



# โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

- ชื่อโครงการ** การระบุนิตด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดและแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด  
ในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่
- ชื่อบิสิต** นางสาวพิชชาพร สร้อยกระโทก รหัสประจำตัว 6032042323
- ภาควิชา** ชีววิทยา
- ปีการศึกษา** 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การระบุชนิดด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดและแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อดในพื้นที่  
ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่

DNA barcoding and habitat of tadpoles in Huai Hong Khrai  
watershed, Chiang Mai

ชื่อหนังสือ นางสาวพิชชาพร สร้อยกระโทก เลขประจำตัว 6032042323

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



การระบุชนิดด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดและแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด  
ในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่

DNA barcoding and habitat of tadpoles in Huai Hong Khrai watershed,  
Chiang Mai

นางสาวพิชชาพร สร้อยกระโทก

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพตล กิตนะ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การระบุชนิดลูกอ๊อดด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดและแหล่งที่อยู่อาศัยในพื้นที่ ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวพิชชาพร สร้อยกระโทก
อาจารย์ที่ปรึกษา	: อาจารย์ ดร.ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
ภาควิชา	: ชีววิทยา

### บทคัดย่อ

ความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศ ในประเทศไทย มีการศึกษาความหลากหลายของสัตว์กลุ่มนี้เป็นจำนวนมากโดยส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาในระยะตัวเต็มวัยเพียงอย่างเดียว ทั้งที่ลูกอ๊อดหรือระยะตัวอ่อนของสัตว์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อชุมชนสัตว์น้ำ เช่นเดียวกัน โดยในบางชนิดอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนิ่งและบางชนิดอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำไหล แต่กระนั้นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกหลายชนิดยังคงมีข้อมูลของลูกอ๊อดอยู่น้อยมาก ด้วยลักษณะของ สันฐานวิทยาที่มีความแตกต่างกันไม่มากนักจึงทำให้ลูกอ๊อดยากต่อการนำมาระบุชนิด อย่างไรก็ตาม เรายังคงสามารถใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการตรวจสอบชนิดได้ โดยหลังจากที่ระบุชนิดด้วยวิธีการอนุ ชีววิทยายังสามารถดำเนินการตรวจสอบแหล่งที่อยู่อาศัยต่อไปได้อีกด้วย ด้วยเหตุนี้จึงนำมาสู่ วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อตรวจสอบความหลากหลายชนิดของลูกอ๊อดด้วยวิธีการทางดีเอ็นเอบาร์โค้ด และตรวจสอบแหล่งที่อยู่ของลูกอ๊อด โดยดำเนินการสำรวจภาคสนามในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2563 ในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่ ลูกอ๊อดถูกเก็บจาก 2 ระบบนิเวศ ประกอบด้วย พื้นที่น้ำนิ่งและพื้นที่น้ำไหล พร้อมกับการสำรวจลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด ร่วมด้วย ยีน 16S mtDNA ถูกนำมาใช้เป็นตัวเอ็นเอบาร์โค้ด จากนั้นจึงนำลำดับดีเอ็นเอของลูกอ๊อดมา เปรียบเทียบกับลำดับ ดีเอ็นเอของตัวเต็มวัยที่นำมาจาก GenBank ด้วยวิธีการ BLAST ก่อนนำมา วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Maximum Likelihood ผลของการศึกษาพบลูกอ๊อดทั้งหมด 7 ชนิดประกอบด้วย *Microhyla heymonsi*, *Microhyla mukhlersuri*, *Microhyla berdmorei*, *Sylvirana nigrovittata*, *Hoplobatrachus rugulosus*, *Fejervarya limnocharis* และ *Phrynoglossus martensii* การสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยยังเผยให้เห็นว่า *Fejervarya limnocharis* และ *Hoplobatrachus rugulosus* อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนิ่งเพียงอย่างเดียว ในขณะที่ *Microhyla berdmorei* และ *Sylvirana nigrovittata* อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำไหลเพียงอย่างเดียว จากผลของการศึกษาทั้งหมดสามารถแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาชีววิทยาของลูกอ๊อด และสนับสนุนการอนุรักษ์สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

**คำสำคัญ:** ความหลากหลาย, สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก, แหล่งที่อยู่อาศัย, BLAST, 16S gene

Research Title : DNA Barcoding and Habitats of Tadpoles in Huai Hong Khrai  
Watershed, Chiang Mai Province

Student name : Ms. Pitchapron Sroykratok

Advisor : Panupong Thammachoti, Ph.D.

Co-Advisor : Asst.Prof. Noppadon Kitana, Ph.D.

Department of : Biology

---

### Abstract

Amphibians are important in various types of ecosystems. There were several studies on the diversity of amphibians in Thailand but most of them focus on only adult stage. Although, tadpoles of amphibian are also important in aquatic communities. Some species live in pond ecosystems others live in stream ecosystems. Nevertheless, several species of amphibians still have less information on their tadpoles. The morphological conserve in tadpoles makes them difficult to identify. However, we can use the DNA barcoding technique to investigate species of tadpoles. In addition, habitat usage is also important since different species has different habitat. Taking these into account, this study subjects to investigate species richness of tadpole using the DNA barcoding technique and examine the habitat of tadpoles. Field surveys were conducted during July to December 2020 in Huai Hong Khrai Watershed, Chiang Mai Province. Tadpoles were collected from two ecosystems including pond and stream. Habitats of each tadpole was also observed. The 16S mtDNA was used as a barcoding gene. Then tadpole sequences were compared with adult sequences from GenBank by BLAST. After those phylogenetic analyses were performed by using Maximum Likelihood method. The results show that there are seven species of tadpoles including *Microhyla heymonsi*, *Microhyla mukhlersuri*, *Microhyla berdmorei*, *Sylvirana nigrovittata*, *Hoplobatrachus rugulosus*, *Fejervarya limnocharis* and *Phrynoglossus martensii*. Habitat observation also reveals that *Fejervarya limnocharis* and *Hoplobatrachus rugulosus* live only in ponds, while *Microhyla berdmorei* and *Sylvirana nigrovittata* live only in streams. The overall result shed light on the importance of tadpole biology and support amphibian conservation.

**Keywords:** 16S gene, anurans, BLAST, diversity, habitat

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนของงานแก้ไข การวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล รวมทั้งการเอื้อเฟื้อเอกสารประกอบการทำโครงการ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการ ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตตะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำ ความรู้ และการสนับสนุนอย่างดียิ่งตลอดมา

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชษฐ คนชื้อ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตตะ และนักวิจัยในหน่วยวิจัย BioSentinel ที่ให้ความกรุณาช่วยแนะนำ ปรับปรุงการนำเสนอโครงการ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.Gunther Köhler ที่เอื้ออำนวยข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอของกบชนิด *Phrynoglossus martensii* ทำให้ได้ข้อมูลทางสายวิวัฒนาการที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา, อาจารย์ ดร.มารุต เพ็ญอวารณ์ และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอขอบคุณนายกลวัชร มณีชัย นักจัดการงานทั่วไป และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ณ งานศึกษาและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกบ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ ที่ดำเนินความสะดวกในการเดินทาง การเดินสำรวจ และการอยู่อาศัยตลอดระยะเวลาการดำเนินโครงการ

ขอขอบคุณศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ รวมถึงวัสดุและอุปกรณ์ในการศึกษาและพักอาศัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน และห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน ที่อำนวยความสะดวกและอุปกรณ์ให้การดำเนินโครงการเป็นไปได้อย่างราบรื่น

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (หมายเลขโครงการ: CU\_GR\_66\_23\_10) ทุนเพิ่มศักยภาพด้านการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ (หมายเลขโครงการ: Sci-Super VI\_63\_004) และโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
ABSTRACT .....	ข
กิตติกรรมประกาศ .....	ค
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ .....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม .....	4
2.1. ความหลากหลายทางชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียด .....	4
2.4. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcoding) ในลูกอ๊อด.....	7
2.5. พื้นที่ศึกษา .....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	11
3.1. ขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ .....	11
3.2. สำรองและเก็บตัวอย่าง .....	11
3.2.1. การเก็บตัวอย่างลูกอ๊อด .....	11
3.2.2. การเก็บข้อมูลแหล่งที่อยู่อาศัย .....	11
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	15
4.1. ผลการระบุชนิดพันธุ์ของลูกอ๊อดด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด.....	15
4.1.1. ข้อมูล BLAST .....	16
4.1.2. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลูกอ๊อด .....	16
4.1.2.1. สร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Maximum likelihood .....	16
4.1.2.2. สร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Bayesian Inference .....	16
4.2. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อด .....	23
4.3. ลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด.....	36
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา.....	41
5.1. การระบุชนิดลูกอ๊อดด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด .....	41
5.2. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อด.....	41

5.3. แหล่งที่อยู่อาศัยและการใช้พื้นที่ของลูกอ๊อด.....	41
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ .....	43
6.1. สรุปผลการศึกษา .....	43
6.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต .....	43
เอกสารอ้างอิง .....	44
ภาษาไทย.....	44
ภาษาอังกฤษ .....	45
ภาคผนวกที่ 1 ลำดับดีเอ็นเอของลูกอ๊อด.....	49
ภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการของลูกอ๊อด.....	56

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4-1 ข้อมูล BLAST ของลูกอ๊อดแต่ละชนิด .....	18
ตารางที่ 4-2 ข้อมูลการพบลูกอ๊อด (การใช้พื้นที่อยู่อาศัย) ในพื้นที่น้ำนิ่งและพื้นที่น้ำไหล.....	36
ตารางที่ 4-3 ข้อมูลปัจจัยทางกายภาพในพื้นที่น้ำนิ่งตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 .....	40
ตารางที่ 4-4 ข้อมูลปัจจัยทางกายภาพในพื้นที่น้ำไหลตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 .....	40

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 ระบบ GOSNER STAGE แสดงระยะการเจริญของลูกอ๊อด (GOSNER, 1960).....	6
ภาพที่ 2-2 ขอบเขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องพระราชดำริ จังหวัด เชียงใหม่ (สุภาพ ปารมี, รองลาภ สุขมาสรวง และสรพล กัญชัย, 2558) .....	10
ภาพที่ 3-1 พื้นที่น้ำไหล .....	12
ภาพที่ 3-2 พื้นที่น้ำนิ่ง .....	12
ภาพที่ 3-4 ส่วนต่าง ๆ ของโครงสร้างปากลูกอ๊อด (ALTIG, 2007) .....	13
ภาพที่ 4-1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลูกอ๊อดด้วยวิธีการ MAXIMUM LIKELIHOOD ....	21
ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลูกอ๊อดด้วยวิธีการ BAYESIAN INFERENCE .....	22
ภาพที่ 4-3 ภาพถ่ายลูกอ๊อดกบหนอง ( <i>FEJERVARYA LIMNOCHARIS</i> ).....	23
ภาพที่ 4-4 ภาพวาดลูกอ๊อดกบหนอง ( <i>FEJERVARYA LIMNOCHARIS</i> ).....	24
ภาพที่ 4-5 ภาพวาดปากลูกอ๊อดกบหนอง ( <i>FEJERVARYA LIMNOCHARIS</i> ).....	24
ภาพที่ 4-6 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดกบนา ( <i>HOPLOBATRACHUS RUGUROSUS</i> ) .....	25
ภาพที่ 4-7 ภาพวาดลูกอ๊อดกบนา ( <i>HOPLOBATRACHUS RUGUROSUS</i> ).....	26
ภาพที่ 4-8 ภาพวาดปากลูกอ๊อดกบนา ( <i>HOPLOBATRACHUS RUGUROSUS</i> ) .....	26
ภาพที่ 4-9 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดกบอ่องเล็ก ( <i>SYLVIRANA NIGROVITTATA</i> ).....	27
ภาพที่ 4-10 ภาพวาดลูกอ๊อดกบอ่องเล็ก ( <i>SYLVIRANA NIGROVITTATA</i> ) .....	28
ภาพที่ 4-11 ภาพวาดปากลูกอ๊อดกบอ่องเล็ก ( <i>SYLVIRANA NIGROVITTATA</i> ).....	28
ภาพที่ 4-12 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดเขียดหลังปุ่มที่ราบ ( <i>PHRYNOGLOSSUS MARTENSII</i> ).....	29
ภาพที่ 4-13 ภาพวาดลูกอ๊อดเขียดหลังปุ่มที่ราบ ( <i>PHRYNOGLOSSUS MARTENSII</i> ) .....	30
ภาพที่ 4-14 ภาพวาดปากลูกอ๊อดเขียดหลังปุ่มที่ราบ ( <i>PHRYNOGLOSSUS MARTENSII</i> ) .....	30
ภาพที่ 4-15 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดอึ่งข้างดำ ( <i>MICROYLA HEYMONSI</i> ).....	31
ภาพที่ 4-16 ภาพวาดลูกอ๊อดอึ่งข้างดำ ( <i>MICROYLA HEYMONSI</i> ) .....	32
ภาพที่ 4-17 ภาพวาดปากลูกอ๊อดอึ่งข้างดำ ( <i>MICROYLA HEYMONSI</i> ).....	32
ภาพที่ 4-18 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดอึ่งแม่หนาว ( <i>MICROHYLA BERDMOREI</i> ) .....	33
ภาพที่ 4-19 ภาพวาดลูกอ๊อดอึ่งแม่หนาว ( <i>MICROHYLA BERDMOREI</i> ) .....	33
ภาพที่ 4-20 ภาพวาดปากลูกอ๊อดอึ่งแม่หนาว ( <i>MICROHYLA BERDMOREI</i> ).....	34
ภาพที่ 4-21 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดอึ่งน้ำเต้า ( <i>MICROHYLA MUKLERSURI</i> ).....	35



ภาพที่ 4-22	ภาพวาดลูกอ๊อดอิงน้ำเต้า ( <i>MICROHYLA MUKLERSURI</i> ).....	35
ภาพที่ 4-23	ภาพวาดปากลูกอ๊อดอิงน้ำเต้า ( <i>MICROHYLA MUKLERSURI</i> ).....	35
ภาพที่ 4-24	แหล่งน้ำในแปลงข้าว พื้นที่การเกษตร .....	37
ภาพที่ 4-25	แอ่งน้ำขังใกล้แปลงข้าว พื้นที่การเกษตร .....	37
ภาพที่ 4-26	แอ่งน้ำชั่วคราวบริเวณพื้นที่ศึกษาธรรมชาติ.....	38
ภาพที่ 4-27	ลำธารบริเวณฝายกั้นน้ำ พื้นที่ศึกษาธรรมชาติ.....	38
ภาพที่ 4-28	ลำธารบริเวณฝายกั้นน้ำ ใกล้ถนนในพื้นที่ศึกษาธรรมชาติ.....	39
ภาพที่ 4-29	ลำธารบริเวณทางเดินศึกษาธรรมชาติ .....	39



