สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบาญตาราง	ฌ
สารบาญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	
2.1 การกระจายตัวของสิ่งมีชีวิต	3
2.2 กบสกุล *Limnonectes*	5
2.3 เครื่องหมายโมเลกุล Inter simple sequence repeat (ISSR)	10
2.4 ยีน Tyrosinase	11
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	
3.1 การเก็บตัวอย่าง	12
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ	13
3.3 การวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ	
3.3.1 วิธีเจลอิเล็กโทรฟอริซิส (gel electrophoresis)	14
3.3.2 การตรวจปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่าดูดกลืนแสง	14
3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR	14
3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ยีน Tyrosinase (เฉพาะกบห้วยขาปุ่มเหนือ)	15
3.6 การตรวจสอบผลผลิต PCR	16
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล	
3.7.1 หาค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม	17
3.7.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ	18
3.7.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเทียบกับระยะห่างระหว่างภูมิศาสตร์	19
3.7.4 การสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree)	19

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4 ผลงานวิจัย
4.1 การเก็บตัวอย่าง 20
4.2 การสกัดดีเอ็นเอ 23
4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR 23
4.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยยีน Tyrosinase 26
4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม
4.5.1 การแปลผลข้อมูลจากภาพผลผลิต PCR 27
4.5.2 การวิเคราะห์ทางสถิติการประมาณความหลากหลายทางพันธุกรรม และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ 28
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา
5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ ISSR 41
5.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ 42
5.3 การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์และความสัมพันธ์ในกลุ่มประชากรของกบหงอน และกบห้วยขาปุ่มเหนือ 44
5.4 การศึกษาแผนผังความสัมพันธ์วิวัฒนาการของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย เทคนิค ISSR และจากยีน Tyrosinase 45
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา 48
เอกสารอ้างอิง 49
ภาคผนวก 56
ภาคผนวก ก 57
ภาคผนวก ข 62
ภาคผนวก ค 67
ประวัติผู้เขียน 78

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ 13

ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมสารละลาย master mixture ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ISSR 15

ตารางที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ISSR 16

ตารางที่ 3.4 สารละลาย master mixture ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ยีน Tyrosinase 17

ตารางที่ 3.5 ตัวอย่างการแปลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นข้อมูลตัวเลข 18

ตารางที่ 4.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ และmelting temperature ของไพรเมอร์ ISSR 25

ตารางที่ 4.2 ไพรเมอร์และ Annealing temperature ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 27

ตารางที่ 4.3 แสดงการนับแถบดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR โดยใช้ไพรเมอร์ UBC823 28

ตารางที่ 4.4 ค่าความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ AMOVA ของกบหงอน 28

ตารางที่ 4.5 ค่าความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ AMOVA ของกบห้วยขาปุ่มเหนือ 29

ตารางที่ 4.6 แสดง accession ของยีน Tyrosinase ในกบสกุล *Limnonectes* และสถานที่เก็บตัวอย่างข้อมูลจากGenBank 36

ตารางที่ 4.7 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ISSR ภายในกลุ่มประชากรของกบหงอน 36

ตารางที่ 4.8 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ISSR ภายในกลุ่มประชากรของกบห้วยขาปุ่มเหนือ 36

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 รูปแสดงรูปแบบการเกิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ 4

รูปที่ 2.2 แสดงแผนผังวิวัฒนาการของกบสกุล *Limnonectes* ชนิดใหม่ของประเทศไทยเทียบกับ *Limnonectes khulii* complex ที่ตำแหน่งยีน 12S และ 16S ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ 7

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของกบหงอน (*L. gyldenstopei*) รูปซ้ายแสดงด้าน dorsal ของลำตัวและรูปขวาแสดงด้านหน้าส่วนหัว และด้านข้างส่วนหัว 8

รูปที่ 2.4 แผนที่การกระจายตัวของกบหงอน (*L. gyldenstolpei*) โดยแถบสีเหลืองแสดงการกระจายตัวบริเวณภาคเหนือและภาคอิสานของประเทศไทย 8

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของกบห้วยขาปุ่มเหนือ 9

รูปที่ 2.6 ภาพการกระจายตัวของกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*Limnonectes taylori*) มีการกระจายตัวบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย 9

รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงความสูงของพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างของกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*Limnonectes taylori*) 20

รูปที่ 4.2 แผนภูมิ box plot แสดงค่ากลาง (median) ของข้อมูลความสูงของพื้นที่เก็บตัวอย่าง 21

รูปที่ 4.3 แสดงจุดพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ 22

รูปที่ 4.4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด kit 23

รูปที่ 4.5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ กบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ 24

รูปที่ 4.6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค touch down PCR 24

รูปที่ 4.7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gradient 26

รูปที่ 4.8 แผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method Using Arithmatic Averages (UPGMA) 30

รูปที่ 4.9 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี principal coordinate analysis 31

รูปที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรกบห้วยขาปุ่มเหนือจากข้อมูล ISSR 32

รูปที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์การกระจายตัวของกลุ่มประชากรกบหงอนจากข้อมูล ISSR 32

รูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ของกบห้วยขาปุ่มเหนือ (*L. taylori*) จากข้อมูลยีน Tyrosinase 33

รูปที่ 4.13 แผนภูมิก้างปลาแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือ 37

รูปที่ 4.14 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกบหงอนและกบห้วยขาปุ่มเหนือในแต่ละจังหวัด 38

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า
รูปที่ 4.15 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกบห้วยขาปุ่มเหนือและ 39
กบสกุล *Limnonectes* ตรงบริเวณตำแหน่งยีน Tyrosinase ด้วยวิธี Maximum likelihood
รูปที่ 4.16 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกบห้วยขาปุ่มเหนือและ 40
กบสกุล *Limnonectes* ตรงบริเวณตำแหน่งยีน Tyrosinase ด้วยวิธี Neighbour-joining
รูปที่ 5.1 แสดงแผนที่ร่องน้ำและแม่น้ำสำนักงานขนส่งทางน้ำที่ 1 เชียงใหม่ กรมเจ้าท่า 47

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved