเรือ จ.เลย ภูหลวง จ.เลย
- สะแกราช จ.นครราชสีมา
- ดอยภูฟ้า จ.น่าน

1.2. กลุ่ม A1-ii คือ กบห้วยขาปุ่มเหนือที่ทำการเก็บตัวอย่างมาจากภาคเหนือ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

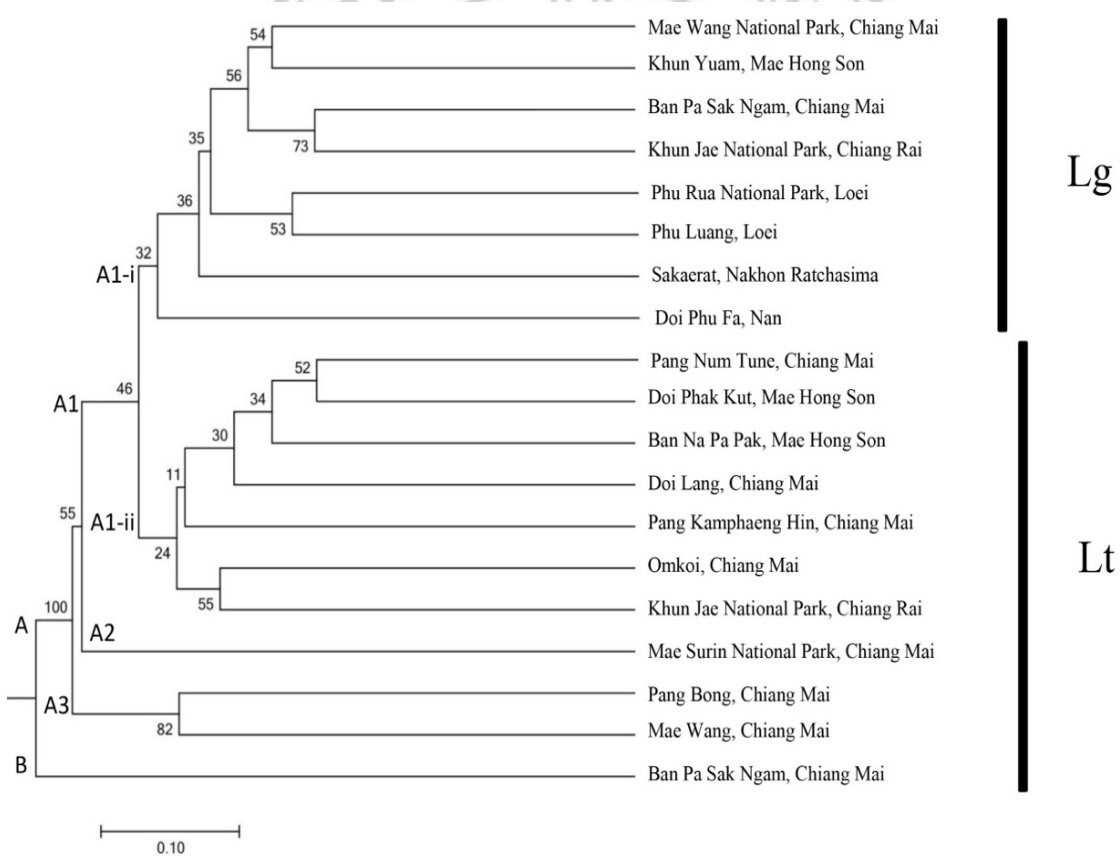
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปางน้ำฉุ จ.เชียงใหม่ ดอยผักกูด จ.แม่ฮ่องสอน บ้านนาป่าแปก จ.แม่ฮ่องสอน ดอยลาง จ.เชียงใหม่ ปางกำแพงหิน จ.เชียงใหม่
- อมก๋อย จ.เชียงใหม่และอุทยานขุนแจ จ.เชียงราย

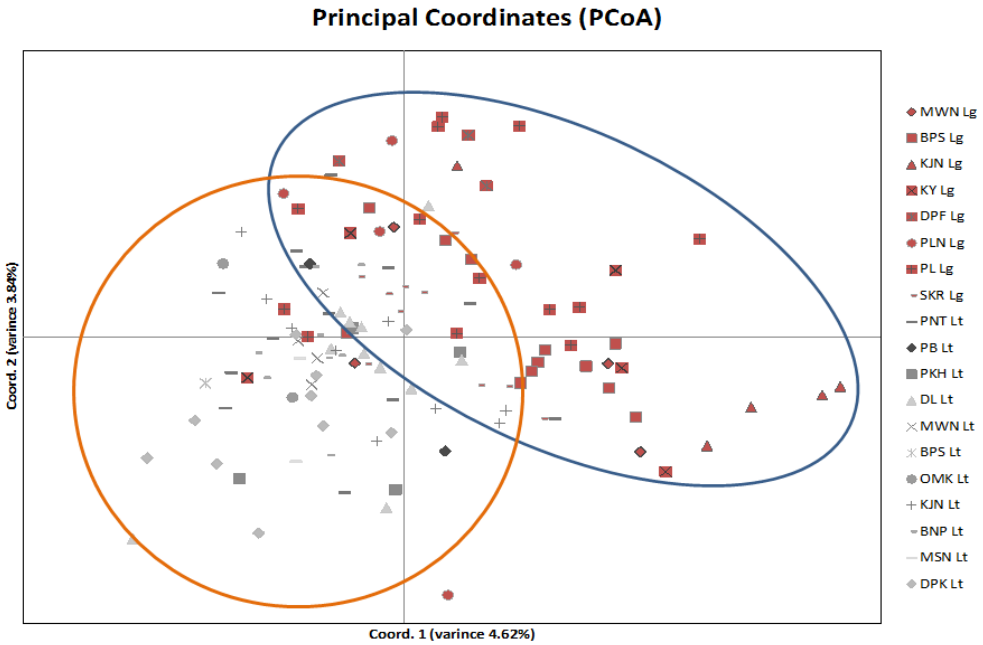
2 .กลุ่ม A2 คือ อุทยานแห่งชาติแม่สุรินทร์ จ.เชียงใหม่

