

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาเก็บตัวอย่างกบหางอนและกบหัวขาปุ่มเหนือในเขตภาคเหนือและภาคอีสาน ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ *Limnonectes kuhlii* complex ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความคลุมเครืออย่างมากในการจัดจำแนกรวมทั้งกบหางอน (*Limnonectes gyldenstolpei*) ที่มักจะพบบริเวณหนองน้ำบริเวณดินเขา และกบหัวขาปุ่มเหนือ (*Limnonectes taylori*) จะพบบริเวณลำห้วยน้ำไหลบนภูเขา (Aowphol et al., 2015; Marmayou et al., 2000; Matsui et al., 2010; McLeod, 2010) ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นอยู่ในระยะ juvenile มีลักษณะทางสัณฐานที่ในส่วนหลังและลวดลายคล้ายคลึงกัน นำไปสู่การศึกษา ลักษณะทางอนุชีววิทยาและทำการอภิปราย

5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ ISSR ที่นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการศึกษา

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่นำมาศึกษาทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ของชุดไพรเมอร์ที่นำมาศึกษา ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 96 แถบซึ่งมีลักษณะเป็น Polymorphic band ทั้งหมดคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ Polymorphism ซึ่งสามารถจำแนกกบหางอนและกบหัวขาปุ่มเหนือออกเป็นสองกลุ่มแต่มี 3 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษากับตัวอย่างทั้งหมด 123 ตัวอย่างคิดเป็น 97.57 เปอร์เซ็นต์ที่สามารถจำแนกได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของชุดไพรเมอร์ที่ศึกษาสามารถจำแนกกบสองชนิดนี้ได้และมีลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบดีเอ็นเอเฉพาะชนิด (specific species) หรือเรียกว่า Monomorphic band จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทุกตัวอย่างศึกษา ในกบหางอนจะพบที่ไพรเมอร์ UBC811 และกบหัวขาปุ่มเหนือจะพบที่ไพรเมอร์ UBC824 สามารถระบุชนิดของกบทั้งสองชนิดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และพบการศึกษาหลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกันในไหม (*Bombyx mori* L.) ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ UBC812, UBC813, UBC826 และ UBC827 พบว่ามีสองไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ คือ UBC812 ให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอแบบ Polymorphic ทั้งหมด จำนวน 42 แถบ และ UBC826 ให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอแบบ Monomorphic จำนวน 18 แถบและลักษณะ Polymorphic จำนวน 28 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ Polymorphism เท่ากับ 60.86 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสามารถจัดจำแนกชนิดของหนอนได้ (Bakkappa and Gopal, 2014) และยังมี การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของกบ *Physalaemus cuvieri* ด้วยเทคนิค

ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ (GGAC)₃A (GGAC)₃C (GGAC)₃T และ (GGAC)₄ พบว่าทุกไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 65 แถบ มีลักษณะแบบ Polymorphic จำนวน 58 แถบด้วยกัน โดยไพรเมอร์ (GGAC)₃A พบ Monomorphic 2 แถบ (GGAC)₃C พบ Monomorphic 2 แถบ (GGAC)₃T พบ Monomorphic 2 แถบ และ (GGAC)₄ พบ Monomorphic 1 แถบ คิดเป็น 89.23 เปอร์เซ็นต์ของ Polymorphic (Tonk et al., 2014) แสดงให้เห็นว่าความสามารถของไพรเมอร์ในการจัดจำแนกชนิดดูได้จากเปอร์เซ็นต์ Polymorphic อีกทั้งข้อมูลของลักษณะ Monomorphic ที่พบอาจจะนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการระบุชนิดเนื่องจากการศึกษาในส่วนของพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจะมีประโยชน์ต่อไปในการศึกษาด้านนิเวศวิทยาของกบในอนาคตอย่างมาก โดยเฉพาะระยะ juvenile ของกบที่ยากต่อการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตัวอย่างในการพัฒนาไพรเมอร์ เช่น ในการศึกษาปลาสิงโต (*Pterois volitans*) ได้เลือกใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยส่วนใหญ่ให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอแบบ Polymorphic คิดเป็น 83.5 เปอร์เซ็นต์และพบแถบดีเอ็นเอ specific species ในปลาสิงโต (Labastida et al., 2015) และยังมีการศึกษาโครงสร้างกลุ่มประชากรและลักษณะทางพันธุกรรมของปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*) โดยใช้เทคนิค RAPD, ISSR และ SCAR marker เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งรูปแบบของอัลลีลที่พบจากการใช้เทคนิค RAPD และ ISSR มีลักษณะเหมือนกันและนำรูปแบบที่จำเพาะต่อปลากดเหลืองมาพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SCAR marker เพื่อใช้ในการจำแนกเฉพาะปลากดเหลืองต่อไป (Kumla et al., 2012)

5.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบหางอนและกบหัวขาปุ่มเหนือ

จากการทดสอบค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยวิธี similarity coefficient ranged (AMOVA) พบว่าเปอร์เซ็นต์ค่าความแปรปรวนของกบหางอนและกบหัวขาปุ่มเหนือมีความแปรปรวนภายในกลุ่มประชากรสูงซึ่งหมายความว่าในแต่ละหน่วยศึกษามีความแปรผันสูงทำให้มีความแตกต่างกันมากแต่ระหว่างกลุ่มประชากรยังมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย คล้ายคลึงกับการศึกษาในปลาสิงโต (*Pterois volitans*) โดยใช้เทคนิค ISSR ให้ผลค่าความแปรปรวน (AMOVA) ภายในกลุ่มประชากร 98 เปอร์เซ็นต์และระยะห่างพันธุกรรมที่ต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายที่ต่ำ (Labastida et al., 2015)

การศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรในกบหางอนและกบหัวขาปุ่มเหนือ โดยวิธี Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) แสดงลักษณะแผนผังวิวัฒนาการที่แยกกบทั้งสองชนิดออกจากกันชัดเจนและกลุ่มประชากรจะมีระยะห่างทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับความสูงของพื้นที่เก็บตัวอย่างกล่าวคือกลุ่มประชากรที่ทำการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่มีความสูงในระดับเดียวกันหรือใกล้เคียงกันจะมีระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันเช่นเดียวกับ

การศึกษาในกลุ่มประชากรยุงลาย *Aedes aegypti* ทางตอนเหนือของประเทศเม็กซิโก โดยใช้วิธี random amplified polymorphic (RAPD) และไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ พบว่ากลุ่มประชากรที่จัดจำแนกโดยใช้วิธี UPGMA มีความสัมพันธ์กับระดับความสูงของพื้นที่ที่อยู่อาศัย (Gorrochotegui-Escalante et al., 2000) แต่กลุ่มประชากรกบหัวขาป้อมเหนือในพื้นที่บ้านป่าสักงาม จังหวัดเชียงใหม่ได้แยกกลุ่มออกจากกบหงอนและกบหัวขาป้อมเหนืออื่นนี้อาจเป็นเพราะว่าตัวอย่างที่ทำการเก็บมามีเพียงตัวอย่างเดียว ทำให้จำนวนซ้ำในการเปรียบเทียบการทดลองไม่เท่ากันและเกิดความแตกต่างในการวิเคราะห์ข้อมูลของโปรแกรม เมื่อพิจารณาข้อมูลการเก็บตัวอย่างของงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าแต่ละพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างจะได้จำนวนตัวอย่างแต่ละพื้นที่ไม่เท่ากันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Askari และคณะ ปี 2011 ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร แกะ แพะ และวัว ที่จังหวัดเคอร์มาน ประเทศอิหร่านด้วยเทคนิค ISSR เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พบว่าไพรเมอร์แต่ละไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ให้จำนวนอัลลีลได้น้อยและจำนวนตัวอย่างในกลุ่มประชากรมีผลต่อการวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งจะแสดงค่าให้ความหลากหลายที่น้อยเนื่องจากวิธี UPGMA จะเป็นการจับคู่ของตัวอย่างที่มีลักษณะเหมือนกันนั้นนำข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมมาสร้างไดอะแกรมโดยวิธี principal coordinate analysis (PCoA) เพื่อพิจารณาจำนวนกลุ่มประชากรย่อยในแต่ละกลุ่มประชากรหลักซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาโครงสร้างประชากร UPGMA คือการกระจายตัวของกบหงอนและกบหัวขาป้อมเหนือแบ่งออกเป็นสองชนิด แต่มีบางกลุ่มประชากรของกบทั้งสองชนิดที่กระจายตัวปนกันเพราะว่าระยะห่างทางพันธุกรรมของกบหงอนและกบหัวขาป้อมเหนือใกล้เคียงกันมากทำให้การแสดงกราฟในรูปแบบสองมิติ (ภาพที่ 4.5.4) แสดงให้เห็นว่ากบทั้งสองชนิดมีสายวิวัฒนาการที่เพิ่งแยกออกจากกัน ในการประมาณค่า Genetic distance ระหว่างกลุ่มประชากรจะมีค่าต่ำ หากอยู่ในสายพันธุ์เดียวกัน และจะมีค่าสูงมากในต่างสายพันธุ์ จึงทำให้มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน (Smiths et al., 1996) ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างกบสองชนิดในแต่ละกลุ่มประชากรได้เป็น 2 กลุ่ม จากทั้งหมด 19 กลุ่มประชากร

กบเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายสูง มีการกระจายตัวเป็นวงกว้าง แต่เนื่องด้วยวงจรชีวิตของกบนั้นมีเงื่อนไขหลายปัจจัยในการสืบพันธุ์เช่น ปริมาณแสงแดดและปริมาณน้ำฝนในถิ่นที่อยู่ (microhabitat) รวมทั้งเสียงร้อง ซึ่งความแตกต่างเพียงเล็กน้อยจะทำให้ไม่สามารถผสมพันธุ์กันเนื่องจากผิวหนังของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำจะตอบสนองต่อ microhabitat และมีความไวต่อการปรับตัว ซึ่งส่งต่อการย้ายถิ่นและการสูญพันธุ์ (Lips, 1998; Pounds et al., 1999) การเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศจะส่งต่อการสืบพันธุ์ทำให้มีผลต่อการวิวัฒนาการในเวลาอันรวดเร็ว (Gray and McKinnon, 2007; Orr and Smith, 1998) ดังอาจถือได้ว่า microhabitat นั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะนำไปสู่การแยกหรือการเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (speciation) (Boughman, 2002) เพราะชีวิพิสัย (niche) เป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต เมื่อเกิดการกระจายที่มากขึ้นกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิตจะมีความ

หนาแน่นของประชากรสูงจะทำให้มีอัตราในการกลายพันธุ์สูงด้วย (Gavrilets et al., 2000) มีรายงานการศึกษาความแตกต่างในการร้องเพลงของนก *Andropadus virens* ที่พบในป่าฝน แอฟริกา พบว่าการกระจายตัวในแต่ละพื้นที่ (microhabitat) มีเสียงร้องทางกายภาพที่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยสเปกตรัมแล้วพบว่ามีความแตกต่างของเสียงร้องเพียงเล็กน้อยจะมีผลต่อการจับคู่ของนก ผลของการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการเลือกที่อยู่อาศัยจะขึ้นอยู่กับระบบนิเวศที่เป็นตัวสำคัญอย่างมาก ทำให้เกิดการแยก prezygotic นำไปสู่ลักษณะพื้นฐานที่แตกต่างกัน ทำให้ต้องเลือกอยู่ใน microhabitat ที่เปลี่ยนแปลงไปเกิดการสะสมความเครียดในการปรับตัวจนไปถึงการปรับเปลี่ยนทางพันธุกรรมเพื่อความอยู่รอดทำให้สายวิวัฒนาการเริ่มแยกออกจากกันและไม่สามารถกลับมาผสมพันธุ์กันได้อีก (Slabbekoorn and Smith, 2002) หรืออย่างเช่นในการศึกษาแพรี่ด็อก (*Prairie Dog; Cynomys mexicanus*) ระหว่างสายพันธุ์ประจำถิ่นกับสายพันธุ์ที่ราบสูงเม็กซิกันซึ่งมีลักษณะทางพันธุฐานที่คล้ายกันมาก เมื่อทดสอบด้วย ecological niche models (ENMs) เมื่อตรวจสอบแล้วพบว่า สภาพภูมิอากาศเป็นปัจจัยที่สำคัญทำให้แพรี่ด็อกสองชนิดมีแยกสายวิวัฒนาการออกจากกันในสายวิวัฒนาการเมื่อไม่นานมานี้ ทำให้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการกระจายตัวเกิดเป็น parapatric speciation ขึ้น (Castellanos-Morales et al., 