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ประเทศไทยมีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูงเนื่องจากตั้งอยู่ในพื้นที่ที่เหมาะสมทางชีวภูมิศาสตร์ซึ่งคาบเกี่ยวระหว่างหลายเขตชีวภูมิศาสตร์ย่อย ซึ่งสภาพภูมิประเทศนี้มีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์หลายชนิดรวมถึงสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกด้วย (นริศ ภูมิภาคพันธุ์, 2539) ปัจจุบันมีการรายงานการค้นพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแล้ว 185 ชนิด (Frost, 2021) สัตว์กลุ่มนี้มีลักษณะทางชีววิทยาที่ตลอดวงจรชีวิตต้องอาศัยน้ำและความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญ (Waddle, 2006) ในวงจรชีวิตจะมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัย (metamorphosis) ซึ่งในระยะลูกอ๊อดต้องอาศัยแหล่งน้ำในการเจริญเติบโต เมื่อเป็นตัวเต็มวัยจะขึ้นมาอาศัยอยู่บนบกแต่ยังคงต้องอาศัยความชุ่มชื้น (Vitt and Caldwell, 2014) การเปลี่ยนแปลงที่อยู่อาศัยไปตามวงจรชีวิตนี้เป็นลักษณะเด่นของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่สามารถนำมาศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม ทำให้จำนวนประชากรและความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบในระบบนิเวศสามารถเป็นตัวชี้วัดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ ในกรณีที่สภาพแวดล้อมแห้งแล้งหรือขาดน้ำจะทำให้สัตว์กลุ่มนี้ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ตามปกติ ส่งผลให้จำนวนประชากรลดลง ดังนั้นหากพื้นที่นั้นมีความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกลดลงอาจเป็นสัญญาณที่บ่งชี้ถึงความเสื่อมโทรมของพื้นที่บริเวณนั้นและเป็นสัญญาณเตือนภัยคุกคามที่เกิดในธรรมชาติที่ส่งผลต่อมนุษย์ได้ (ฟูสตี ปริยานนท์ และคณะ, 2558) นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญต่อห่วงโซ่อาหารทั้งระบบนิเวศน้ำและระบบนิเวศบก โดยมีบทบาทเป็นทั้งผู้ล่าและเหยื่อ กล่าวคือ เมื่ออยู่ในระยะลูกอ๊อดจะบริโภคพืชน้ำ หรือสัตว์น้ำอื่น ๆ เช่น แพลงก์ตอน ลูกน้ำ ในขณะที่เดียวกันก็เป็นเหยื่อให้กับผู้ล่าหลายชนิด ส่วนในตัวเต็มวัยจะดำรงชีวิตส่วนใหญ่อยู่บนบก จะมีบทบาทเป็นผู้ล่าและเหยื่อ เช่น กินแมลงเป็นอาหาร การเป็นอาหารให้แก่งูหรือนก บทบาทเหล่านี้ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับกบเขียดจึงเป็นส่วนหนึ่งในการควบคุมประชากรในห่วงโซ่อาหารทำให้เกิดความสมดุลภายในระบบนิเวศ (Hocking and Babbitt, 2014)

การศึกษาความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอดีตมักศึกษาในระยะตัวเต็มวัยเป็นหลัก (McDiarmid and Altig, 1999) ข้อมูลของลูกอ๊อดยังมีอยู่น้อยมาก โดยหลายชนิดยังคงขาดข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (พัชร ดนัยสวัสดิ์, วิเชษฐ คนชื่อ และอาจอง ประทัตสุนทรสาร, 2553) ซึ่งการศึกษาความหลากหลายของลูกอ๊อดมีความสำคัญทั้งในด้านนิเวศวิทยาและอนุกรมวิธาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น แต่การศึกษาความหลากหลายของลูกอ๊อดด้วยสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจเป็นไปได้ยากเนื่องจากมีข้อมูลอยู่น้อย และพบว่าหลายชนิดยังเป็นสิ่งมีชีวิตซ่อนเร้น

(cryptic species) การศึกษาความหลากหลายของลูกอ๊อดจึงจำเป็นต้อง ใช้ข้อมูลอื่นประกอบด้วย เช่น ข้อมูลทางนิเวศวิทยา หรือ ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ในการจัดจำแนกชนิด เป็นต้น

การใช้เทคนิคอนุพันธุศาสตร์ในการจัดจำแนกชนิด หรือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นวิธีที่ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยการใช้บางส่วนของ genomic DNA จากตัวอย่างของ สิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ นำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสัตว์ที่มีข้อมูลอยู่ (Wilson et al., 2019) ซึ่งการใช้วิธีดีเอ็นเอบาร์โค้ดนี้สามารถใช้ในการจัดจำแนกลูกอ๊อดได้ถึงลำดับชนิด โดยไม่ต้องรอให้ลูกอ๊อดเจริญเป็นตัวเต็มวัยเนื่องจากใช้ระยะเวลาและบางชนิดไม่เหมาะสมที่จะนำมา เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (วุฒิ ทักษิณธรรม และคณะ, 2553; Dang et al., 2015) ดังนั้นดีเอ็นเอ บาร์โค้ดจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการนำมาระบุชนิดของลูกอ๊อดและการศึกษาสิ่งมีชีวิตซ่อนเร้น รวมถึง สามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น ๆ ที่ใกล้เคียง กันได้อีกด้วย

ลูกอ๊อดแต่ละชนิดมีที่อยู่อาศัย (habitat) และที่อยู่อาศัยย่อย (microhabitat) แตกต่างกัน ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับการดำรงชีวิตที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด การใช้ที่อยู่อาศัยแตกต่างกันนี้ทำให้มีการแบ่งปัน การใช้ทรัพยากรกัน (niche partitioning) เช่น ลูกอ๊อดของอึ่งจิวหลายชนิดอาศัยอยู่บนผิวน้ำนิ่ง เท่านั้น และมีการกินแพลงค์ตอนเป็นอาหาร ในขณะที่ลูกอ๊อดของกบเขียวหลายชนิดอาศัยอยู่ใต้กอง กรวดหินในน้ำไหล และมีการกินสาหร่ายและเศษซากพืชเป็นอาหาร (วุฒิ ทักษิณธรรม และคณะ, 2553) จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าลูกอ๊อดแต่ละชนิดมีการใช้ที่อยู่อาศัยและที่อยู่อาศัยย่อย แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อดจึงเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ช่วยในการจัดจำแนกลูกอ๊อดแต่ละชนิดได้

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาชีววิทยาของลูกอ๊อด โดยการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด สันฐานวิทยา และที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อดเพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของลูกอ๊อด ทั้งนี้เพื่อเป็น ประโยชน์ต่อการศึกษาด้านนิเวศวิทยาและอนุกรมวิธานในอนาคต รวมถึงการนำข้อมูลที่ได้จาก งานวิจัยมาเป็นแนวทางในการอนุรักษ์สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียว และใช้ในการประเมิน ความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียวร่วมกับการศึกษาความหลากหลายใน รูปแบบอื่น เช่น การศึกษาเสียงร้อง การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม เป็นต้น

พื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ เป็นพื้นที่ป่าเบญจพรรณและป่าเต็ง รังที่มีความหลากหลายสูง แต่ถูกทำลายจากการบุกรุกป่าทำไร่เลื่อนลอยทำให้พื้นที่เกิดความเสื่อมโทรม ต่อมาได้มีการพัฒนาผืนป่าและแหล่งน้ำในพื้นที่จึงทำให้สามารถกลับมาใช้ประโยชน์และใช้เป็น แหล่งเรียนรู้ศึกษาการอนุรักษ์ธรรมชาติได้ ดังนั้นจึงนำไปสู่การศึกษาความหลากหลายของสัตว์สะเทิน น้ำสะเทินบกอันดับกบเขียวโดยศึกษาชีววิทยาของลูกอ๊อดจากพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัด เชียงใหม่ เพื่อสร้างแนวทางในการอนุรักษ์สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และประเมินความเปลี่ยนแปลงที่

เกิดขึ้นหลังการฟื้นฟูป่าเสื่อมโทรม รวมถึงนำข้อมูลจากการศึกษาที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับพื้นที่อื่น ๆ ในประเทศไทยต่อไป

## 1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1.2.1 ศึกษาแหล่งอาศัยของลูกอ๊อดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับกบเขียดที่พบในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่
- 1.2.2 จำแนกชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในระยะลูกอ๊อดโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding)
- 1.2.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของลูกอ๊อดที่พบในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่

## 1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

### 1.3.1 ประโยชน์ต่อตัวนิสิต

- เรียนรู้การวางแผนและศึกษาทางวิทยาศาสตร์เพื่อใช้ในกระบวนการวิจัยอย่างเป็นระบบ
- เข้าใจนิเวศวิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและบทบาทที่มีต่อระบบนิเวศ
- เรียนรู้การทำงานภาคสนามอย่างมีประสิทธิภาพ

### 1.3.2 ประโยชน์ต่อสังคมและสิ่งแวดล้อม

- สามารถใช้เทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกชนิดของลูกอ๊อดได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด
- สามารถนำข้อมูลทั้งในด้านชีวโมเลกุล สัณฐานวิทยา และแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อดเป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปสู่การวางแผนการอนุรักษ์สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอนาคต

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1. ความหลากหลายทางชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียด

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียด (anuran) เป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในชั้น (Class) แอมฟิเบีย (Amphibia) ชั้นย่อย (Subclass) ลิสมแอมฟิเบีย (Lissamphibia) อันดับ (Order) Anura ได้แก่ กบ เขียด อึ่ง คางคก ซึ่งมีวงจรชีวิตครึ่งหนึ่งอยู่ในน้ำ ลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของสัตว์สะเทินน้ำบก คือ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากลูกออดเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยที่เรียกว่า metamorphosis ซึ่งถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนและปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ การเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลง

พบการกระจายตัวของสัตว์กลุ่มนี้ตั้งแต่เขตร้อนถึงทางตอนใต้ของขั้วโลกเหนือที่หนาวจัด โดยพบกระจายตัวมากที่สุดในเขตร้อนชื้น คิดเป็นร้อยละ 88 ของสัตว์อันดับกบเขียดทั้งหมด ปัจจุบันประเทศไทยมีรายงานการค้นพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียดแล้วทั้งหมด 7 วงศ์ ได้แก่ วงศ์อึ่งกราย (Megophryidae) วงศ์คางคก (Bufonidae) วงศ์กบเขียด (Dicroglossidae) วงศ์กบท่าสาร (Ceratobatrachidae) วงศ์กบแท้ (Ranidae) วงศ์ปาด (Rhacophoridae) และ วงศ์อึ่ง (Microhylidae) รวมทั้งหมดเป็น 185 ชนิด (ปิยวรรณ นิยมวัน, ไพรวัลย์ ศรีสม และปริญญา ภาวังกคะนนันท์, 2562; Frost, 2021)

จากการศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียดที่ผ่านมาด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ดและสัญญาณวิยาพบหลักฐานการมีอยู่ของสัตว์ชนิดซ่อนเร้นเป็นจำนวนมาก (Stuart, 2004) โดยมีรายงานการค้นพบชนิดพันธุ์ใหม่ 100-300 ชนิดในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา (Kohler, 2005) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Chapman ในปี ค.ศ. 2009 กล่าวว่าจำนวนที่มีการค้นพบอาจเป็นเพียงครึ่งหนึ่งของจำนวนสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียดที่มีทั้งหมด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาความหลากหลายของสัตว์กลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้นเพื่อลดความเสี่ยงในการสูญพันธุ์และเพื่อการอนุรักษ์ในอนาคต

ลูกออดเป็นหนึ่งในหลักฐานที่สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายและระบุชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียด เนื่องจากเป็นช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีขอบเขตจำกัด สามารถพบเจอและจับได้ง่ายกว่าตัวเต็มวัยบางชนิดที่มักเคลื่อนที่ออกจากแหล่งผสมพันธุ์หรือวางไข่ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาความหลากหลายของสัตว์อันดับกบเขียดที่ผ่านมากลับมีการศึกษาลูกออดน้อยมาก (Grosjean et al., 2015) จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาความหลากหลายของลูกออดมากขึ้น

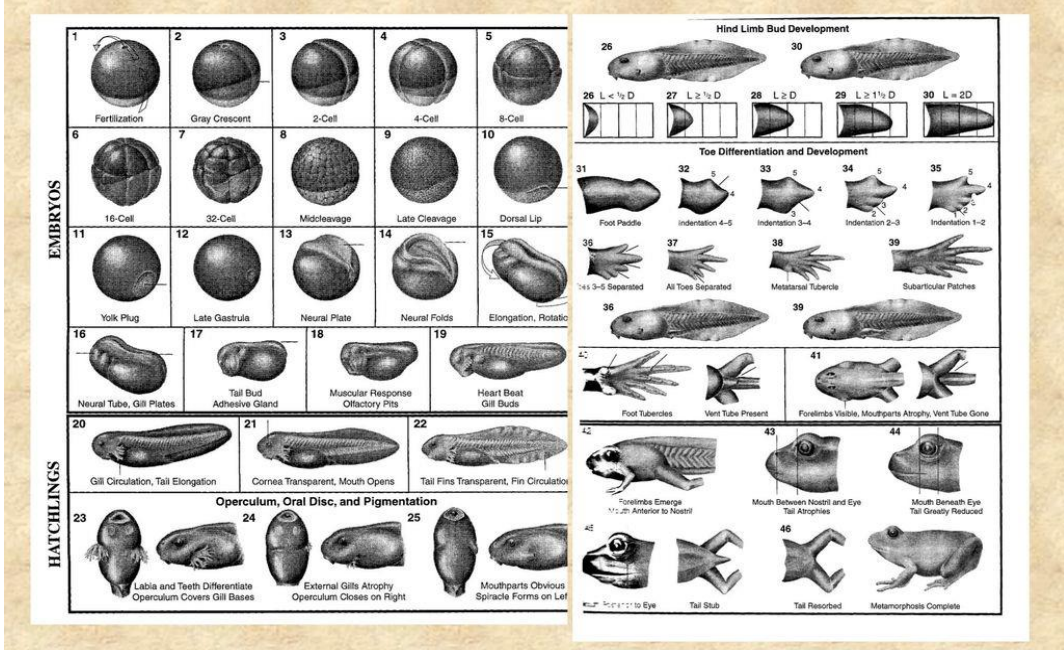
## 2.2. ระยะตัวอ่อนของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียด

วงจรชีวิตของกบมี 3 ระยะ คือ ไข่ ตัวอ่อนหรือลูกอ๊อด และตัวเต็มวัย ซึ่งในระยะลูกอ๊อดของกบเขียดส่วนใหญ่ใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน (Sach and Buchholz, 2019) ลูกอ๊อดเป็นระยะที่อาศัยอยู่ในน้ำ ดังนั้นแต่ละชนิดจึงมีลักษณะรูปร่างโดยทั่วไปเหมือนกันคือ ลำตัวกลมป้อม หางเป็นแผ่นแบน ด้านข้าง มีกล้ามเนื้อหาง มีครีบบนและครีบล่าง ตัวอ่อนนุ่ม ซึ่งต่างจากตัวอ่อนของซาลาแมนเดอร์และเขียดงู กล่าวคือ ตัวอ่อนซาลาแมนเดอร์มีรูปร่างคล้ายปลาที่มีพู่เหงือกยาวออกมาจากสองข้างแก้ม ก่อนจะพัฒนามีแขนขา ในขณะที่ตัวอ่อนเขียดงูมีรูปร่างเรียวยาวปลายหางแบนคล้ายไม้พายสำหรับใช้เคลื่อนที่ในน้ำ (ปิยวรรณ นิยมวัน และคณะ, 2562)

ลูกอ๊อดในอันดับกบเขียดมีลักษณะทางสัณฐานบางประการที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิด ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการกิน เช่น ลูกอ๊อดที่หากินในแหล่งน้ำขัง น้ำไหลเอื่อย หรือกินอาหารผ่านการกรองอนุภาคเล็กจะมีลักษณะโครงสร้างปากเป็นแผ่นออก ไม่มีตุ่มฟัน เช่น ลูกอ๊อดในสกุล *Xenophrys* ในขณะที่ลูกอ๊อดที่กัดกินสิ่งมีชีวิตอื่นเป็นอาหาร กินอาหารโดยการขูด จะมีโครงสร้างปากที่ซับซ้อน มีจงอยปากและตุ่มฟันเรียงเป็นแถวรอบช่องปาก เช่น ลูกอ๊อดกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) นอกจากนี้อาจขึ้นอยู่กับแหล่งที่อยู่อาศัย โดยลูกอ๊อดที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนิ่ง ที่น้ำไหลไม่แรงมากนัก มักจะมีครีบหางขนาดใหญ่ ในขณะที่ลูกอ๊อดที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำไหล จะมีลักษณะลำตัวและครีบหางเรียวยาว เป็นต้น (พัชร ดนัยสวัสดิ์, 2552)