3.กลุ่ม A3 คือ ปางบงและอุทยานแห่งชาติแม่วาง จ.เชียงใหม่

กลุ่ม B คือ กบห้วยขาปุ่มเหนือที่ทำการเก็บจาก บ้านป่าสักงาม จ.เชียงใหม่




ภาพที่ 4.8 แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method Using Arithmatic Averages (UPGMA) ของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ (Lg หมายถึง *Limnonectes gyldenstolpei* และ Lt หมายถึง *Limnonectes taylori*)




ภาพที่ 4.9 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี principal coordinate analysis (PCoA) ของกบหงอน (*L. gyldenstopei*) และกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori*) กลุ่มประชากรของกบหงอน (วงสีฟ้า) และกบห้วยขาปุ่มเหนือ (วงสีส้ม)

3.การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน Principal Coordinate Analysis (PCoA)

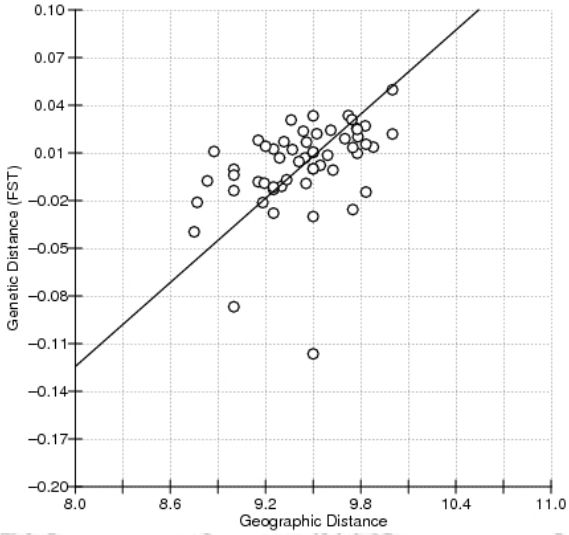
จากการวิเคราะห์พบว่าค่าความแปรปรวนขององค์ประกอบแกนหลัก (PC) สามแกนแรกอธิบายความแปรปรวนรวมกันได้ 11.79% ของความแปรปรวนทั้งหมด โดยที่แกนองค์ประกอบแกนหลักที่ 1 (PC1) และแกนองค์ประกอบแกนหลักที่ 2 (PC2) อธิบายความแปรปรวนได้ 4.62% และ 3.84% ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูล PC1 และ PC2 ของตัวอย่างทั้ง 123 ตัวอย่างมาสร้างกราฟการกระจายตัวพบว่ากลุ่มประชากรของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือแยกออกเป็นสองชนิดแต่มีบางตัวอย่างที่กระจายตัวปนกันอยู่ (ภาพที่ 4.9)

4.การวิเคราะห์ข้อมูลหาความสัมพันธ์ของระยะห่างทางพันธุกรรมเทียบกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์

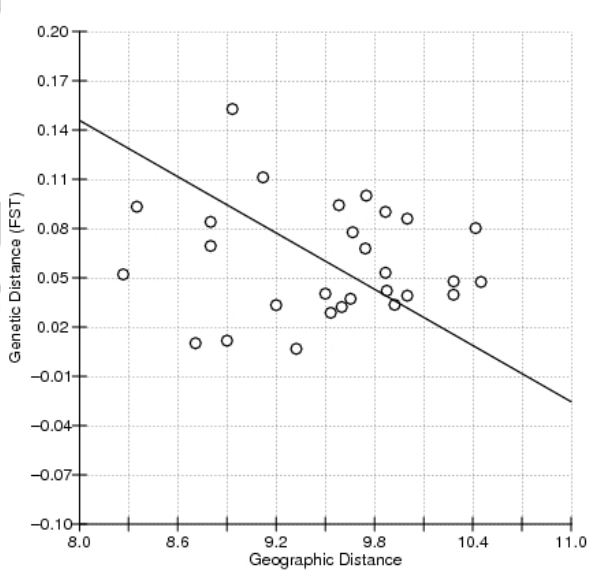
จากการหาความสัมพันธ์ของระยะห่างทางพันธุกรรมเทียบกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ โดยใช้โปรแกรม Isolation By Distance Web Service version 3.23 (IBD) จากทฤษฎีการวิเคราะห์ค่า IBD ค่า $p < 0.01$ หมายถึงข้อมูลมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลจาก ISSR กบห้วยขาปุ่มเหนือให้ค่า $p = 0.0020$ แสดงว่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมของกบห้วยขาปุ่มเหนือมีความสัมพันธ์กับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (ภาพที่ 4.10) กบหงอนให้ค่า $p = 0.6330$ แสดงว่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมของกบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หงอนไม่มีความสัมพันธ์กับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (ภาพที่ 4.11) และจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Tyrosinase พบว่า กบห้วยขาปุ่มเหนือให้ค่า p = 0.3760 แสดงว่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมของกบห้วยขาปุ่มเหนือไม่มีความสัมพันธ์กับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (ภาพที่ 4.12)

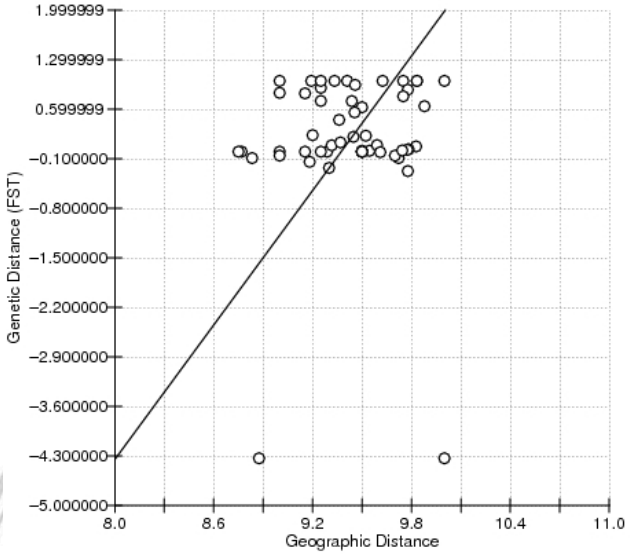



ภาพที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์การกระจายตัวของกลุ่มประชากรกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori*) จากข้อมูล ISSR ของค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยคำนวณเป็นค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (Fst) เทียบกับค่าระยะห่างทางภูมิศาสตร์โดยค่า p = 0.0020




ภาพที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์การกระจายตัวของกลุ่มประชากรกบหงอน (*L. gyldenstopei*) จากข้อมูล ISSR ของค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยคำนวณเป็นค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (Fst) เทียบกับค่าระยะห่างทางภูมิศาสตร์โดยค่า p = 0.6330

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




ภาพที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์การกระจายตัวของกลุ่มประชากรกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori*) จากข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ ยีน Tyrosinase ของค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยคำนวณเป็นค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (Fst) เทียบกับค่าระยะห่างทางภูมิศาสตร์โดยค่า p = 0.3760

5. การแปลงผลข้อมูลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค ISSR

โดยปรากฏแถบให้เป็น 1 ไม่ปรากฏเป็น 0 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม Phylip 3.69 สร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) มาหาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในแต่ละหน่วยศึกษาโดยใช้โปรแกรม MEGA version 7

1. แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) จากข้อมูล ISSR

การวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbour-joining โดยทดสอบค่า bootstrap 1,000 รอบ พบว่า แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กบห้วยขาปุ่มเหนือ *L. taylori* และกบหงอน *L. gyldenstopei* แต่มีตัวอย่าง 027 (*L. taylori*), 110 (*L. gyldenstopei*) และ112 (*L. gyldenstopei*) ไม่เป็นไปตามลักษณะสัณฐานวิทยาดังภาพที่ 4.13 และภาพที่ 4.14 กบทั้งสองชนิดมีความหลากหลายในกลุ่มประชากรมากเมื่อศึกษาประกอบกับพื้นที่เก็บแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับพื้นที่เก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในกลุ่มของกบห้วยขาปุ่มเหนือที่พบในจังหวัดเชียงใหม่จะเห็นได้ว่ามีการจัดกลุ่มอยู่ในกิ่งของแผนผังวิวัฒนาการเดียวกันเป็นกลุ่มใหญ่ ได้แก่ตัวอย่าง 021, 022, 024, 025, 020, 029, 015, 023, 016, 017, 009, 010, 008, 018, 019, 012, 013, 014, 026, 028, 030 และ 031 ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจาก ดอยลาง (ความสูง 1950 เมตร) อุทยานแห่งชาติแม่วาง (ความสูง 678 เมตร) ปางบง (ความสูง 888 เมตร) ปางกำแพงหิน (ความสูง 1067) ปางน้ำฉุ (ความสูง 968) มีระยะห่างพันธุกรรมในกลุ่มประชากรอยู่ระหว่าง 0.004 ถึง 0.045 และกบห้วยขาปุ่มเหนือที่พบในจังหวัดแม่ฮ่องสอนได้มีการจัดกลุ่มอยู่ในกิ่งของแผนผังวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันได้แก่ตัวอย่าง 063, 064, 037, 039, 042, 044, 038, 040, 041, 048, 050, 035, 045, 049 และ 046 ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจาก อุทยานน้ำตกแม่สุรินทร์ (ความสูง 396 เมตร) บ้านนาป่าแปก (ความสูง 982) และดอยผักกูด (ความสูง 1423) แต่มีการจัดกลุ่มได้ไม่ชัดเจนนักยังมีกบห้วยขาปุ่มเหนือที่เก็บมาจากจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่เข้ามาแทรกอยู่ระหว่างกลุ่มบางตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่าง 058, 059, 060, 061, 052, 053, 011, 033, 047 (ดอยผักกูด จังหวัดแม่ฮ่องสอน (ความสูง 1423)), 007, 002, 055, 056, 057, 032, 034, 036 (บ้านนาป่าแปก จังหวัดแม่ฮ่องสอน (ความสูง 982)) ,043 (ดอยผักกูด จังหวัดแม่ฮ่องสอน (ความสูง 1423), 006, 062, 054 และ 051 ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดเชียงราย ได้แก่ อุทยานขุนแจ (ความสูง 592) และจากจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ อมก๋อย (ความสูง 460) ปางน้ำฉุ (ความสูง 968) ดอยลาง (ความสูง 1950 เมตร) และอุทยานแห่งชาติแม่วาง (ความสูง 678 เมตร) (ภาพที่ 4.14) และมีค่าระยะห่างพันธุกรรมในกลุ่มประชากรอยู่ 0.0000 ถึง 2.5852 (ตารางที่ 4.8)