2016) ดังนั้นจากการทดลองนี้ได้วิเคราะห์ค่าความหลากหลายจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมนี้ได้แสดงให้เห็นว่ากบสองชนิดที่อยู่ในกลุ่ม *L. khulii* complex ที่มีถิ่นที่อยู่อาศัย (microhabitat) ที่ติดกัน ได้แสดงให้เห็นว่าสายวิวัฒนาการเพิกแยกออกจากกันเมื่อเทียบกับระยะห่างพันธุกรรมและค่าความหลากหลายของกลุ่มประชากรมีค่าที่สูงชี้ให้เห็นว่ากบสองชนิดนี้อาจมีการกระจายตัวแบบ parapatric

5.3 การศึกษาแผนผังความสัมพันธ์วิวัฒนาการของกบหงอนและกบหัวขาปุ่มเหนือจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR และจากยีน Tyrosinase

เนื่องจากการเก็บตัวอย่างเป็นระยะ juvenile ของกบหงอนและกบหัวขาปุ่มเหนือ ทั้ง 6 จังหวัด พบว่ามีลักษณะทางพันธุฐานของสัตว์และลายแถบเข้มบริเวณขาเป็นจุดคล้ายคลึงกันมาก ระหว่างกบสองชนิด จึงนำมาสู่การศึกษาทางด้านพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR พบว่าลักษณะของ Phylogenetic tree ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกบหงอน (*L. gyldenstolpei*) และกบหัวขาปุ่มเหนือ (*L. taylori*) ด้วยวิธี Neighbour-joining โดยทดสอบค่า bootstrap 1,000 รอบ มีบางตัวอย่าง (ตัวอย่าง 027 (*L. taylori*), 110 (*L. gyldenstolpei*) และ 112 (*L. gyldenstolpei*)) ไม่เป็นไปตามลักษณะทางพันธุฐาน อาจจะเป็นไปได้ 2 สาเหตุคือ

1. ตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียง 5 ไพรเมอร์จึงทำให้มีจำนวนลักษณะอัลลีลที่ใช้ในการจำแนกน้อย ถ้าทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมเพิ่มโดยการเพิ่มตำแหน่งไพรเมอร์มากขึ้น จำนวนอัลลีลในการศึกษาอาจจะให้ผลที่ชัดเจน จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้

ต่ำสุดคือ 30-50 แถบ เช่นจากการศึกษาการถ่ายเทยีนใน *Folsom candida* ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ 5 ไพรมเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอ 44 แถบสามารถวิเคราะห์ข้อมูลให้ผลจำแนกกลุ่มประชากรได้ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่สามารถนำมาวิเคราะห์ให้ได้ผลดีจะต้องมากกว่า 200 แถบ (Ng and Tan, 2015; Sullivan et al., 2009)

2. สาเหตุที่สองอาจทำให้การจัดจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานผิดพลาดในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมเพิ่มเติมในส่วนนิวคลีอัสดีเอ็นเอบนตำแหน่งยีน Tyrosinase ในกบหัวขาปุ่มเหนือ เพื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมกับด้วยเทคนิค ISSR แล้วพบว่า มีลักษณะสัณฐานที่คล้ายกันและตัวอย่าง 027 (*L. taylori*) ที่ทำการเก็บมาจาก อุทยานแห่งชาติดอยผ้าห่มปก จังหวัดเชียงใหม่ มีลักษณะสัณฐานที่อยู่ในกลุ่ม *L. taylori*