Gosner stage คือ ระบบในการอธิบายระยะการเจริญของเอมบริโอและตัวอ่อนของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียด ซึ่งประกอบไปด้วย 46 ระยะ ตั้งแต่เอมบริโอที่ถูกปฏิสนธิแล้ว (ระยะที่ 1) ไปจนถึงระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง หรือ metamorphosis จนสมบูรณ์ (ระยะที่ 46) ซึ่งระบบนี้ถูกสร้างขึ้นโดย Kenneth Gosner ในปี ค.ศ. 1960 และถูกใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเพื่ออธิบายระยะลูกอ๊อดโดยอ้างอิงจากลักษณะสัณฐานวิทยา ซึ่ง Gosner stage สามารถใช้ในการเปรียบเทียบการเจริญของลูกอ๊อดได้แม้เป็นคนละชนิดกัน (Gosner, 1960)

# Staging larvae: Gosner stages



ภาพที่ 2-1 ระบบ Gosner stage แสดงระยะการเจริญของลูกอ๊อด (Gosner, 1960)

## 2.3. นิเวศวิทยาของลูกอ๊อด

การเลือกใช้พื้นที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อดสัมพันธ์กับการพื้นที่ผสมพันธุ์และวางไข่ของตัวเต็มวัย โดยพื้นที่ผสมพันธุ์มักกลายเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด จำนวนและการกระจายตัวของพื้นที่ผสมพันธุ์จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มจำนวนของลูกอ๊อด ในพื้นที่เขตร้อน สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียดมักผสมพันธุ์กันในพื้นที่น้ำนิ่ง เช่น บึง พื้นที่ชุ่มน้ำ แอ่งน้ำขัง และพื้นที่น้ำไหล เช่น แม่น้ำ ลำธาร แหล่งน้ำเหล่านี้อาจมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันไปทั้งในด้านลักษณะทางกายภาพ เช่น ความกว้างของแหล่งน้ำ พื้นที่บึง ความลึก ในด้านคุณสมบัติของน้ำ เช่น pH น้ำ อุณหภูมิ น้ำ ความเร็วของกระแสน้ำ และด้านของการเป็นแหล่งน้ำชั่วคราวหรือแหล่งน้ำถาวร (Hawley, 2010)

การถูกล่า และการล่า เป็นปัจจัยชีวภาพที่มีผลต่อการใช้พื้นที่ของลูกอ๊อด โดยในแหล่งน้ำถาวรหรือแหล่งน้ำลูกอ๊อดมีความเสี่ยงน้อยที่จะแห้งตายก่อนกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเสร็จสมบูรณ์ ในขณะที่ตัวอ๊อดมักจะปรากฏความหลากหลายของผู้ล่าและคู่แข่งสูงเช่นเดียวกันแต่ด้วยความสามารถในการเข้าถึงทรัพยากรได้มากกว่าลูกอ๊อดในแหล่งน้ำชั่วคราว ลูกอ๊อดที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำถาวรจึงสามารถมีระยะเวลาที่เป็นตัวอ่อนที่นานกว่าและสามารถมีขนาดตัวที่ใหญ่กว่าได้ ในขณะที่ลูกอ๊อดในแหล่งน้ำชั่วคราวมีความเสี่ยงในการถูกล่าน้อยกว่า (Fatorelli and Rocha, 2010)



## 2.4. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcoding) ในลูกอ๊อด

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด คือ ระบบในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตที่รวดเร็วและแม่นยำ สามารถเข้าถึงระบบนิเวศวิทยาได้มากขึ้นโดยการใช้ลำดับดีเอ็นเอสายสั้นแทนการใช้จีโนมและมักถูกใช้ในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอตและโพรคาริโอต ลำดับดีเอ็นเอสายสั้นถูกสร้างขึ้นจากบริเวณมาตรฐานที่ใช้ในการระบุชนิดซึ่งรู้จักในชื่อ มาร์คเกอร์ (marker) มาร์คเกอร์นี้แตกต่างกันไปในแต่ละชนิด เช่น cytochrome c oxidase subunit I (COI) ของสัตว์, matK และ rbcL ของพืช และ Internal Transcribed Spacer (ITS) สำหรับเห็ดรา ซึ่งมักถูกใช้หลากหลายงาน เช่น การเกษตร การอนุรักษ์ชนิดพันธุ์ใกล้สูญพันธุ์ การตรวจสอบคุณภาพน้ำ การปกป้องทรัพยากรธรรมชาติ การระบุชนิดพืชสมุนไพร เป็นต้น (Hebert and Gregory, 2005)

จากการศึกษาที่ผ่านมาการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ประสบความสำเร็จในการระบุชนิดของตัวอ่อนสัตว์หลากหลายชนิด เช่น สัตว์กลุ่ม caterpillars ตัวอ่อน Diptera และ zooplankton (Hebert et al., 2003) ดังตัวอย่างการศึกษาของ ของ Hebert ในปี ค.ศ. 2004 ที่มีการเผยแพร่ชื่อของผีเสื้อชนิด *Astraptes fulgerator* ต่อมาการศึกษาของ Grosjean ในปี ค.ศ. 2015 ที่นำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้ในการพัฒนาการตรวจสอบความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียด โดยใช้ดีเอ็นเอในตำแหน่ง 16S rRNA และ COI สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Neighbor-joining จากตัวอย่างลูกอ๊อด 121 ตัว และตัวเต็มวัย 291 ตัว จาก 65 พื้นที่ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถระบุชนิดลูกอ๊อดที่พบทั้งหมดได้อย่างแม่นยำ รวมถึงสามารถเปิดเผยชนิดของลูกอ๊อดบางกลุ่มที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างตัวเต็มวัยได้ จากที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าลูกอ๊อดสามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอันดับกบเขียดได้ และดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีประโยชน์อย่างยิ่งในการใช้เป็นเครื่องมือระบุชนิดของลูกอ๊อด

### BLAST

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการหาบริเวณที่มีความคล้ายคลึงกันระหว่างลำดับเบส โปรแกรมทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับโปรตีนและคำนวณค่านัยสำคัญทางสถิติของคู่เบสที่นำมาเปรียบเทียบกัน BLAST สามารถใช้ดูความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างลำดับเบสตลอดจนสามารถช่วยระบุชนิดของยีนได้ BLAST มีทั้งหมด 4 แบบ ได้แก่

1. BLASTn (Nucleotide BLAST) คือ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หนึ่งหรือมากกว่าที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล
2. BLASTx คือ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกแปลเป็น 6 reading frame เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

3. tBLASTn คือ การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกแปลเป็น 6 frame translation ในฐานข้อมูล
4. BLASTp (Protein BLAST) คือ การเปรียบเทียบลำดับโปรตีนที่ศึกษากับลำดับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

#### คำศัพท์พื้นฐานใน BLAST

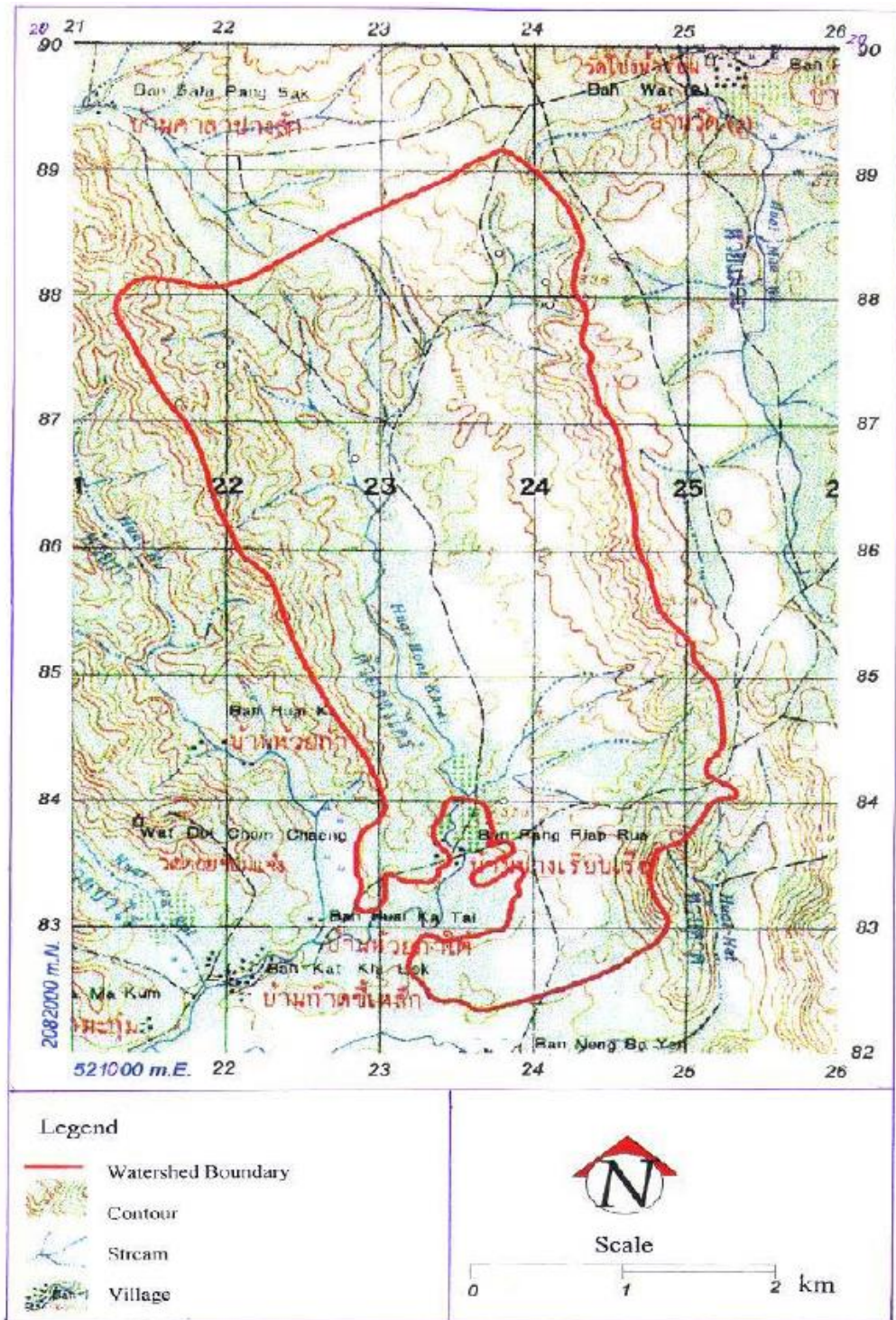
- 1) Max Score (Maximum score) คือ คะแนนสูงสุดที่เกิดจากการนำลำดับเบสที่ศึกษามาจัดเรียงเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูลที่ละลำดับ โดยคะแนนที่ได้เกิดจากผลรวมของ reward คือคะแนนบวกเมื่อพบลำดับเบสที่ตรงกัน และ penalty คือคะแนนติดลบเมื่อพบลำดับเบสที่ไม่ตรงกันและเจอช่องว่าง
- 2) Total Score คือ ผลรวมของคะแนนทั้งหมดจากการจัดเรียงที่ได้นำลำดับเบสที่ศึกษามาจัดเรียงเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล
- 3) Query Coverage คือ ร้อยละของลำดับเบสที่ศึกษาซึ่งซ้อนทับกับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล
- 4) E Value (Expect Value) คือ จำนวนครั้งของการจัดเรียงที่คาดว่าจะต้องใช้เพื่อให้ผลลัพธ์ของการเปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลกับลำดับเบสที่ศึกษาอยู่ในเกณฑ์คะแนนที่ยอมรับได้ ซึ่งควรมีค่าเข้าใกล้ศูนย์
- 5) Identity คือ ร้อยละของลำดับเบสที่ศึกษาที่ตรงกับลำดับเบสที่มีอยู่ในข้อมูล
- 6) Accession Length คือ จำนวนของนิวคลีโอไทด์ของลำดับเบสในฐานข้อมูล
- 7) Accession number คือ เลขจำเพาะที่ใช้ในการระบุลำดับเบสในฐานข้อมูล

## 2.5. พื้นที่ศึกษา

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งอยู่ในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ ในเขตป่าสงวนแห่งชาติ ป่าขุนแม่กวาง ตำบลป่าเมี่ยง ตำบลแม่โป่ง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ อยู่ในตำแหน่งเส้นรุ้งที่ 18 องศา 53 ลิปดา ถึง 18 องศา 56 ลิปดาเหนือ และเส้นแวงที่ 99 องศา 14 ลิปดา ถึง 99 องศา 16 ลิปดา ความลาดชันของพื้นที่ค่อนข้างน้อย เฉลี่ยประมาณร้อยละ 3.5 ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลปานกลางเฉลี่ยระหว่าง 350-580 เมตร มีพื้นที่ลุ่มน้ำ 8,500 ไร่ ความกว้างเฉลี่ยของกลุ่มน้ำ 2,500 เมตร ความยาวเฉลี่ยของกลุ่มน้ำ 6,500 เมตร โดยขอบเขตพื้นที่แสดงดังภาพที่ 2-1 ลักษณะภูมิประเทศทั่วไปเป็นป่าเขา พื้นที่ทางตอนเหนือเป็นป่าไม้เบญจพรรณ พื้นที่ตอนกลางและตอนใต้เป็นป่าเต็งรังที่มีสภาพค่อนข้างเสื่อมโทรมโดยเฉพาะบริเวณที่เป็นภูเขา พื้นที่ป่าบางแห่งมีหินขนาดใหญ่ ส่วนป่าเบญจพรรณจะพบตามบริเวณที่ใกล้ลำห้วยที่มีความชุ่มชื้น และในสังคมพืชนี้จะมีพรรณไม้เด่นของป่าเต็งรังขึ้นปะปนด้วย ซึ่งอาจเป็นเพราะสังคมพืช

ทั้งสองชนิดนี้ขึ้นสลับกันอยู่ เป็นเหตุให้พรรณไม้ของสังคมพืชหนึ่งสามารถกระจายและขึ้นอยู่ได้ในอีกสังคมหนึ่ง (สุภาพ ปารมี, รองลาภ สุขมาสรวง และสรพล กัณชัย, 2558)

จากการศึกษาของ ญัฐดนัย แต่งแดน ในปี พ.ศ. 2562 พบว่า ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ มีความหลากหลายชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั้งหมด 2 อันดับ 5 วงศ์ 10 สกุล 19 ชนิด โดยยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกระยะตัวอ่อนหรือลูกอ๊อด การศึกษาทางด้านชีวโมเลกุล รวมถึงการศึกษานิเวศวิทยาเชิงพฤติกรรม คือ การศึกษาพฤติกรรมการเลือกใช้พื้นที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด



ภาพที่ 2-2 ขอบเขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ (สุภาพ ปารมี, รองลาภ สุขมาสรวง และสรพล กัณชัย, 2558)

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงาน

#### 3.1. ขออนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ยื่นข้อเสนอโครงการต่อพื้นที่อนุรักษ์ ในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อขออนุญาตเข้าไปสำรวจและเก็บตัวอย่าง และยื่นข้อเสนอโครงการเพื่อขอใช้สัตว์ในงานทางวิทยาศาสตร์ต่อคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.2. สำรวจและเก็บตัวอย่าง

##### 3.2.1. การเก็บตัวอย่างลูกอ๊อด

กำหนดพื้นที่ศึกษาในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่ โดยแบ่งพื้นที่การสำรวจออกเป็น 2 พื้นที่ คือ ลำธารและบึง ซึ่งลำธารใช้เป็นตัวแทนแหล่งอาศัยของลูกอ๊อดในพื้นที่น้ำไหล (ภาพที่ 3-1) และบึงใช้เป็นตัวแทนแหล่งอาศัยของลูกอ๊อดในพื้นที่น้ำนิ่ง (ภาพที่ 3-2) โดยพื้นที่น้ำไหล คือ แหล่งน้ำชั่วคราวที่มีการไหลของน้ำตลอดเวลา ในขณะที่พื้นที่น้ำนิ่ง คือ แหล่งน้ำขนาดเล็ก มีพื้นที่ประมาณ 1-10 ha หรือน้อยกว่า และมักมีระดับน้ำที่ตื้น น้อยกว่า 3 เมตร (Dodson, 2005) การสำรวจจะเก็บข้อมูลลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งที่อยู่อาศัยย่อยของลูกอ๊อด จำนวนกลุ่มของลูกอ๊อดแต่ละชนิดด้วยวิธี visual encounter และ strip transect เป็นระยะทาง 300 เมตรต่อพื้นที่ มีความกว้างของพื้นที่ศึกษา 5 เมตร ดัดแปลงวิธีจาก วัชรกร โสภณรัตน์ และคณะ (2556) ใช้เวลาในการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 เดือน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2563 โดยเก็บเดือนละ 1 ครั้ง ครั้งละ 2 คิน และทำการสำรวจคินละ 2 พื้นที่ สลับกันในแต่ละครั้งการสำรวจมีผู้สำรวจ 2 คน เริ่มทำการสำรวจตั้งแต่เวลา 19.00-22.00 น. เนื่องจากช่วงเวลากลางคืนสามารถเห็นลูกอ๊อดได้ชัดเจนมากกว่าช่วงเวลากลางวัน นอกจากนี้ยังเป็นเวลาที่สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานมีกิจกรรมออกหาอาหาร โดยในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะทำการวัดปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำและตะกอนดิน เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับเบื้องต้นว่าปัจจัยทางกายภาพมีของทั้งสองพื้นที่แตกต่างกันหรือไม่

##### 3.2.2. การเก็บข้อมูลแหล่งที่อยู่อาศัย

กำหนดพื้นที่อาศัยย่อยของลูกอ๊อด โดยแบ่งออกเป็นพื้นที่ย่อยดังนี้ 1. ผิวน้ำถึงกลางน้ำ เป็นช่วงตั้งแต่ใต้ท้องน้ำจนถึงก้นแหล่งน้ำประมาณ 2 เซนติเมตร 2. ก้นบ่อ คือช่วงระดับ



น้ำถัดจากระดับผิวน้ำและกลางน้ำจรดผิวดิน ตัดแปลงวิธีการศึกษาจาก Hiragond และ Saidapur ในปี ค.ศ. 2001 และ Melo และคณะ ในปี ค.ศ. 2017 บันทึกด้วยการบรรยาย ลักษณะแหล่งน้ำที่พบลูกอ๊อด เช่น ผิวดินมีตะกอนเศษใบไม้ทับถม โดยรอบมีต้นไม้น้ำขึ้นหนาแน่น เป็นต้น



ภาพที่ 3-1 พื้นที่น้ำไหล

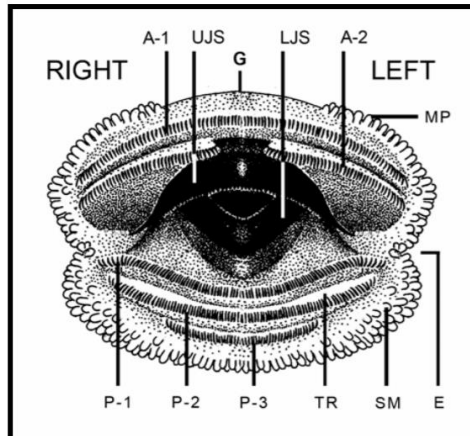


ภาพที่ 3-2 พื้นที่น้ำนิ่ง

### 3.3. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาลูกอ๊อด

ศึกษาลูกอ๊อดในระยะขาหลังเจริญแล้ว Gosner stage 27 – 38 โดยดูจากขาหลังของลูกอ๊อด อ้างอิงจาก Gosner ปี ค.ศ. 1960 จัดบันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของลูกอ๊อด ได้แก่ สีตัว ลักษณะโครงสร้างปาก ทำการถ่ายภาพโครงสร้างปาก และลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก ด้วยกล้อง

จุลทรรศน์แบบสเตอริโอไฮ์ท้อ ZEISS รุ่น Stemi DV4 กำลังขยาย 32 เท่า บรรยายลักษณะและรูปแบบตามสูตรโครงสร้างปากอ้างอิงจาก Inger ในปี ค.ศ. 1966 และ Altig ในปี ค.ศ. 2007 (ภาพที่ 3-4) จากนั้นวาดรูปโครงสร้างปาก และลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของลูกอ๊อด ภายนอก เช่น ลวดลายบนลำตัว และลักษณะแพนหาง เป็นต้น



ภาพที่ 3-3 ส่วนต่าง ๆ ของโครงสร้างปากลูกอ๊อด (Altig, 2007)

A (Anterior tooth rows) A-1 และ A-2 คือ แถวฟันด้านบน	P (Posterior tooth rows) คือ แถวฟันด้านล่าง
UJS (Upper jaw sheaths) จงอยปากบน	LJS (Lower jaw sheaths) จงอยปากล่าง
SM (Submarginal papillae) คือ ปุ่มหนังเล็ก ๆ ทั่วแผ่นปาก	MP (marginal papillae) ปุ่มหนังรอบช่องปาก
G (Dorsal gap) คือ ช่องว่างระหว่างปุ่มปาก	TR (Tooth ridge) คือ สันนูนของฟัน
E (Emargination) คือ ขอบเขตด้านข้างระหว่างแผ่นปากบนและล่าง	

### 3.4. การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) ในการระบุชนิดลูกอ๊อด

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อปลายหางของลูกอ๊อดที่รักษาสภาพด้วย 95% EtOH มาสกัดสารพันธุกรรมด้วย Invitrogen Kit จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ตำแหน่งยีน 16s rRNA เป็นเครื่องหมายในการระบุชนิด กระบวนการ annealing ใช้อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส ผลที่ได้จาก Sanger sequencing จะถูกนำมาตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ และตรวจสอบชนิดพันธุ์ของกบเขียดตัวเต็มวัยจาก GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับลูกอ๊อดมากที่สุดด้วยวิธีการ BLAST แล้วนำไปทำ phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood และ Bayesian Inference ใช้ *Lyciasalamandra luschani finikensis* เป็น outgroup ในการตรึงราก ในส่วนของ ML tree หาโมเดลที่เหมาะสมต่อข้อมูล โดยพิจารณาจากค่า *InL* ที่ต่ำที่สุด การจัดการ Gaps ใน alignment แบบ partial deletion ในการค้นหาแผนภูมิ

วิวัฒนาการที่ดีที่สุดใช้วิธี ML Heuristic search แบบ Subtree-Pruning-Regrafting - Extensive (SPR) ตรวจสอบความน่าเชื่อถือของแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Bootstrap จำนวน 1000 pseudoreplicates ใช้โปรแกรม Mega X (Arifin et al. 2018) ในขณะที่ BI tree ใช้โปรแกรม Mega X เพื่อหาโมเดลที่เหมาะสมต่อข้อมูล โดยพิจารณาจากค่า BIC ที่สูงที่สุด (Nascimento, Reis, and Yang, 2017) สร้างไฟล์ xml จาก alignment ด้วยโปรแกรม BEAUti v1.10.4 โดยตั้งค่า Clock Type แบบ Strick clock สร้าง Prior แบบ Coalescent tree: Constant Size (Kingman, 1982) ใช้อัลกอริทึม Markov Chain Monte Carlo (MCMC) จำนวน 10000000 generations เก็บข้อมูลทุก ๆ 100 generations สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการจากไฟล์ xml ด้วยโปรแกรม BEAST v1.10.4 จากนั้นนำไฟล์ tree ที่ได้มาทำการ burnin ทั้งสิ้น 10 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม TreeAnnotator v1.10.4 และนำไฟล์ log มาวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือด้วยโปรแกรม Tracer v1.7.2 โดยพิจารณาจากค่า ESS จากนั้นทำการแสดงแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม FigTree v1.4.4 (Suchard, Lemey, Baele, Ayres, Drummond, and Rambaut, 2018) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับลูกออดชนิดเดียวกันในประชากรอื่น ๆ และชนิดใกล้เคียง โดยใช้ฐานข้อมูลจากพิพิธภัณฑ์สถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและฐานข้อมูลจาก GenBank

### 3.5. วิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกออดที่พบในพื้นที่ กับลูกออดที่พบในพื้นที่อื่นในประเทศไทยที่มีการศึกษาก่อนหน้า เช่น อ้างอิงจาก Inthara et al. (2005), Aran et al. (2013), ปิยวรรณ นิยมวัน และคณะ (2562), พิชร ดนัยสวัสดิ์ (2552) และสุภัจฉรี อรัญ และคณะ (2555) รวมถึงนำข้อมูลปัจจัยทางกายภาพทั้งอุณหภูมิ น้ำ pH น้ำ และ pH ดิน มาวิเคราะห์ลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกออดแต่ละชนิด



## บทที่ 4 ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 หัวข้อหลัก ดังนี้

ส่วนที่ 4.1 ผลการระบุชนิดพันธุ์ของลูกอ๊อดด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยกล่าวถึงผลการ BLAST และนำเสนอความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สร้างด้วยวิธีการ Maximum likelihood และ Bayesian Inference

ส่วนที่ 4.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อด โดยกล่าวถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก ลักษณะโครงสร้างปาก นำเสนอภาพถ่ายและภาพวาด

ส่วนที่ 4.3 ผลการตรวจสอบแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด โดยกล่าวถึงลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย การใช้พื้นที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด (habitat use) ความหลากหลายชนิดของลูกอ๊อดทั้งสองพื้นที่ และลักษณะปัจจัยทางกายภาพได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ pH ตะกอนดิน และลักษณะตะกอนดินของทั้งสองพื้นที่

### 4.1. ผลการระบุชนิดพันธุ์ของลูกอ๊อดด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด

จากการสำรวจลูกอ๊อดตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคมเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 131 ตัว สามารถจำแนกชนิดลูกอ๊อดตามลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก และลักษณะโครงสร้างปากได้ 7 ชนิด โดยแบ่งเป็นลูกอ๊อดที่สามารถระบุชนิดได้อย่างแม่นยำ 4 ชนิด โดยอ้างอิงจาก พัชร ดนัยสวัสดิ์ และคณะ พ.ศ. 2553 ได้แก่ กบนา (*Hoplobatrachus rugurosus*) กบหนอง (*Fejervarya limnocharis*) เขียดหลังปุ่มที่ราบ (*Phrynoglossus martensii*) และ อึ่งข้างดำ (*Microhyla heymonsi*) ส่วนอีก 3 ชนิดมีลักษณะภายนอกที่จำแนกได้ยากจึงไม่สามารถระบุชนิดได้ อย่างไรก็ตามลูกอ๊อดทั้ง 7 ชนิดถูกนำไปตรวจสอบชนิดพันธุ์ด้วยวิธีการดีเอ็นเอบาร์โค้ด ชนิดละ 2-4 ตัว รวมทั้งหมด 17 ตัว เพื่อการระบุชนิดที่แม่นยำมากขึ้น ซึ่งสามารถระบุลูกอ๊อดได้ 3 วงศ์ 5 สกุล 7 ชนิด คือ

วงศ์ Dicroglossidae

*Fejervarya limnocharis*

กบหนอง

*Hoplobatrachus rugurosus*

กบนา

*Phrynoglossus martensii*

เขียดหลังปุ่มที่ราบ

วงศ์ Ranidae

*Sylvirana nigrovittata*

กบอ่องเล็ก

วงศ์ Microhylidae

*Microhyla heymonsi*

*Microhyla bermorei*

*Microhyla muklersuri*

โดยนำเสนอผลลำดับดีเอ็นเอ ข้อมูล BLAST และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการตามลำดับ ดังนี้

#### 4.1.1. ข้อมูล BLAST

การตรวจสอบชนิดของลูกอ๊อดโดยการนำลำดับดีเอ็นเอในตำแหน่ง 16s rRNA gene เพื่อหา query sequence ชนิดที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด ด้วยวิธีการ BLAST โดยแสดงผลการตรวจสอบของลำดับดีเอ็นเอมีค่า Percent Identity สูง 3 อันดับแรก ในแต่ละชนิด ซึ่งอยู่ในช่วง 99.17% ถึง 100.00% และค่า Query coverage เท่ากับ 100% ดังตารางที่ 4-1

#### 4.1.2. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลูกอ๊อด

##### 4.1.2.1. สร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Maximum likelihood

ใช้ลำดับดีเอ็นเอตำแหน่ง 16s RNA gene จากตัวอย่างลูกอ๊อด 17 ตัว และลำดับดีเอ็นเอของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกตัวเต็มวัยจาก GenBank ใช้ *Lyciasalamandra luschani finikensis* เป็น outgroup ในการตรึงราก โดยใช้โมเดล GTR+G+I เพื่อหาค่า  $lnL$  ที่ดีที่สุด ( $=-4924.059$ ) จากโปรแกรม Mega X ผลลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่างแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ PT1978 และ PT2206 จัดกลุ่มกับ *Sylvirana nigrovittata* (BS = 100), กลุ่มที่ 2 คือ PT1984 จัดกลุ่มกับ *Hoplobatrachus rugulosus* (BS = 100), กลุ่มที่ 3 คือ PT1879 และ PT2180 จัดกลุ่มกับ *Fejervarya limnocharis* (BS = 100), กลุ่มที่ 4 คือ PT1994 และ PT1980 จัดกลุ่มกับ *Phrynoglossus martensii* จัดกลุ่มกับ PT1980 (BS = 100) , กลุ่มที่ 5 คือ PT2214 จัดกลุ่มกับ *Microhyla bermorei* (BS = 97), กลุ่มที่ 6 คือ PT1972, PT1986, PT1995 จัดกลุ่มกับ *Microhyla heymonsi* (BS = 100) และกลุ่มที่ 7 คือ PT1897, PT1920, PT1943, PT1961, PT1983, PT2177 จัดกลุ่มกับ *Microhyla muklersuri* (BS = 100) ดังภาพที่ 4-1

##### 4.1.2.2. สร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Bayesian Inference

ใช้ลำดับดีเอ็นเอตำแหน่ง 16s RNA gene จากตัวอย่างลูกอ๊อด 17 ตัว และลำดับดีเอ็นเอของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกตัวเต็มวัยจาก GenBank ใช้ *Lyciasalamandra luschani finikensis* เป็น outgroup ในการตรึงราก โดยใช้โมเดล GTR+G เพื่อหาค่า BIC ที่ดีที่สุด ( $=-4924.059$ ) จากโปรแกรม Mega X ผลลำดับดีเอ็นเอของตัวอย่างแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ PT1978 และ