ในกลุ่มของกบหงอนจากภาพที่ 4.14 จะเห็นได้ว่ากบหงอนในแต่ละพื้นที่จังหวัดที่เก็บมาจะมีการกระจายตัวแทรกกันอยู่ทั้ง 6 จังหวัดแสดงในเห็นลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันได้แก่ ตัวอย่าง 080, 106, 107, 103, 105, 119, 116, 118, 115, 120, 096, 095, 067, 085, 090, 087, 088, 089, 075, 072, 073, 094, 070, 071,065, 069, 097, 098, 081, 076, 077, 084, 074, 068, 093, 092, 177, 066, 114, 113, 122, 121, 082, 083,079, 108, 104, 109, 111, 086, 099, 078, 091, 123, 101, 100,102 ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ อุทยานแห่งชาติแม่วาง (ความสูง 678 เมตร) และ บ้านป่าสักงาม (ความสูง 402) ตัวอย่างเก็บมา อุทยานขุนแจจังหวัดเชียงราย (ความสูง 592) ตัวอย่างเก็บมาจากขุนยวมจังหวัดแม่ฮ่องสอน (ความสูง 673) ตัวอย่างเก็บมาจากดอยภูฟ้าจังหวัดน่าน (ความสูง 665) ตัวอย่างเก็บมาจากจังหวัดเลยได้แก่ อุทยานแห่งชาติภูเรือ (ความสูง 939) และภูหลวง (ความสูง 865) และตัวอย่างเก็บมาจากสะแกราช จังหวัดนครราชสีมา (ความสูง 865) เรียงลำดับตามระยะห่างพันธุกรรมในแผนผังวิวัฒนาการ การกระจายตัวของกลุ่มประชากรทั้งภาคเหนือและภาคอิสานมีระยะห่างพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.2836 ถึง 1.2603 (ตารางที่ 4.7) มีความใกล้เคียงกันมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ยีน Tyrosinase (เฉพาะกบห้วยขาปุ่มเหนือ)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกบห้วยขาปุ่มเหนือบริเวณตำแหน่งยีน Tyrosinase มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการในกบสกุล *Limnonectes* ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่4.6) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างที่ศึกษามาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลและทำการตัดให้มีขนาดความยาวของนิวคลีโอไทด์ให้เท่ากัน (ภาคผนวก) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ Phylogenetic tree ทดสอบ Bootsrap 1,000 รอบ พบว่าผลที่ได้จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีMaximum likelihood (ภาพที่ 4.15) และวิธี Neighbour-joining (ภาพที่ 4.16) แสดงให้เห็นแผนผังวิวัฒนาการที่เหมือนกัน สามารถแยกกบห้วยขาปุ่มเหนือแต่ละตัวอย่างได้อย่างชัดเจน จะเห็นได้ว่ากบห้วยขาปุ่มเหนือที่เก็บมาแต่ละจังหวัดจะมีการจัดกลุ่มโดยมีระยะห่างพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันได้แก่ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่าง 59, 60, 61, 58, 57, 56, 55 และ54 ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจาก อุทยานขุนแจจังหวัดเชียงราย กลุ่มที่ 2 มีระยะห่างพันธุกรรมใกล้เคียงถัดจากกลุ่มที่ 1 ได้แก่ตัวอย่าง 53, 52 และ51 ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจาก อมก๋อยและบ้านป่าสักงาม จังหวัดเชียงใหม่ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42 และ 41 ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากดอยผักกูดจังหวัดแม่ฮ่องสอน กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ตัวอย่าง 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 09, 08, 07, 06, 05, 04, 03, 01 และ 02 ซึ่งเก็บตัวยอย่างมาจากอุทยานแห่งชาติแม่วาง ดอยลาง ปางกำแพงหิน ปางบง และปางน้ำฉุจังหวัดเชียงใหม่ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 35, 36, 37, 38, 39, 40 63 และ 64 ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจาก บ้านนาป่าแปกและอุทยานน้ำตกแม่สุรินทร์จังหวัดแม่ฮ่องสอน จากภาพที่ 4.15 และภาพที่ 4.16 จะเห็นได้ว่ามีบางตัวอย่างที่มีความแตกต่างแยกอยู่ในกิ่งเดี่ยว ได้แก่ตัวอย่าง 50 ซึ่งเก็บตัวอย่างจากดอยผักกูดจังหวัดแม่ฮ่องสอนและ 21ซึ่งเก็บตัวอย่างจากดอยลางจังหวัดเชียงใหม่ซึ่งทุกตัวอย่างที่กล่าวมาก่อนหน้านี้จะมีระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *L. kuhlii* (GU934461.1) จากฐานข้อมูล (GeneBank) และตัวอย่าง 62 ที่เก็บตัวอย่างมาจากอุทยานขุนแจได้แยกออกไปอยู่อีกกลุ่มที่มีระยะห่างพันธุกรรมใกล้เคียงกับกบในสกุล *Limnonectes* ที่นำมาจากฐานข้อมูล *L.doriae* (GU934458.1) และ *L.dabanus* (GU934457.1) โดยแผนผังวิวัฒนาการนี้มีระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 0.000 ถึง 1.211 และมีลักษณะแผนภูมิที่คล้ายคลึงกับ Phylogenetic tree จากข้อมูล ISSR (ภาพที่ 4.13 และภาพที่ 4.14)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.6 แสดง accession ของยีน Tyrosinase ในกบสกุล *Limnonectes* และสถานที่เก็บตัวอย่าง ข้อมูลจาก GenBank