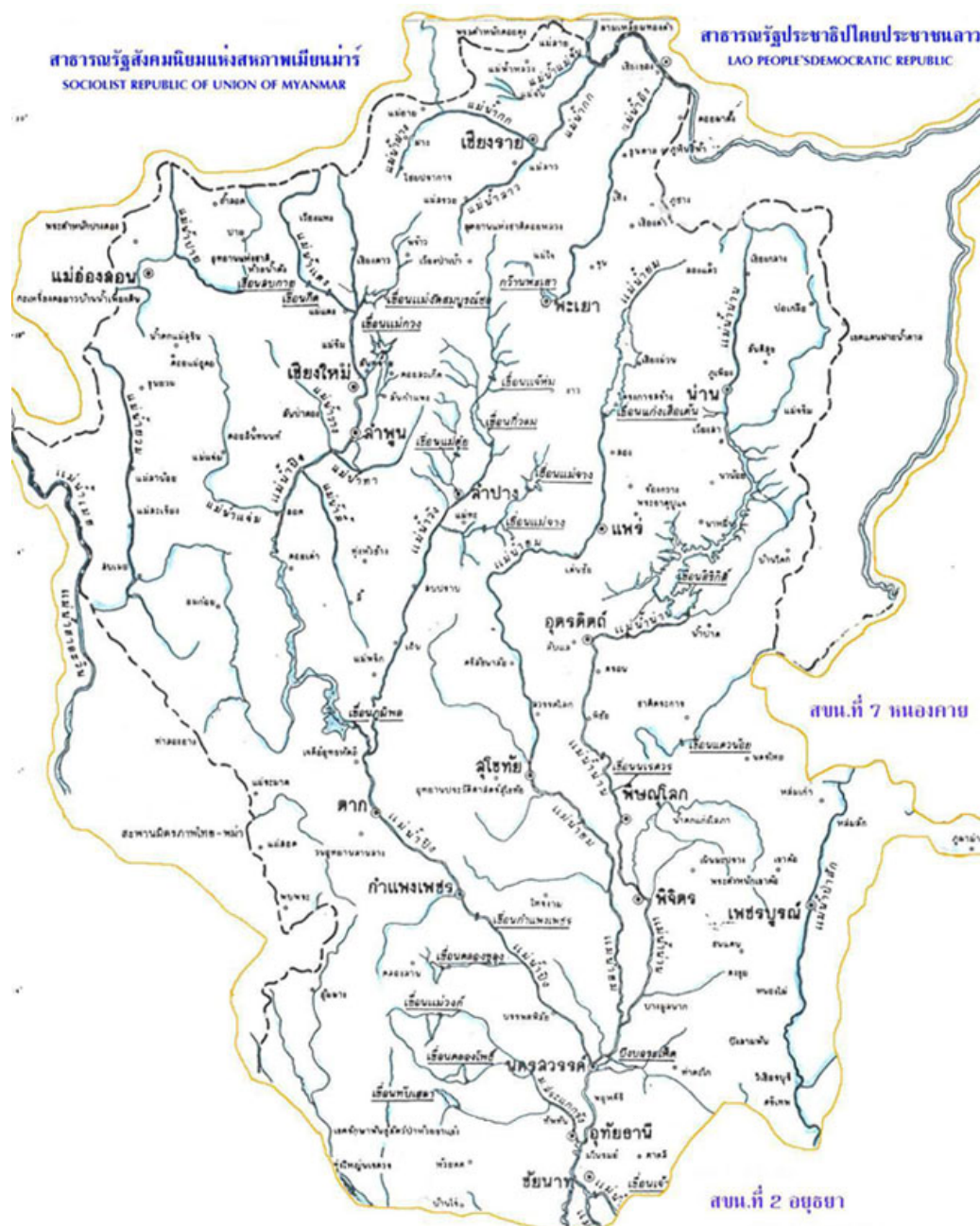
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าผลที่ได้จากข้อมูล ISSR นั้นสามารถจำแนกบสองชนิดนี้ได้อย่างชัดเจน และตัวอย่าง 027 (*L. taylori*), 110 (*L. gyldenstolpei*) และ 112 (*L. gyldenstolpei*) ที่ถูกจัดกลุ่มทาง phylogenetic tree ไม่เป็นไปตามสัณฐานวิทยาเพราะสาเหตุที่ 1 ตามข้อสันนิษฐาน เนื่องจากการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค ISSR เป็นลักษณะแบบข่มสมบูรณ์ (dominant marker) นั่นคือการปรากฏแถบดีเอ็นเอคืออัลลีล AA หรือ Aa และการไม่ปรากฏแถบคืออัลลีล aa แต่ต้องใช้วิธีการในแยกระหว่างอัลลีล AA และ Aa โดยวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังไม่สามารถหาอัลลีล aa ได้โดยตรง เนื่องจากการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย จึงทำให้เครื่องหมายประเภทนี้มีความแม่นยำน้อยกว่าเครื่องหมายข่มร่วม (co-dominant marker) (De Wolf et al., 1998) ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้จะใช้วิธีคำนวณความถี่อัลลีลโดยทางอ้อมตามวิธีการของ wright (1951) เนื่องจากค่า Heterozygosity ที่ได้ไม่ใช่ค่าที่แท้จริง จึงต้องคำนวณเป็นค่า Φ_{ST} จะคล้ายกับการคำนวณค่าความแปรปรวน F_{ST} ถ้าค่า Φ_{ST} สูงบ่งบอกถึงการแบ่งย่อยภายในกลุ่มประชากรมากขึ้น (Weir and Cockerham, 1984)