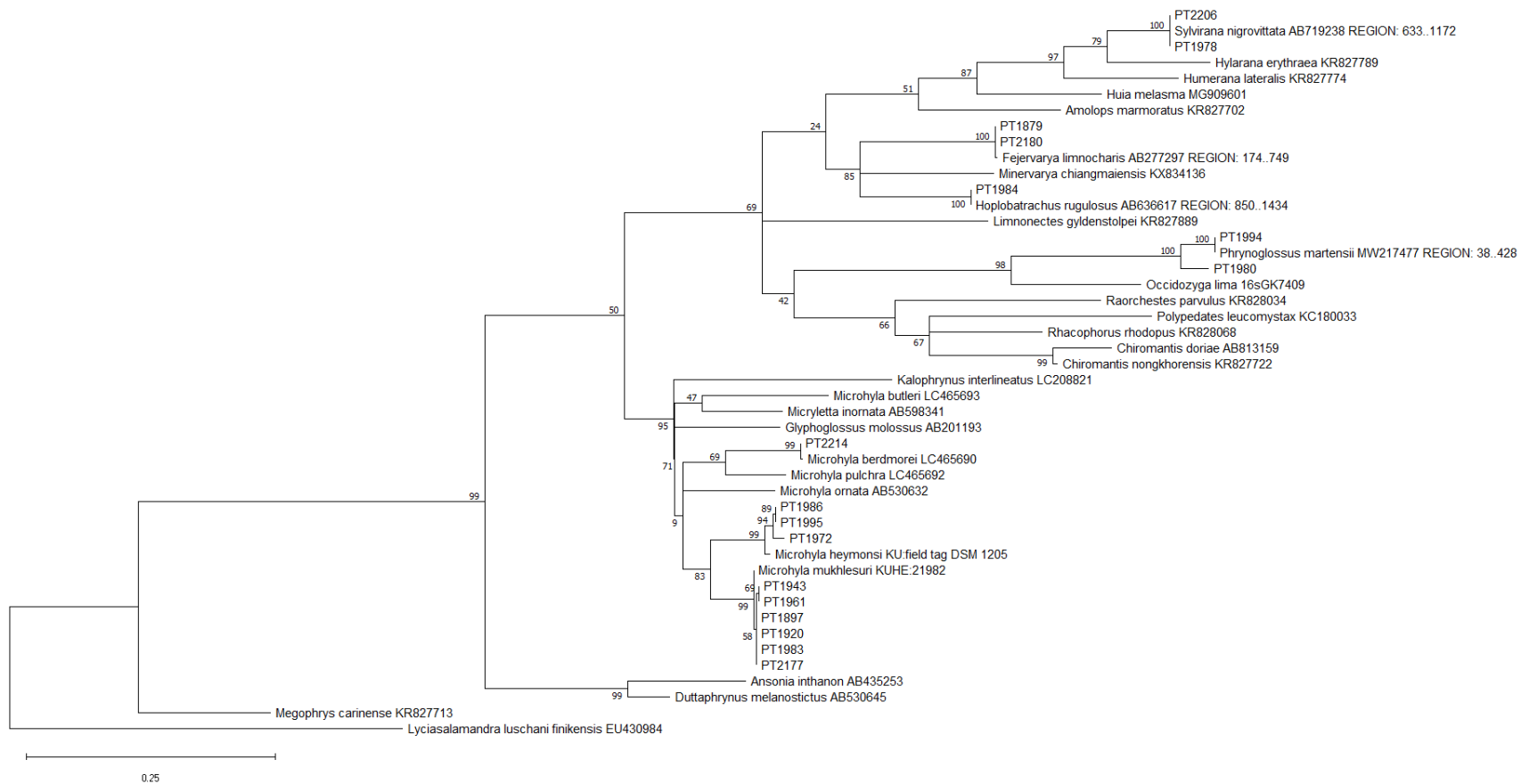
PT2206 จัดกลุ่มกับ *Sylvirana nigrovittata* (PP = 1), กลุ่มที่ 2 คือ PT1984 จัดกลุ่มกับ *Hoplobatrachus rugulosus* (PP = 1), กลุ่มที่ 3 คือ PT1879 และ PT2180 จัดกลุ่มกับ *Fejervarya limnocharis* (PP = 1), กลุ่มที่ 4 คือ PT1994 และ PT1980 จัดกลุ่มกับ *Phrynoglossus martensii* จัดกลุ่มกับ PT1980 (PP = 1), กลุ่มที่ 5 คือ PT2214 จัดกลุ่มกับ *Microhyla bermorei* (PP = 1), กลุ่มที่ 6 คือ PT1972, PT1986, PT1995 จัดกลุ่มกับ *Microhyla heymonsi* (PP = 1) และกลุ่มที่ 7 คือ PT1897, PT1920, PT1943, PT1961, PT1983, PT2177 จัดกลุ่มกับ *Microhyla muklersuri* (PP = 1) ดังภาพที่ 4-2

ตารางที่ 4-1 ข้อมูล BLAST ของลูกอ๊อดแต่ละชนิด

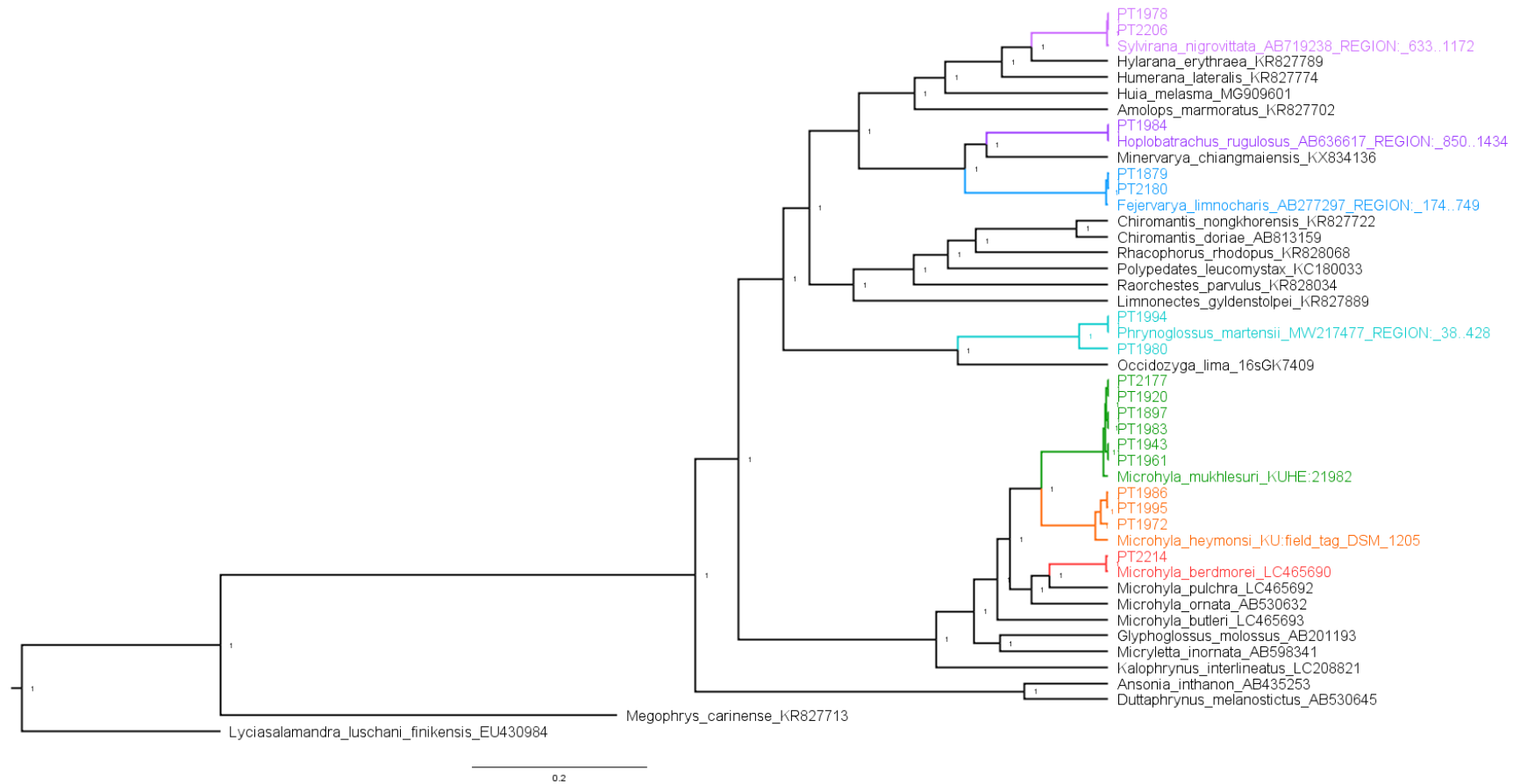
Field number	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Coverage	Percent Identity	Acc. Len	Accession
PT1879	<i>Fejervarya limnocharis</i>	697	697	100%	100.00%	569	MK621400.1
	<i>Fejervarya limnocharis</i>	697	697	100%	100.00%	566	MK621399.1
	<i>Fejervarya limnocharis</i>	697	697	100%	100.00%	571	MK958575.1
PT2180	<i>Fejervarya limnocharis</i>	697	697	100%	100.00%	569	MK621400.1
	<i>Fejervarya limnocharis</i>	697	697	100%	100.00%	566	MK621399.1
	<i>Fejervarya limnocharis</i>	697	697	100%	100.00%	571	MK958575.1
PT1978	<i>Sylvirana nigrovittata</i>	693	693	100%	100.00%	410	KR827818.1
	<i>Sylvirana nigrovittata</i>	693	693	100%	100.00%	1172	AB719238.1
	<i>Sylvirana nigrovittata</i>	684	684	100%	99.48%	410	KR827819.1
PT2206	<i>Sylvirana nigrovittata</i>	693	693	100%	100.00%	410	KR827818.1
	<i>Sylvirana nigrovittata</i>	693	693	100%	100.00%	1172	AB719238.1
	<i>Sylvirana nigrovittata</i>	684	684	100%	99.48%	410	KR827819.1
PT1984	<i>Hopobatrachus rugulosus</i>	692	692	100%	99.74%	543	DQ458250.1
	<i>Hopobatrachus rugulosus</i>	691	691	100%	99.74%	559	MG847619.1
	<i>Hopobatrachus rugulosus</i>	691	691	100%	99.74%	555	KY609321.1
PT1980	<i>Phrynoglossus martensii</i>	671	671	100%	98.21%	1975	MW007299.1
	<i>Occidozyga magnapustulosa</i>	671	671	100%	98.21%	567	MW217487.1
	<i>Phrynoglossus sp.</i>	666	666	100%	97.95%	417	KR827981.1

Field number	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Coverage	Percent Identity	Acc. Len	Accession
PT1994	<i>Phrynoglossus martensii</i>	706	706	100%	100.00%	570	MW217477.1
	<i>Phrynoglossus martensii</i>	706	706	100%	100.00%	568	MW217476.1
	<i>Occidozyga laevis</i>	701	701	100%	99.74%	480	AF215401.1
PT1897	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	685	685	100%	99.74%	1912	LC465683.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.84%	551	MG935903.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.48%	551	MG935896.1
PT1920	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.48%	1912	LC465683.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	676	676	100%	99.21%	551	MG935903.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	676	676	100%	99.21%	551	MG935896.1
PT1943	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	685	685	100%	99.74%	1912	LC465683.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.84%	551	MG935903.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.48%	551	MG935896.1
PT1961	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.48%	1912	LC465683.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	676	676	100%	99.21%	551	MG935903.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	676	676	100%	99.21%	551	MG935896.1
PT1983	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	685	685	100%	99.74%	1912	LC465683.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.48%	551	MG935903.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.48%	551	MG935896.1
PT2177	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	685	685	100%	99.74%	1912	LC465683.1
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.48%	551	MG935903.1

Field number	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Coverage	Percent Identity	Acc. Len	Accession
	<i>Microhyla mukhlersuri</i>	681	681	100%	99.48%	551	MG935896.1
PT1972	<i>Microhyla heymonsi</i>	660	660	100%	98.17%	862	MN534573.1
	<i>Microhyla heymonsi</i>	660	660	100%	98.17%	862	MN534570.1
	<i>Microhyla heymonsi</i>	660	660	100%	98.17%	409	KR827932.1
PT1986	<i>Microhyla heymonsi</i>	660	660	100%	98.17%	862	MN534573.1
	<i>Microhyla heymonsi</i>	660	660	100%	98.17%	862	MN534570.1
	<i>Microhyla heymonsi</i>	660	660	100%	98.17%	409	KR827932.1
PT1995	<i>Microhyla heymonsi</i>	678	678	100%	99.22%	409	KR827932.1
	<i>Microhyla heymonsi</i>	678	678	100%	99.22%	562	HM359087.1
	<i>Microhyla heymonsi</i>	669	669	100%	98.69%	862	MN534573.1
PT2214	<i>Microhyla berdmorei</i>	687	687	100%	99.74%	1918	LC465693.1
	<i>Microhyla berdmorei</i>	687	687	100%	99.74%	1918	LC465689.1
	<i>Microhyla berdmorei</i>	687	687	100%	99.74%	551	KU840572.1



ภาพที่ 4-1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลูกอ๊อดด้วยวิธีการ Maximum likelihood โดยไมโทคอนเดรียลยีน 16rRNA



ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลูกอ๊อดด้วยวิธีการ Bayesian Inference โดยไมโทคอนเดรียลยีน 16rRNA



#### 4.2. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อด

เมื่อทำการระบุชนิดลูกอ๊อดด้วยดีเอ็นบาร์โค้ด ซึ่งมีทั้งหมด 7 ชนิด คือ *Fejervarya limnocharis* (กบหนอง), *Hoplobatrachus rugulosus* (กบนา), *Sylvirana nigrovittata* (กบอ่องเล็ก), *Phrynoglossus martensii* (เขียดหลังปุ่มที่ราบ), *Microylla heymonsii* (อึ่งข้างดำ), *Microhyla berdmorei* (อึ่งแม่หนาว) และ *Microhyla muklersuri* (อึ่งน้ำเต้า) นำลูกอ๊อดแต่ละชนิดมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธีการบรรยายประกอบภาพถ่าย ภาพวาดโครงสร้างปาก ภาพวาดลูกอ๊อดด้านข้าง ด้านหลัง และด้านท้อง เพื่อแสดงรายละเอียดได้ชัดเจนมากขึ้น

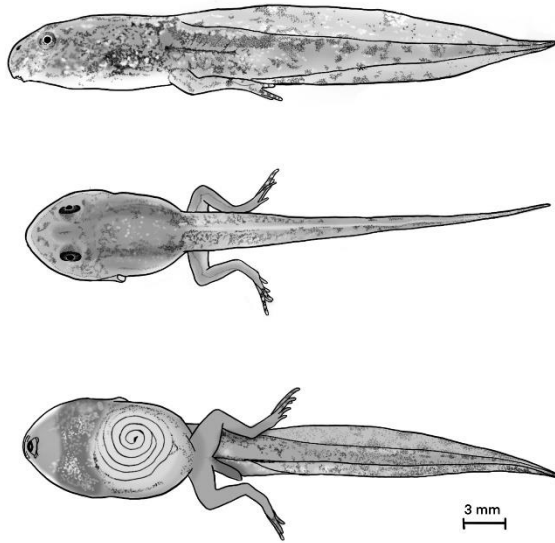
#### *Fejervarya limnocharis* กบหนอง

##### ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของลูกอ๊อด

ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงปลายหาง 3-4 เซนติเมตร อัตราส่วนระหว่างส่วนหัวกับส่วนหาง ประมาณ 1:2 ส่วนลำตัวกลมรีและป้อม ตาอยู่ทางด้านข้างค่อนข้างมาทางด้านบนหัว ทั้งสองข้างห่างกัน ประมาณ 3-4 มิลลิเมตร รูจมูกอยู่บริเวณกึ่งกลางของปลายปากค่อนข้างมาทางด้านบน ห่างจากจุดกึ่งกลางของตาทั้งสองข้างประมาณ 1-2 มิลลิเมตร รูเปิดช่องเหงือกเป็นท่อนสั้นอยู่ทางด้านซ้ายเฉียงขึ้น ด้านบนเล็กน้อย ส่วนท้องเป็นสีขาวมองเห็นลำไส้ไม่ชัดเจน แต่เมื่อรักษาสภาพไว้สักระยะเวลาหนึ่งบริเวณท้องจะใสจนเห็นลำไส้ชัดเจนกึ่งกลางลำตัวขดตามเข็มนาฬิกา มีรูเปิดทวารเปิดออกกลางลำตัวอยู่ระหว่างขาสองข้างยาวประมาณ 1:6 ของลำตัว ส่วนบนของท่อติดกับครีบท่าง ส่วนหางเป็นแผ่นแบน อัตราส่วนระหว่างความหนาสุดของกล้ามเนื้อหาง (TMH) กับความกว้างสุดของครีบท่าง (MTH) ประมาณ 1:2 ลำตัวมีสีน้ำตาลอมเหลือง ส่วนหางมีแต้มจุดดำกระจายทั่วหาง ครีบท่างมีจุดสีขาวเล็ก ๆ สลับแต้มจุดสีดำ



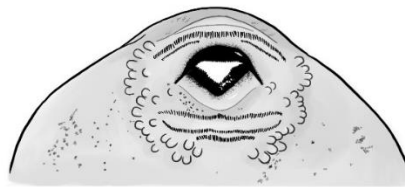
ภาพที่ 4-3 ภาพถ่ายลูกอ๊อดกบหนอง (*Fejervarya limnocharis*)



ภาพที่ 4-4 ภาพวาดลูกอ๊อดกบหนอง (*Fejervarya limnocharis*)

#### โครงสร้างปาก

ปากอยู่ทางด้านหน้าค่อนข้างมาทางด้านล่างของลำตัว ปลายปากมนจุ่มลง เมื่อหงายปากขึ้นพบว่า บริเวณด้านบนของปากเรียบ รอบช่องปากมีปุ่มหนังเล็ก ๆ (submarginal papillae และ marginal papillae) จงอยปากด้านบนโค้งยาวครอบจงอยปากด้านล่าง ลักษณะคล้ายใบเลื่อย ในขณะที่จงอยปากด้านล่างสั้นกว่าเป็นรูปตัว V ด้านบนช่องปากมีฟัน 2 แถว แถวที่ 1 ยาว แถวที่ 2 ขาดกลาง แถวฟันด้านล่างมี 3 แถว โดยแถวที่ 3 สั้นกว่า 2 แถวด้านบน



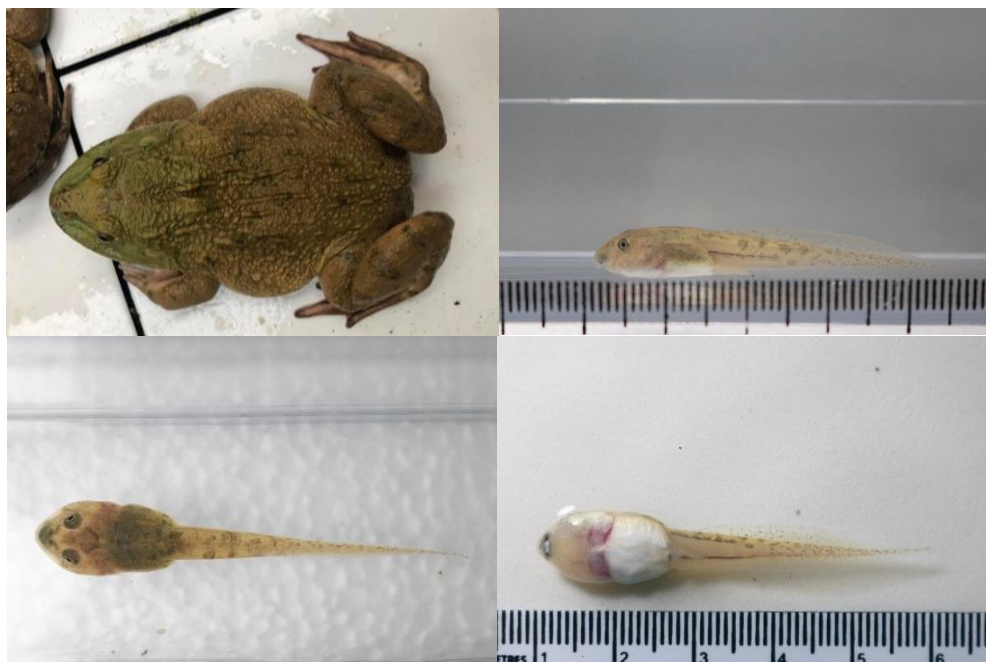
ภาพที่ 4-5 ภาพวาดปากลูกอ๊อดกบหนอง (*Fejervarya limnocharis*)

#### *Hoplobatrachus rugurosus* กบนา

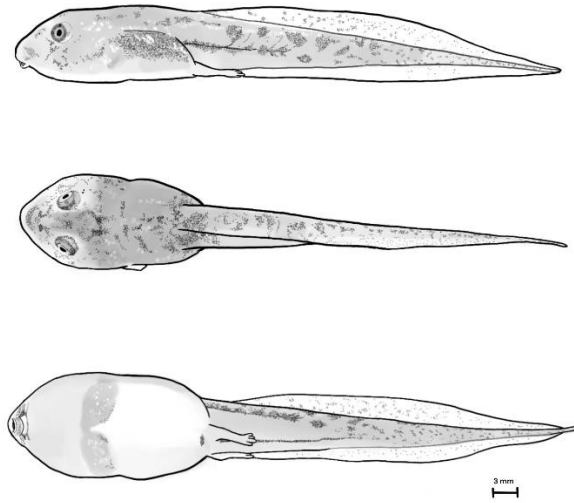
##### ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของลูกอ๊อด

ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงปลายหาง 5-6 เซนติเมตร อัตราส่วนระหว่างส่วนหัวกับส่วนหาง ประมาณ 1:3 ส่วนหัวที่กว้างมากที่สุดอยู่แนวตา ช่วงท้องแคบกว่าช่วงหัว ตาอยู่ทางด้านข้างค่อนข้างมาทางด้านบนหัวและหันค่อนข้างมาทางด้านหน้า ทั้งสองข้างห่างกันประมาณ 3 มิลลิเมตร รูจมูกอยู่บริเวณ

กึ่งกลางของปลายปากก่อนมาทางด้านบน ห่างจากจุดกึ่งกลางของตาทั้งสองข้างประมาณ 2 มิลลิเมตร รูเปิดช่องเหงือกเป็นท่อสั้นอยู่ทางด้านซ้ายเฉียงขึ้นด้านบนเล็กน้อย ส่วนท้องเป็นสีขาวมองไม่เห็นลำไส้ จากภายนอก มีรูเปิดทวารเปิดออกกลางลำตัวอยู่ระหว่างขาสองข้าง มีรูขนาดใหญ่ ส่วนบนของท่อติดกับครีบท่าง หางเรียวยาวแบนหางกว้างกว่าลำตัวเล็กน้อย อัตราส่วนระหว่างความหนาสุดของกล้ามเนื้อหาง (TMH) กับความกว้างสุดของครีบท่าง (MTH) ประมาณ 1:1 ลำตัวมีสีน้ำตาลอมเหลือง ช่วงกลางลำตัวมีสีเข้มกว่าส่วนอื่น ส่วนหางมีแต้มจุดดำกระจายเล็กน้อย ครีบท่างใสมีจุดดำเล็ก ๆ กระจายทั่ว



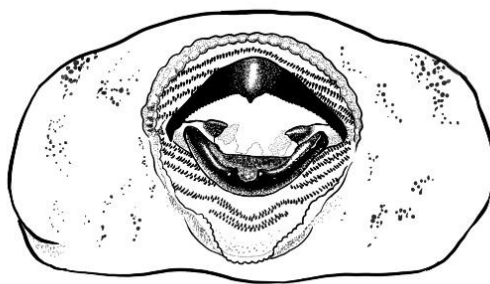
ภาพที่ 4-6 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดกบนา (*Hoplobatrachus rugosus*)



ภาพที่ 4-7 ภาพวาดลูกอ๊อดคบบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)

#### โครงสร้างปาก

ปากอยู่ปลายสุดของหัวเปิดออกทางด้านล่าง ปลายปากแหลม แผ่นหนังรอบปากมีขนาดใหญ่ โดยแผ่นบนจะจุ่มครอบแผ่นล่าง บริเวณขอบมีรอยหยัก ไม่มีปุ่มหนัง จงอยปากมีขนาดใหญ่ จงอยด้านบนบริเวณตรงกลางแหลมลงมา จงอยด้านล่างมีขนาดใหญ่กว่า ตรงกลางเป็นร่องรับกับปลายแหลมของแถวบน ภายในช่องปากถัดจากจงอยเล็กน้อยมีเขี้ยวอยู่ภายในทั้งด้านซ้ายและขวา ด้านบนช่องปากมีฟัน 3 แถว แถวฟันด้านล่างมี 4 แถว โดยแถวที่ 4 สั้นกว่า 3 แถวด้านบน



ภาพที่ 4-8 ภาพวาดปากลูกอ๊อดคบบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)

#### *Sylvirana nigrovittata* กบอ่องเล็ก

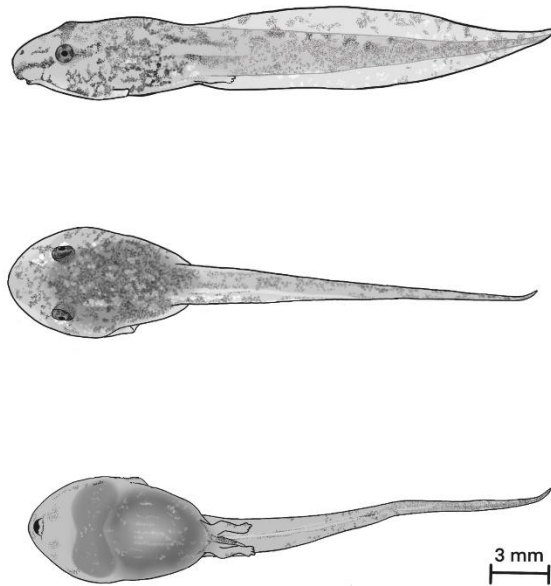
##### ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของลูกอ๊อด

ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงปลายหาง 2-3 เซนติเมตร อัตราส่วนระหว่างส่วนหัวกับส่วนหางประมาณ 1:2 ส่วนหัวที่กว้างมากที่สุดอยู่แนวตา ช่วงท้องแคบกว่าช่วงหัว ลักษณะลำตัวกลมมนคล้าย

รูปไข่ ตาอยู่ทางด้านข้างก่อนมาทางด้านบนหัว ทั้งสองข้างห่างกันประมาณ 2 มิลลิเมตร รูจมูกอยู่บริเวณกึ่งกลางของปลายปากก่อนมาทางด้านบน ห่างจากจุดกึ่งกลางของตาทั้งสองข้างประมาณ 2 มิลลิเมตร รูเปิดช่องเหงือกเป็นท่อนสั้นอยู่ทางด้านซ้ายเฉียงขึ้นด้านบนเล็กน้อย ส่วนท้องเป็นสีขาวมองเห็นลำไส้ไม่ชัดเจน มีรูเปิดทวารเปิดออกกลางลำตัวอยู่ระหว่างขาสองข้างปลายท่อเอียงไปทางด้านขวายาวประมาณ 2 มิลลิเมตร แพนหางกว้างกว่าลำตัวเล็กน้อย ปลายหางวัดขึ้นเล็กน้อย ครีบทงที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณปลายหาง อัตราส่วนระหว่างความหนาสุดของกล้ามเนื้อหาง (TMH) กับความกว้างสุดของครีบทง (MTH) ประมาณ 1:2 ลำตัวมีสีน้ำตาลแดงหรือมีสีดำ อาจมีแถบสีดำ 2 เส้นพาดจากปากไปยังตาทั้งสองข้าง บริเวณหลังและท้องมีจุดขาว จุดดำกระจายทั่ว อาจเห็นจุดต่อกันเป็นวงติดกัน ส่วนหางมีแต้มจุดดำกระจายเล็กน้อย ครีบทงใสมีจุดดำเล็ก ๆ กระจายทั่ว



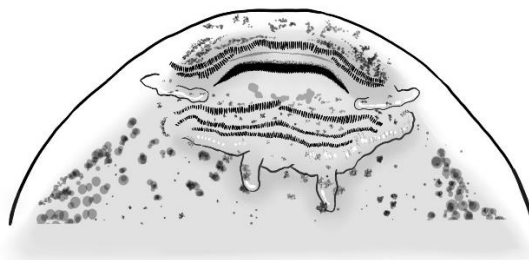
ภาพที่ 4-9 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดกบอ่องเล็ก (*Sylvirana nigrovittata*)



ภาพที่ 4-10 ภาพวาดลูกออดกบอ่องเล็ก (*Sylvirana nigrovittata*)

#### โครงสร้างปาก

ปากอยู่ทางด้านล่าง ปลายปากมนและกว้าง ด้านบนของช่องปากเรียบ ไม่มีแผ่นปาก ด้านล่างมีแผ่นปากขนาดใหญ่บริเวณขอบมีรอยหยัก ถัดขึ้นมาด้านข้างมีแผ่นหนังขนาดเล็ก ไม่มีปุ่มหนัง จงอยปากด้านบนกว้างลักษณะขอบจอยคล้ายใบเลื่อย จงอยปากด้านล่างเล็กซ่อนอยู่ด้านหลังของจงอยปากบน ด้านบนช่องปากมีฟัน 2 แถว โดยแถวที่ 2 ขาดตอน ฟันด้านล่างมี 3 แถว



ภาพที่ 4-11 ภาพวาดปากลูกออดกบอ่องเล็ก (*Sylvirana nigrovittata*)

## *Phrynoglossus martensii* เขียดหลังปุ่มที่ราบ

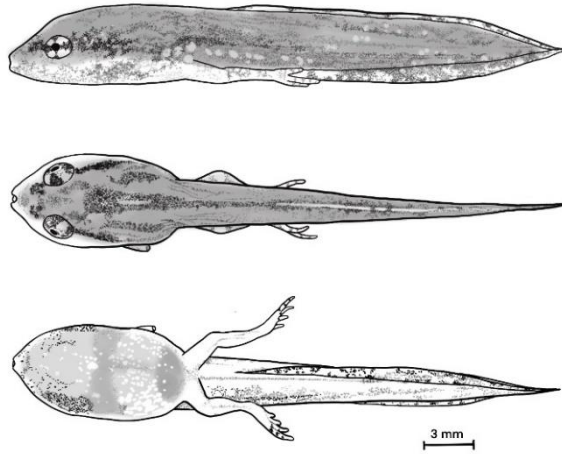
### ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของลูกอ๊อด

ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงปลายหาง 2.5-3 เซนติเมตร อัตราส่วนระหว่างส่วนหัวกับส่วนหางประมาณ 1:2 ส่วนหัวที่กลมรีคล้ายรูปไข่ ตาอยู่ทางด้านข้างค่อนข้างค่อนมาทางด้านบนและหันค่อนมาทางด้านหน้า ทั้งสองข้างห่างกันประมาณ 2 มิลลิเมตร รูจมูกอยู่ใกล้ตามากกว่าปลายปากห่างจากตาประมาณ 1 มิลลิเมตร รูเปิดช่องเหงือกเป็นท่อสั้นติดกับลำตัวตลอดท่ออยู่ทางด้านซ้ายเฉียงขึ้นด้านบนเล็กน้อย ส่วนท้องขาวขุ่นมองไม่เห็นลำไส้จากภายนอก มีรูเปิดทวารยื่นออกจากลำตัวเล็กน้อยไม่มีส่วนติดกับครีบท่าง หางเรียวยาวขนานไปกับพื้น แพนหางกว้างเท่ากับลำตัว อัตราส่วนระหว่างความหนาสุดของกล้ามเนื้อหาง (TMH) กับความกว้างสุดของครีบท่าง (MTH) ประมาณ 1:1 ลำตัวมีสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลแดง มีแถบดำจากรูจมูกพาดผ่านตาไปยังโคนหาง ขนานลำตัวทั้งสองข้าง อาจเห็นแถบดำจางพาดจากปลายปากไปยังปลายหาง บริเวณท้องมีจุดขาวกระจายทั่ว ส่วนหางมีแต้มจุดดำกระจายเล็กน้อย ครีบท่างใสออกเทา มีจุดดำและจุดขาว กระจายทั่ว



ภาพที่ 4-12 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดเขียดหลังปุ่มที่ราบ (*Phrynoglossus martensii*)

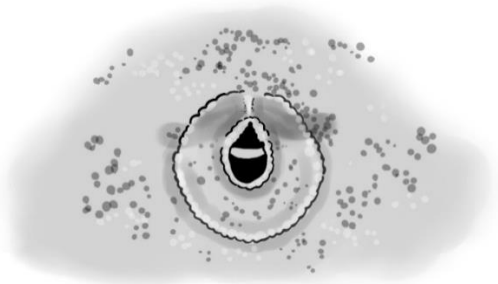




ภาพที่ 4-13 ภาพวาดลูกอ๊อดเขียดหลังปุ่มที่ราบ (*Phrynoglossus martensii*)

#### โครงสร้างปาก

ปากอยู่ปลายสุดของหัวเปิดออกทางด้านหน้า ปลายปากแหลมลักษณะเป็นท่อ แผ่นหนังห่อรอบช่องปากลักษณะคล้ายเกือกม้าซ้อนกัน 2 ชั้น บริเวณขอบมีปุ่มหยักตั้ง ๆ ไม่มีปุ่มหนัง จงอยปากอยู่ลึกเข้าไปด้านในช่องปาก จงอยปากบนยาวเลยจงอยปากล่าง ไม่มีซี่ฟัน



ภาพที่ 4-14 ภาพวาดปากลูกอ๊อดเขียดหลังปุ่มที่ราบ (*Phrynoglossus martensii*)

#### *Microyla heymonsi* อึ่งข้างดำ

##### ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของลูกอ๊อด

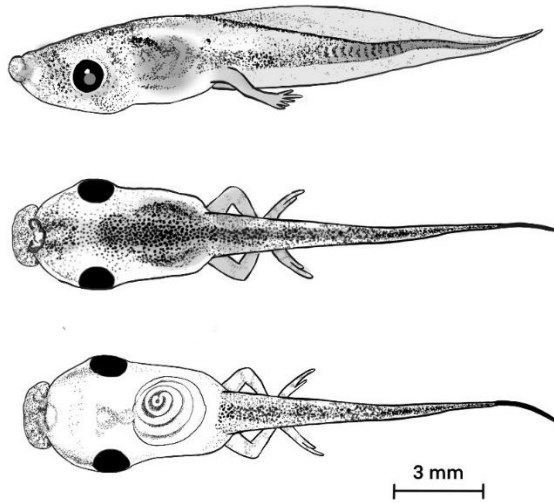
ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงปลายหาง 2.5 เซนติเมตร อัตราส่วนระหว่างส่วนหัวกับส่วนหางประมาณ 1:2 ส่วนหัวเรียวขอบบริเวณกลางลำตัว ช่วงท้องแคบกว่าช่วงหัวเล็กน้อย เมื่อมองด้านข้าง ช่วงท้องบริเวณใต้มีลักษณะโค้งโป่งกว่าช่วงลำไส้ ตาอยู่ทางด้านข้าง ทั้งสองข้างห่างกันประมาณ 3 มิลลิเมตร รูจมูกอยู่บริเวณกึ่งกลางระหว่างปลายปากและตา ห่างจากจุดกึ่งกลางของตาทั้งสองข้าง



ประมาณ 1 มิลลิเมตร รูเปิดช่องเหงือกเป็นท่อนสั้นอยู่ทางด้านซ้ายเฉียงขึ้นด้านบนเล็กน้อย ส่วนท้องเป็นสีขาวมองไม่เห็นลำไส้จากภายนอก มีรูเปิดทวารเปิดออกกลางลำตัวอยู่ระหว่างขาสองข้าง มีรูขนาดใหญ่ ส่วนบนของท่อนติดกับครีบหาง หางเรียวยาวแหลม ปลายหางเป็นเส้นคล้ายเส้น แพนหางกว้างกว่าลำตัวเล็กน้อย อัตราส่วนระหว่างความหนาสุดของกล้ามเนื้อหาง (TMH) กับความกว้างสุดของครีบหาง (MTH) ประมาณ 1:1 ลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน บริเวณหลังอาจมีแถบดำพาดจากปลายปากไปจนถึงปลายหาง กลางหลังมีลายคล้ายห้าเหลี่ยมคว่ำ ปลายหางสีส้มเมื่อมองจากด้านบนอาจพบจุดขาว 1 จุดอยู่เกือบปลายของหาง หรืออีกลักษณะหนึ่ง คือ สีลำตัวเข้มออกดำ ปลายหางไม่มีสี เมื่อมองจากด้านบนอาจพบจุดขาว 1 จุดอยู่เกือบปลายของหาง



ภาพที่ 4-15 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดอิงข้างดำ (*Microylla heymonsi*)



ภาพที่ 4-16 ภาพวาดลูกอ๊อดอิงข้างดำ (*Microhyla heymonsi*)

#### โครงสร้างปาก

ปากอยู่ปลายสุดของหัวเปิดออกทางด้านหน้า ช่องปากมีลักษณะเป็นช่องแคบครึ่งวงกลม มีรอยหยักรอบช่องปาก แผ่นหนังขยายเป็นแผ่นลักษณะเป็นจานอยู่ทางด้านล่าง ไม่มีปุ่มหนัง ไม่มีงอยปาก ไม่มีซี่ฟัน



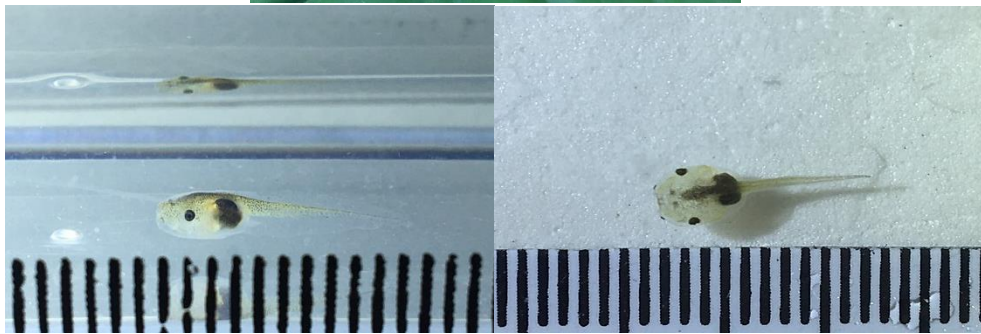
ภาพที่ 4-17 ภาพวาดปากลูกอ๊อดอิงข้างดำ (*Microhyla heymonsi*)

#### *Microhyla berdmorei* อึ่งแม่หนาว

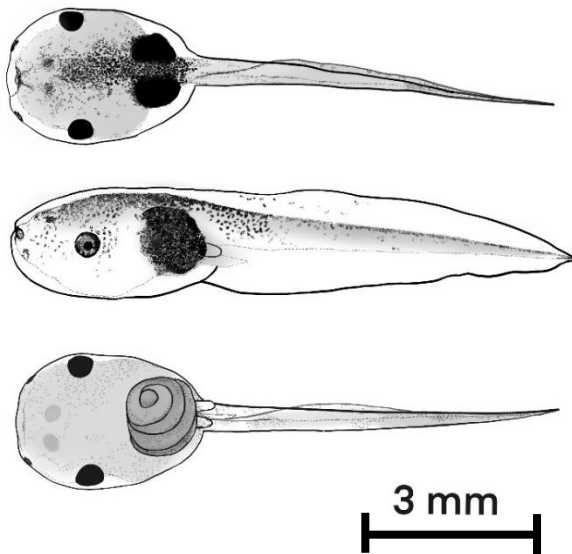
##### ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของลูกอ๊อด

ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงปลายหาง 1.5 เซนติเมตร อัตราส่วนระหว่างส่วนหัวกับส่วนหาง ประมาณ 1:1.5 ส่วนหัวกลมป้อม ตาอยู่ทางด้านข้าง ทั้งสองข้างห่างกันประมาณ 3 มิลลิเมตร รูจมูก อยู่กึ่งกลางระหว่างปลายปากและตา ห่างจากจุดกึ่งกลางของตาทั้งสองข้างประมาณ 1 มิลลิเมตร รูเปิดช่องเหงือกเป็นท่อสั้นอยู่ทางด้านท้ายของท้อง ส่วนท้องใสมองเห็นลำไส้ชัดเจนเป็นก้อนวนทวนเข็มนาฬิกา

นาฬิกา รูปเปิดทวารเป็นท่อใสยาวปลายแหลมเปิดออกกลางลำตัว หางแบนกว้าง แพนหางส่วนบนกว้าง ขนานกับส่วนบนของลำตัว แพนหางส่วนกว้างที่สุดอยู่ทางด้านล่างใกล้กับส่วนท้ายสุดของลำตัว อัตราส่วนระหว่างความหนาสุดของกล้ามเนื้อหาง (TMH) กับความกว้างสุดของครีบกาง (MTH) ประมาณ 1:2 ลำตัวใส บริเวณกลางหลังมีลายรูปน้ำเต้า ปลายปากมีแต้มจุดสีดำอยู่ทั้งข้างของปาก ครีบกางใสมีจุดดำเล็ก ๆ กระจายทั่ว



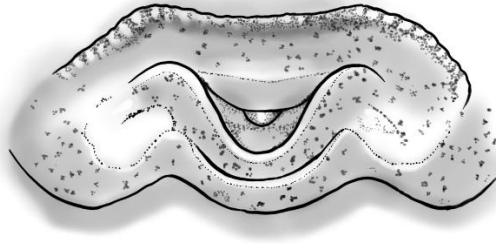
ภาพที่ 4-18 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดอิงแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*)



ภาพที่ 4-19 ภาพวาดลูกอ๊อดอิงแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*)

## โครงสร้างปาก

ปากอยู่ทางด้านหน้าค่อนมาทางด้านบน ด้านบนช่องปากมีริมฝีปากนูนขึ้นเล็กน้อย ขอบเป็นรอยหยักตื้น ๆ ขอบปากส่วนล่างหยักคล้ายตัว W ถัดเข้ามารอบช่องปากส่วนล่างหยักคล้ายตัว U หรือครึ่งวงกลม ภายในช่องปากมีตุ่มเนื้อใสยื่นออกมาเล็กน้อย ไม่มีตุ่มหนัง ไม่มีจงอยปากและไม่มีซี่ฟัน



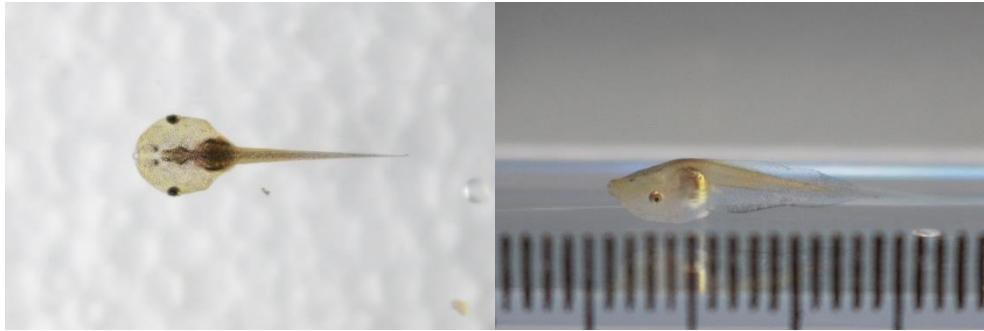
ภาพที่ 4-20 ภาพวาดปากลูกอ๊อดอิงแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*)

## *Microhyla muklersuri* อึ่งน้ำเต้า

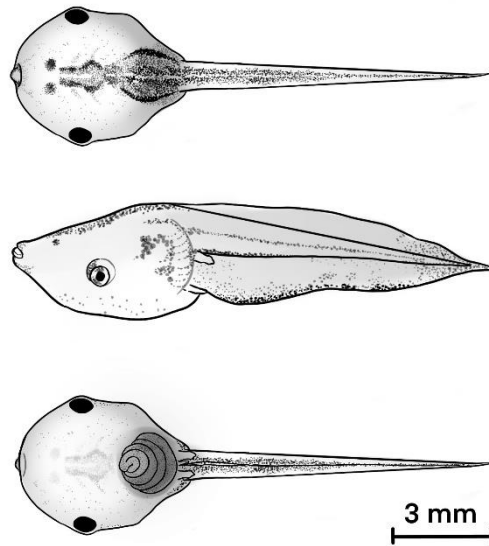
### ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของลูกอ๊อด

ความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงปลายหาง 1.5 เซนติเมตร อัตราส่วนระหว่างส่วนหัวกับส่วนหางประมาณ 1:2 ลักษณะลำตัวกลมป้อมมองจากด้านบนช่วงลำตัวป้าน ส่วนท้ายหักและคอดจนถึงโคนหาง มองด้านข้างจะเห็นส่วนบนของหัวชันลงมาจนถึงปาก เห็นปากเขี้ยวขึ้นเล็กน้อย ตาอยู่ทางด้านข้างทั้งสองข้างห่างกันประมาณ 3 มิลลิเมตร รูจมูกอยู่กึ่งกลางระหว่างปลายปากและตา ห่างจากจุดกึ่งกลางของตาทั้งสองข้างประมาณ 1 มิลลิเมตร รูเปิดช่องเหงือกเป็นท่อสั้นเปิดออกเกือบส่วนท้ายทางด้านท้อง ส่วนท้องใสมองเห็นลำไส้ชัดเจน เข้มนาฬิกา รูเปิดทวารเป็นท่อใสเปิดออกกลางลำตัวอยู่ระหว่างขาสองข้างปลายท่อชี้ลงด้านล่าง หางเรียวยาวแพนหางเล็กกว่าลำตัวเล็กน้อย โคนหางหักลงเล็กน้อยทำให้ปลายหางชี้ลง อัตราส่วนระหว่างความหนาสุดของกล้ามเนื้อหาง (TMH) กับความกว้างสุดของครีบทอง (MTH) ประมาณ 1:2 ลำตัวใสอมเหลือง บริเวณกลางหลังมีลายคล้ายเครื่องหมาย <> อาจมีเส้นแถบดำจาง ๆ พาดจากลำไส้จนถึงปลายหาง ครีบทองใสขอบครีบทองอาจมีสีดำ มีจุดดำเล็ก ๆ กระจายทั่วลำตัว