| GenBank accession | Species | Locality |
|---|---|---|
| GU934461.1 | *L. kuhlii* | Thailand, Prachuap Kirikan Prov., Huay Yang National Park, 11°43'N 99°36'E |
| GU934456.1 | *L.blythii* | Thailand, Prachuap Kirikan Prov., Huay Yang National Park, 11°43'N 99°36'E |
| GU934457.1 | *L.dabanus* | Cambodia, Mondolkiri Prov., Pichrada Dist., Phnom Nam Lyr Wildlife Sanctuary, 12°32'N 107°32'E |
| GU934458.1 | *L.doriae* | Myanmar, Pegu State, Bago Yoma, 18°49'N 96°05'E |

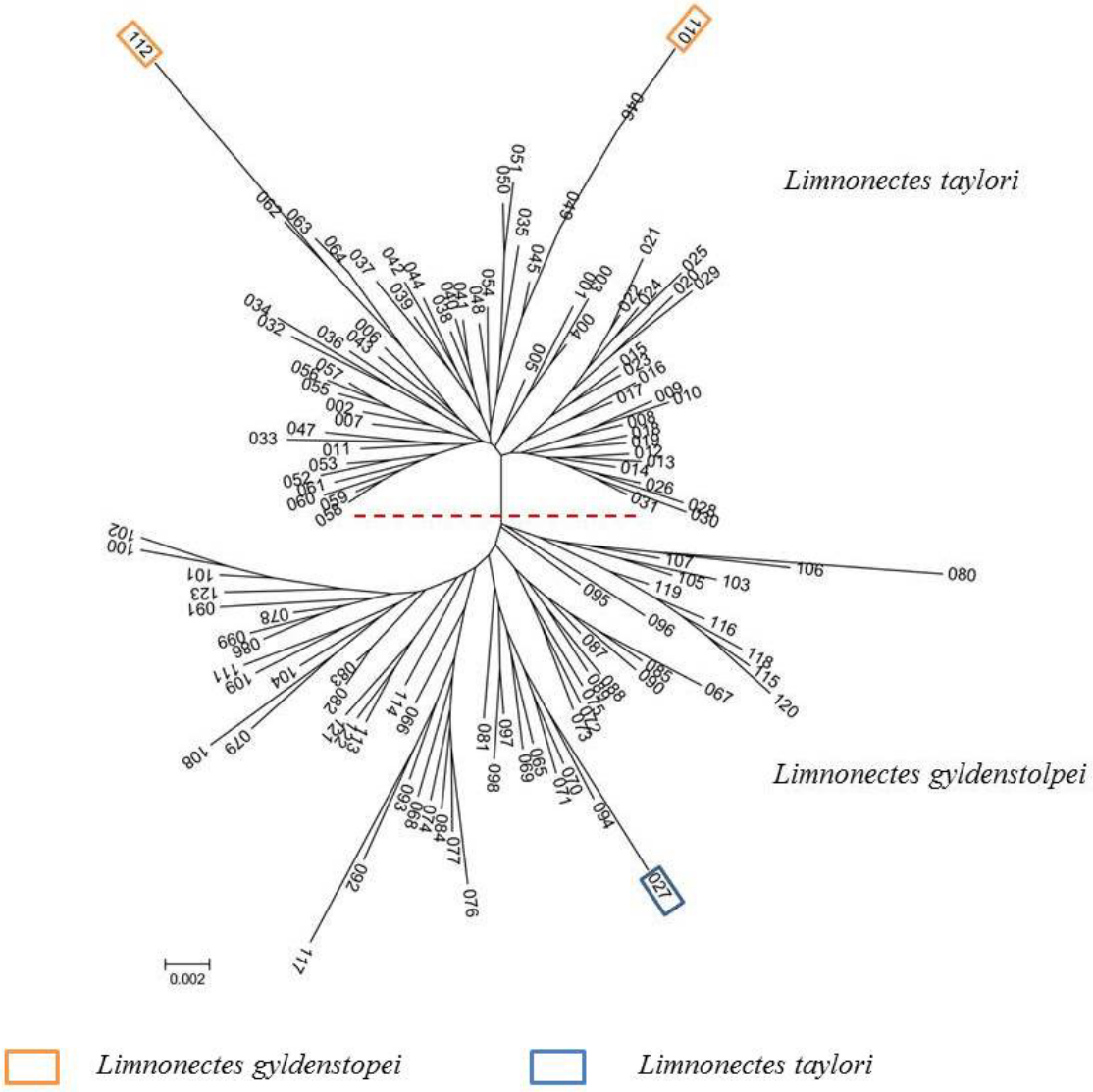
ตารางที่ 4.7 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ISSR ภายในกลุ่มประชากรของกบหงอน

| กลุ่มประชากร | MWN | BPS | KJ | KY | DPF | PRN | PL | SKR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MWN | **** | 0.6552 | 0.4405 | 0.5890 | 0.2836 | 0.4515 | 0.4058 | 0.3397 |
| BPS | 0.4228 | **** | 0.6377 | 0.5459 | 0.3727 | 0.3258 | 0.4838 | 0.4390 |
| KJ | 0.8198 | 0.4499 | **** | 0.4765 | 0.3392 | 0.3475 | 0.5264 | 0.3023 |
| KY | 0.5294 | 0.6054 | 0.7412 | **** | 0.3216 | 0.4744 | 0.5037 | 0.3554 |
| DPF | 1.2603 | 0.9869 | 1.0812 | 1.1343 | **** | 0.3189 | 0.4301 | 0.2901 |
| PRN | 0.7953 | 1.1216 | 1.0570 | 0.7458 | 1.1429 | **** | 0.6801 | 0.3233 |
| PL | 0.9019 | 0.7260 | 0.6417 | 0.6859 | 0.8438 | 0.3855 | **** | 0.4397 |
| SKR | 1.0798 | 0.8233 | 1.1962 | 1.0346 | 1.2376 | 1.1293 | 0.8217 | **** |

ตารางที่ 4.8 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ISSR ภายในกลุ่มประชากรของกบห้วยขาปุ่มเหนือ

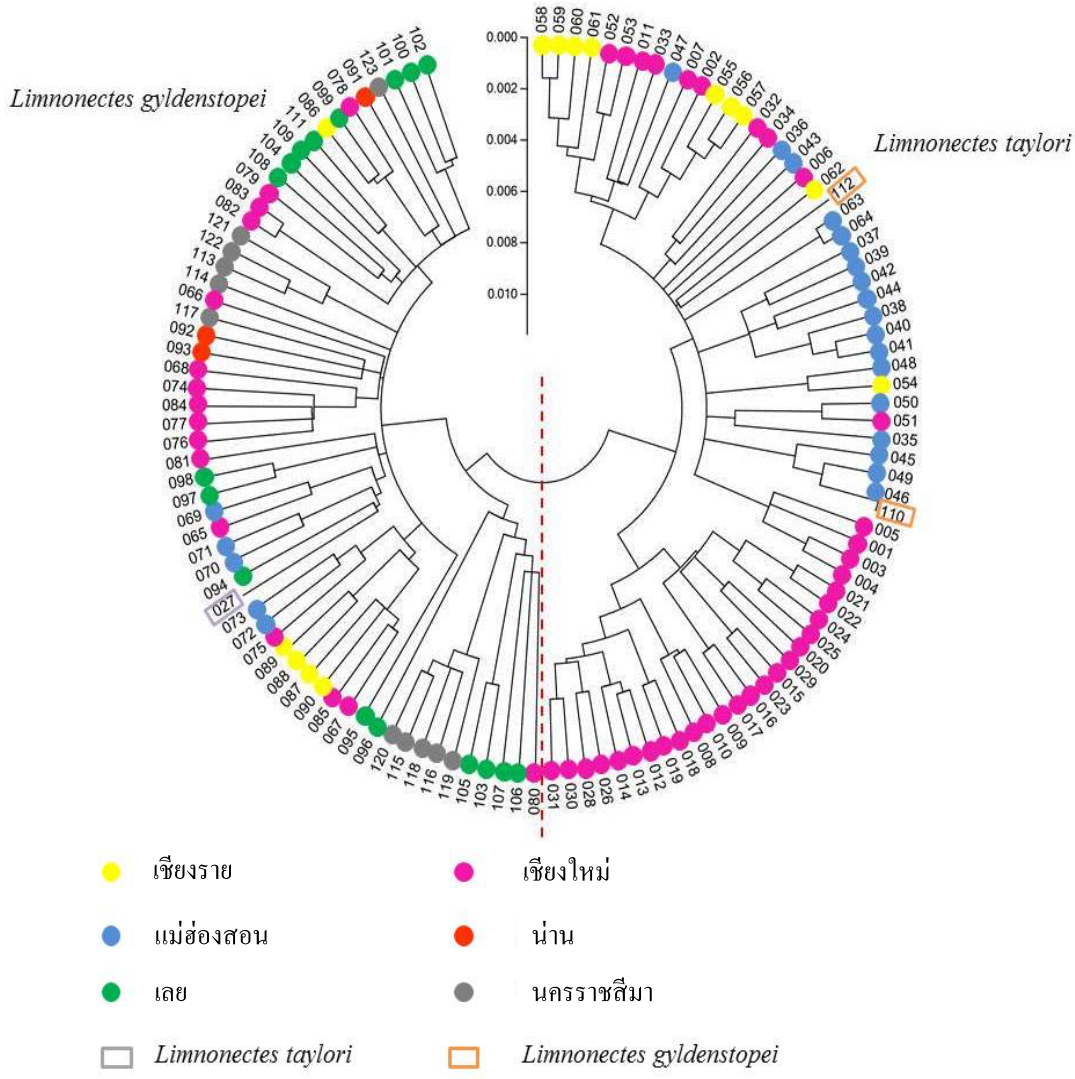
| กลุ่มประชากร | PNT | PB | PKH | DL | MWN | BPS | OMK | KJ | BNP | MSN | DPK |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PNT | **** | 0.2187 | 0.3844 | 0.4677 | 0.3144 | 0.2819 | 0.3566 | 0.4550 | 0.4930 | 0.2876 | 0.5235 |
| PB | 1.5200 | **** | 0.1072 | 0.1686 | 0.2772 | 0.0000 | 0.0870 | 0.1059 | 0.1053 | 0.0000 | 0.1629 |
| PKH | 0.9560 | 2.2330 | **** | 0.2660 | 0.1660 | 0.0000 | 0.2520 | 0.2628 | 0.2844 | 0.1762 | 0.4046 |
| DL | 0.7598 | 1.7803 | 1.3242 | **** | 0.2800 | 0.2296 | 0.2152 | 0.2491 | 0.3058 | 0.2620 | 0.3745 |
| MWN | 1.1570 | 1.2830 | 1.7956 | 1.2730 | **** | 0.1159 | 0.1198 | 0.1666 | 0.1739 | 0.1047 | 0.2370 |
| BPS | 1.2662 | 0.0000 | 0.0000 | 1.4714 | 2.1551 | **** | 0.0754 | 0.0786 | 0.1094 | 0.0791 | 0.2032 |
| OMK | 1.0311 | 2.4414 | 1.3785 | 1.5361 | 2.1219 | 2.5852 | **** | 0.3635 | 0.2639 | 0.1430 | 0.3846 |
| KJ | 0.7874 | 2.2451 | 1.3364 | 1.3900 | 1.7920 | 2.5431 | 1.0120 | **** | 0.2752 | 0.3315 | 0.3361 |
| BNP | 0.7073 | 2.2512 | 1.2573 | 1.1848 | 1.7494 | 2.2128 | 1.3323 | 1.2901 | **** | 0.2998 | 0.4050 |
| MSN | 1.2461 | 0.0000 | 1.7363 | 1.3393 | 2.2565 | 2.5376 | 1.9448 | 1.1041 | 1.2046 | **** | 0.3427 |
| DPK | 0.6473 | 1.8144 | 0.9050 | 0.9823 | 1.4398 | 1.5936 | 0.9556 | 1.0905 | 0.9037 | 1.0710 | **** |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