5.4 การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์และความสัมพันธ์ในกลุ่มประชากรของกบหางอนและกบหัวขาปุ่มเหนือ

จากการศึกษาการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ต่อระยะห่างทางพันธุกรรมจะเห็นได้ว่าผลข้อมูลจากการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการโดยวิธี UPGMA เป็นการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มประชากรและแผนภูมิวิวัฒนาการโดยวิธี Neighbour-joining เป็นการวิเคราะห์ในแต่ละตัว (individual) สามารถแยกกบออกได้เป็น 2 ชนิดอย่างชัดเจนและมีการจัดกลุ่มที่สัมพันธ์กับระดับความสูงของพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่าง แต่การวิเคราะห์ในระดับแต่ละตัวพบว่ามีเพียงกบหัวขาปุ่มเหนือมีการจัดกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับความสูงของพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่างซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ข้อมูลค่าระยะห่าง

ทางพันธุกรรมกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ (IBD) ที่มีความสัมพันธ์แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางภูมิศาสตร์มีความสัมพันธ์ต่อการจำแนก 2 ชนิดนี้ได้ เนื่องจากลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เป็นตัวขวางกั้น (barrier) ในการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่มประชากร จนทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป เช่นเดียวกับการศึกษาในหอยทากทะเลในเขตร้อนมหาสมุทรแอตแลนติกและมหาสมุทรแปซิฟิก ตะวันออกพบว่าเกิดการแยกชนิดในรูปแบบ allopatric ซึ่งลักษณะทางภูมิศาสตร์เป็นปัจจัยที่ขวางกั้นการถ่ายเทยีนระหว่างกลุ่มประชากร (Claremont et al., 2011) และอีกปัจจัยที่น่าจะเป็นตัวกั้นขวางการถ่ายเทยีนที่สำคัญคือ อุณหภูมิและสภาพภูมิอากาศซึ่งมีผลอย่างมากต่อการย้ายถิ่นและการวางไข่ของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำเนื่องจากมีผิวหนังที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศและน้ำอย่างมาก (Derovo et al., 2016) อีกทั้งพฤติกรรมของกบในวงศ์ Dicroglossidae จะอาศัยในระบบนิเวศพื้นที่ป่ามีสภาพเป็นป่าดิบแล้งและป่าดิบชื้น บางชนิดจะเลือกอาศัยในแหล่งน้ำไหลบางชนิดจะอาศัยในแหล่งน้ำนิ่ง (วุฒิ, 2553) เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ในระดับไมโทคอนเดรียของกบห้วยขาปุมเหนือที่ระยะห่างทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับระยะห่างทางภูมิศาสตร์นั้นอาจเป็นเพราะพฤติกรรมของกบห้วยขาปุมเหนือที่มักจะอาศัยบริเวณน้ำไหลแรงในป่าราบจนถึงป่าดิบเขาที่สูง แต่เวลาผสมพันธุ์ตัวผู้จะหาแหล่งน้ำเอื่อย ๆ ที่มีกองใบไม้ทับถมกันเมื่อวางไข่จะมีลักษณะเป็นสาย ไข่มีขนาดกลมใหญ่ มีเมือกห่อหุ้ม เมื่อเจริญเติบโตเป็นลูกอ๊อดจะใช้ปากเกาะบริเวณโขดหินที่แหล่งน้ำไหล (Matsui et al., 2010) จึงอาจจะสันนิษฐานได้ว่าปัจจัยที่ทำให้ยีนแต่ละกลุ่มประชากรถ่ายเทหากันเกิดจากร่องน้ำหรือแม่น้ำสายเดียวกัน ดังตัวอย่างจากการศึกษาผลกระทบของ แม่น้ำ Yangtze ต่อโครงสร้างลักษณะพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของ คั่น *Parrotia subaequalis* ด้วยเทคนิค ISSR ผลการศึกษาพบว่า การแยกทางภูมิศาสตร์มีผลต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ (Geng et al., 2015) เมื่อทำการศึกษาข้อมูลจากแผนที่ร่องน้ำและแม่น้ำจากกรมเจ้าท่า พบว่าลำน้ำหรือแม่น้ำจากพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่างในจังหวัดเชียงใหม่จะไหลมารวมกับแม่น้ำสายหลัก คือแม่น้ำปิง เช่นตัวอย่างที่เก็บจากแม่น้ำว้าง จังหวัดเชียงใหม่จะมีแม่น้ำแม่ว้างไหลมารวมกับแม่น้ำปิง (ภาพที่ 5.1) อาจจะทำให้เซลล์สืบพันธุ์หรือตัวอ่อนของกบไหลไปตามน้ำไปหากันได้ แต่การศึกษาด้วยยีน Tyrosinase ของกบห้วยขาปุมเหนือไม่มีความสัมพันธ์กับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ แสดงให้เห็นว่าจากข้อมูล ISSR ของกบห้วยขาปุมเหนือเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงยีนในระดับไมโทคอนเดรียแต่จากข้อมูลของยีน Tyrosinase แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของยีนในระดับนิวเคลียสนั้นยังไม่มี การเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA นั้นยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของกบทั้งสองชนิดคือกลุ่มจังหวัดที่อยู่ในระดับความสูงของพื้นที่เก็บตัวอย่างใกล้เคียงกันจะมีระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันอีกด้วย เช่น กบหงอนในพื้นที่ปางน้ำถุ จังหวัดเชียงใหม่ มีความสูงอยู่ที่ 968 เมตร กับกบห้วยขาปุมเหนือในพื้นที่ดอยภูฟ้า จังหวัดน่านที่มีความสูงอยู่ที่ 665 เมตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าข้อมูลนี้สามารถยืนยันกับผลการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายที่แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวของกบหงอนและกบห้วยขาปุมเหนือแบบ

parapatric เป็นรูปแบบที่มักจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมเป็นชนิดใหม่ได้ง่ายใน
ระยะเวลาอันสั้นและมีการอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่ติดกัน (Gorochotegui et al., 2000)



ภาพที่ 5.1 แสดงแผนที่ร่องน้ำและแม่น้ำในเขตพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานขนส่งทางน้ำส่วน
ภูมิภาค สำนักงานขนส่งทางน้ำที่ 1 เชียงใหม่ กรมเจ้าท่า ที่มาจาก <http://www.sri.cmu.ac.th>