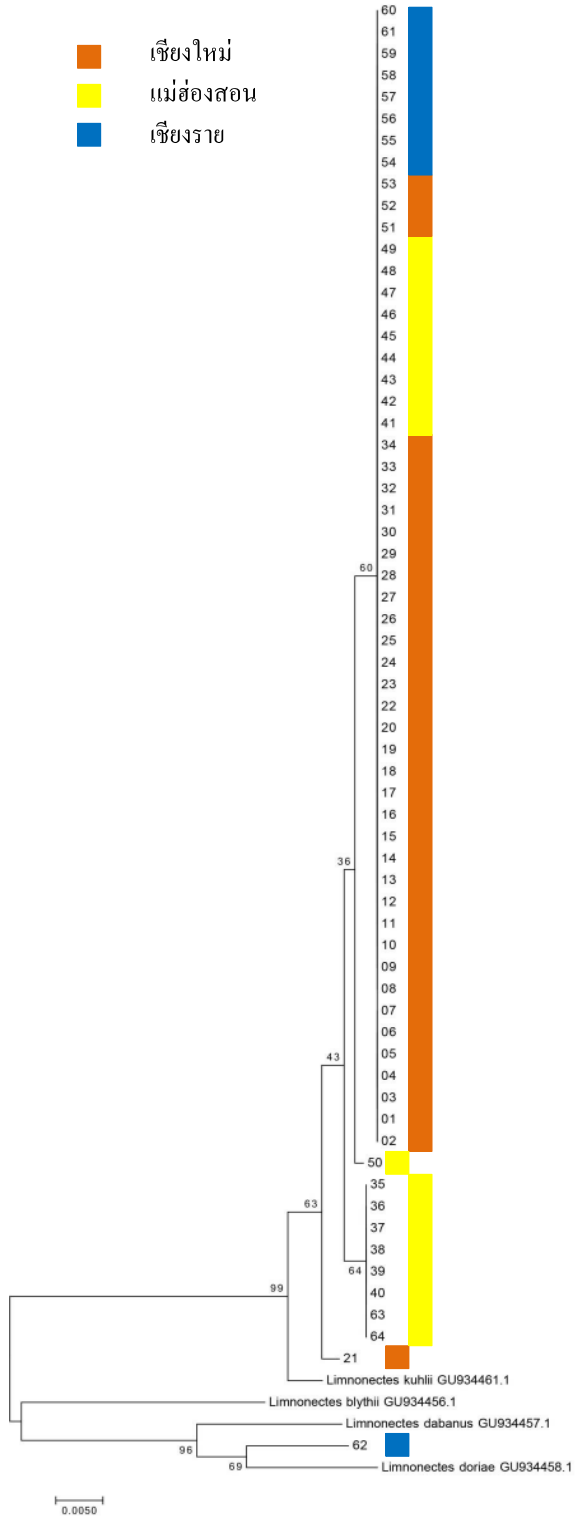

All rights reserved

ภาพที่ 4.13 แผนภูมิก้างปลาแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกบหงอน *Limnonectes gyldenstopei* และกบห้วยขาปุ่มเหนือ *Limnonectes taylori* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน

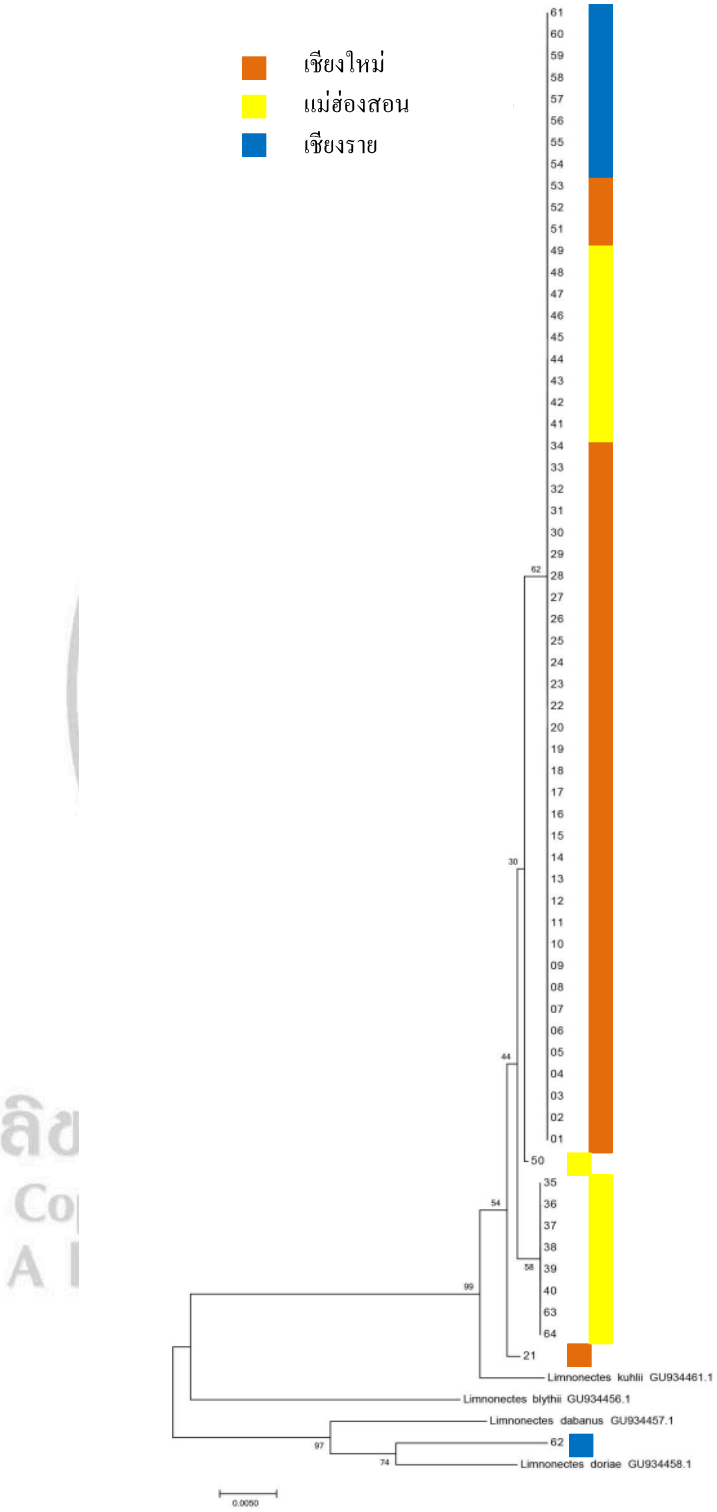



ภาพที่ 4.14 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกบหงอน *Limnonectes gyldenstopei* และกบห้วยขาปุ่มเหนือ *Limnonectes taylori* ในแต่ละจังหวัดด้วยวิธี Neighbour-joining โดยทดสอบค่า bootstrap 1,000 รอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




ภาพที่ 4.15 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกบห้วยขาปุ่มเหนือ *Limnonectes taylori* และกบสกุล *Limnonectes* ตรงบริเวณตำแหน่งยีน Tyrosinase ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยทดสอบค่า bootstrap 1,000 รอบ




ภาพที่ 4.16 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกบห้วยขาปุ่มเหนือ *Limnonectes taylori* และกบสกุล *Limnonectes* ตรงบริเวณตำแหน่งยีน Tyrosinase ด้วยวิธี Neighbour-joining โดยทดสอบค่า bootstrap 1,000 รอบ