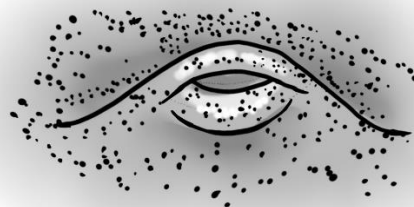


ภาพที่ 4-21 ภาพถ่ายตัวเต็มวัยและลูกออดอิ่งน้ำเต้า (*Microhyala muklersuri*)



ภาพที่ 4-22 ภาพวาดลูกออดอิ่งน้ำเต้า (*Microhyala muklersuri*)

โครงสร้างปาก



ภาพที่ 4-23 ภาพวาดปากลูกออดอิ่งน้ำเต้า (*Microhyala muklersuri*)

ปากอยู่ปลายสุดของหัวเปิดออกทางด้านหน้า ปลายปากมน ด้านบนช่องปากมีริมฝีปากบน ชื้นเล็กน้อยโค้งลงมาเป็นครึ่งวงกลม ขอบริมฝีปากเรียบ ส่วนล่างของช่องปากมีตุ่มเนื้อใสน้อยออกมา เล็กน้อยคล้ายริมฝีปาก รูปตัว U ไม่มีตุ่มหนังรอบช่อง ไม่มีงอยปากและไม่มีซี่ฟัน

#### 4.3. ลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด

##### 4.3.1. ลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัยและการใช้พื้นที่อาศัยของลูกอ๊อด

จากการศึกษาแหล่งที่อยู่อาศัยและการใช้พื้นที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อดในพื้นที่น้ำนิ่งและพื้นที่น้ำไหล ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 พบว่า บางชนิดพบทั้งในพื้นที่น้ำนิ่งและพื้นที่น้ำไหล ได้แก่ อึ่งข้างดำ (*Microhyla heymonsi*) อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla muklersuri*) และ เขียดหลังปุ่มที่ราบ (*Phrynoglossus martensii*) บางชนิดพบในพื้นที่น้ำนิ่งเพียงอย่างเดียว ได้แก่ กบหนอง (*Fejervarya limnocharis*) กบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) และบางชนิดพบในพื้นที่น้ำไหลเพียงอย่างเดียว ได้แก่ กบอ่องเล็ก (*Sylvirana nigrovittata*) อึ่งแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*)

ตารางที่ 4-2 ข้อมูลการพบลูกอ๊อด (การใช้พื้นที่อยู่อาศัย) ในพื้นที่น้ำนิ่งและพื้นที่น้ำไหล

ชนิด	พื้นที่น้ำนิ่ง (ตัว)	พื้นที่น้ำไหล (ตัว)
<i>Fejervarya limnocharis</i> (กบหนอง)	62	0
<i>Hoplobatrachus rugulosus</i> (กบนา)	1	0
<i>Sylvirana nigrovittata</i> (กบอ่องเล็ก)	0	2
<i>Phrynoglossus martensii</i> (เขียดหลังปุ่มที่ราบ)	1	1
<i>Microhyla heymonsi</i> (อึ่งข้างดำ)	5	62
<i>Microhyla berdmorei</i> (อึ่งแม่หนาว)	0	8
<i>Microhyla muklersuri</i> (อึ่งน้ำเต้า)	17	6

#### พื้นที่น้ำนิ่ง

1. แหล่งน้ำในแปลงข้าว น้ำค่อนข้างตื้นเขินลึกประมาณ 15-20 เซนติเมตร มีน้ำขังเพียงชั่วคราว โดยรอบมีกอข้าวหนาแน่น น้ำขุ่น ดินมีลักษณะอ่อนนุ่ม เป็นดินร่วนเหนียวปนตะกอนทราย มีซากใบไม้และรากพืชทับถมปะปน พบลูกอ๊อดกบหนอง (*Fejervarya limnocharis*) ลูกอ๊อดกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) และลูกอ๊อดเขียดหลังปุ่มที่ราบ (*Phrynoglossus martensii*) โดยจะพบลูกอ๊อดทั้ง 3 ชนิดอยู่บริเวณผิวดินของแอ่งน้ำ





ภาพที่ 4-24 แหล่งน้ำในแปลงข้าว พื้นที่การเกษตร

2. แอ่งน้ำขังใกล้แปลงข้าว ลึกประมาณ 30 เซนติเมตร มีน้ำขังชั่วคราว โดยรอบมีหญ้าและพืช น้ำล้อมรอบ น้ำค่อนข้างขุ่น ดินมีลักษณะอ่อนนุ่ม เป็นดินร่วนเหนียวปนตะกอนทราย มีใบไม้ทับถม พบลูกอ๊อดอิงข้างดำ (*Microhyla heymonsi*) อยู่ระดับผิวน้ำ และลูกอ๊อดอิงน้ำเต้า (*Microhyla mukhlersuri*) อยู่ระดับผิวน้ำหรือกลางน้ำ



ภาพที่ 4-25 แอ่งน้ำขังใกล้แปลงข้าว พื้นที่การเกษตร

### พื้นที่น้ำไหล

1. แอ่งน้ำชั่วคราวบริเวณพื้นที่ศึกษาธรรมชาติ เป็นปลายทางของลำธาร น้ำค่อนข้างใส มีพืชน้ำ ล้อมรอบขอบแอ่งน้ำ ดินมีลักษณะอ่อนนุ่ม เป็นดินร่วนเหนียวปนตะกอนทราย มีใบไม้ รากพืชและกิ่ง ไม้ทับถมกันปนกับดิน พบลูกอ๊อดบริเวณขอบแอ่งน้ำ ได้แก่ ลูกอ๊อดอิงข้างดำ (*Microhyla heymonsi*) อยู่ระดับผิวน้ำ และลูกอ๊อดอิงน้ำเต้า (*Microhyla mukhlersuri*) อยู่ระดับผิวน้ำหรือ กลางน้ำ



ภาพที่ 4-26 แอ่งน้ำชั่วคราวบริเวณพื้นที่ศึกษาธรรมชาติ

2. ลำธารบริเวณฝายกั้นน้ำ น้ำใส พื้นที่เปิดโล่ง มีพืชน้ำล้อมรอบ น้ำบริเวณขอบต้นและลึกกลางลำธาร ระดับน้ำแต่ละเดือนไม่เท่ากัน ดินมีลักษณะอ่อนนุ่ม เป็นดินร่วนเหนียวปนตะกอนทราย มีใบไม้ทับถม พบลูกอ๊อดอิงน้ำเต้า (*Microhyla mukhlersuri*) อยู่ระดับผิวน้ำหรือกลางน้ำ ลูกอ๊อดเขียวดหลังปุ่มที่ราบ (*Phrynoglossus martensii*) อยู่ระดับผิวดินในน้ำใกล้กับไม้ล้มลุกใกล้ขอบแอ่งน้ำ และลูกอ๊อดกบอ่องเล็ก (*Sylvirana nigrovittata*) อยู่ผิวดินในน้ำบริเวณขอบแอ่งน้ำ



ภาพที่ 4-27 ลำธารบริเวณฝายกั้นน้ำ พื้นที่ศึกษาธรรมชาติ

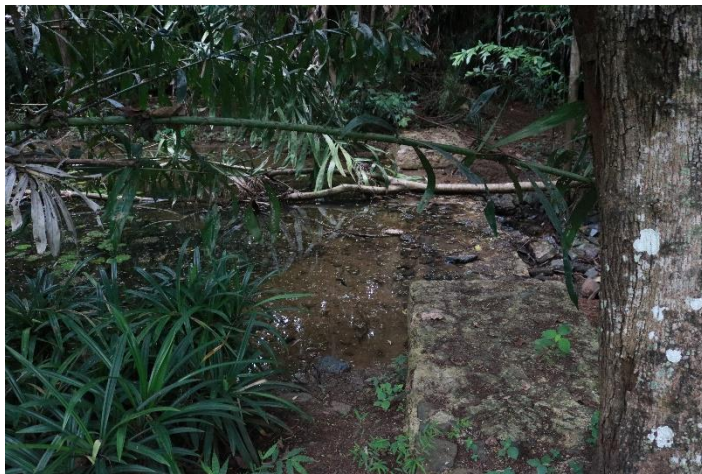
3. ลำธารบริเวณฝายกั้นน้ำ เป็นแหล่งน้ำชั่วคราวใกล้ถนนในพื้นที่ศึกษาธรรมชาติ น้ำค่อนข้างใส ดินมีลักษณะอ่อนนุ่ม เป็นดินร่วนเหนียวปนตะกอนทราย มีใบไม้ทับถมหนา พบลูกอ๊อดอิงแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*) อยู่บริเวณใกล้ต้นไม้ ลอยอยู่ระดับผิวน้ำถึงกลางน้ำ ลูกอ๊อดกบอ่องเล็ก (*Sylvirana nigrovittata*) อยู่ผิวดินในน้ำใกล้ฝาย





ภาพที่ 4-28 ลำธารบริเวณฝายกั้นน้ำ ไกล่ถนนในพื้นที่ศึกษาธรรมชาติ

4. ลำธารบริเวณทางเดินศึกษาธรรมชาติ เป็นแหล่งน้ำชั่วคราว ล้อมรอบด้วยไม้ล้มลุก และพืชน้ำเล็กน้อย ระดับน้ำค่อนข้างลึก ด้านข้างของแอ่งน้ำเป็นดินลาดชันเล็กน้อย น้ำใส ดินมีลักษณะอ่อนนุ่ม เป็นดินร่วนเหนียวปนตะกอนทราย มีใบไม้ทับถมหนา พบลูกอ๊อดกบอ่องเล็ก (*Sylvirana nigrovittata*) อยู่ผิวดินใกล้ขอบลำธาร



ภาพที่ 4-29 ลำธารบริเวณทางเดินศึกษาธรรมชาติ

#### 4.3.2. ลักษณะตะกอนดินในแหล่งที่อยู่อาศัยของลูกอ๊อด

ลักษณะตะกอนดินที่เก็บมาจากพื้นที่ย่อยทั้งในพื้นที่น้ำนิ่งและพื้นที่น้ำไหลนำมาจำแนกชนิดของดินด้วยวิธีการ USDA Soil Texture Triangle พบว่าดินทั้งพื้นที่มีลักษณะเหมือนกัน คือ ดินร่วนเหนียวปนตะกอนทราย (Silty loam)

#### 4.3.3. ปัจจัยทางกายภาพในแต่ละเดือน

จากการวัดปัจจัยทางกายภาพในแต่ละเดือนได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ pH น้ำ และ pH ดิน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563 พบว่า ปัจจัยทางกายภาพในพื้นที่น้ำนิ่งและพื้นที่น้ำไหลไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4-4 และตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-3 ข้อมูลปัจจัยทางกายภาพในพื้นที่น้ำนิ่งตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563

เดือน	อุณหภูมิ น้ำ (องศาเซลเซียส)	pH น้ำ	pH ดิน
กรกฎาคม	27.4	6.0	6.5
สิงหาคม	26.9	6.0	6.0
กันยายน	24.6	6.5	6.4
ตุลาคม	25.8	6.5	6.5
พฤศจิกายน	23.0	7.0	7.0
ธันวาคม	20.3	6.4	7.0

ตารางที่ 4-4 ข้อมูลปัจจัยทางกายภาพในพื้นที่น้ำไหลตั้งแต่เดือนกรกฎาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2563

เดือน	อุณหภูมิ น้ำ (องศาเซลเซียส)	pH น้ำ	pH ดิน
กรกฎาคม	24.7	6.0	6.5
สิงหาคม	25.0	6.0	6.5
กันยายน	25.3	6.5	6.5
ตุลาคม	23.8	6.8	6.5
พฤศจิกายน	21.8	6.9	6.5
ธันวาคม	18.8	5.5	6.0

## บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

### 5.1. การระบุชนิดลูกอ๊อดด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

จากการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถจำแนกลูกอ๊อดทั้งหมด 3 วงศ์ 5 สกุล 7 ชนิด ได้แก่ กบหนอง (*Fejervarya limnocharis*), กบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*), กบอ่องเล็ก (*Sylvirana nigrovittata*), เขียดหลังปุ่มที่ราบ (*Phrynoglossus martensii*), อึ่งข้างดำ (*Microyla heymonsii*), อึ่งแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*) และอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla muklersuri*) เมื่อนำข้อมูลดีเอ็นเอมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Maximum likelihood และ Bayesian Inference และนำผลของแผนภูมิวิวัฒนาการของทั้งสองมาเปรียบเทียบกัน พบว่า แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Maximum likelihood มีโทโพโลยี (topology) ที่คล้ายคลึงกับแผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Bayesian Inference โดยแบ่งออกเป็น 7 เคลด (clade) ซึ่งแต่ละเคลดหรือแต่ละชนิดมีค่า bootstrap ระดับที่ดี โดยมีค่า  $BS \geq 95\%$  (Nei and Kumer, 2000) และ posterior probability ระดับที่ดี โดย  $PP > 0.95$  (Suzuki et al. 2002) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และความถูกต้องของการระบุชนิดลูกอ๊อด

### 5.2. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อด

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อดเทียบกับการศึกษาสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อดในพื้นที่เตรียมจัดตั้งอุทยานแห่งชาติเขาสิบห้าชั้น จังหวัดจันทบุรี ของพัชร ดนัยสวัสดิ์ ในปี พ.ศ. 2552 พบว่าลูกอ๊อดที่ระบุชนิดด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่พบในพื้นที่ศึกษาครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกันกับลูกอ๊อดที่พบในพื้นที่ศึกษาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ เป็นการสนับสนุนว่าสามารถใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดลูกอ๊อดได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อดที่ศึกษากับงานวิจัยอื่นพบว่าอาจมีความแตกต่างเล็กน้อยภายในชนิดเดียวกันระหว่างพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่กับพื้นที่อื่น เช่น ลูกอ๊อดอึ่งแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*) จากพื้นที่ที่ศึกษา มีลักษณะแต่มีจุดสีดำบริเวณข้างปากทั้งสองข้าง ในขณะที่ลูกอ๊อดอึ่งแม่หนาวจากพื้นที่เตรียมจัดตั้งอุทยานแห่งชาติเขาสิบห้าชั้น จังหวัดจันทบุรี ไม่มีลักษณะดังกล่าว เป็นต้น ซึ่งความแปรผันของลักษณะสัณฐานวิทยาดังกล่าวอาจแสดงถึงความหลากหลายทางชีวภาพที่ซ่อนเร้นอยู่ (cryptic diversity) ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

### 5.3. แหล่งที่อยู่อาศัยและการใช้พื้นที่ของลูกอ๊อด

จากการศึกษาพบว่า ลูกอ๊อดแต่ละชนิดอยู่ในแหล่งอาศัยที่แตกต่างกัน โดยลูกอ๊อดบางชนิดอาศัยอยู่ในพื้นที่น้ำนิ่งเพียงอย่างเดียว ได้แก่ กบนา กบหนอง บางชนิดอาศัยในพื้นที่น้ำไหลเพียงอย่างเดียว ได้แก่ กบอ่องเล็ก อึ่งแม่หนาว และบางชนิดพบอาศัยทั้งในพื้นที่น้ำนิ่งและพื้นที่น้ำไหล ได้แก่ อึ่ง

ข้างดำ อิ่งน้ำเต้า และเขียดหลังปุมที่ราบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ พัชร ดนัยสวัสดิ์ ในปี พ.ศ. 2552 และ วาทีณี จุทอง ในปี พ.ศ. 2558

แหล่งน้ำในพื้นที่น้ำนิ่งที่ศึกษามีลักษณะเป็นแอ่งน้ำขังชั่วคราว อยู่ในพื้นที่การเกษตร ดินมีลักษณะอ่อนนุ่ม เป็นดินโคลนปนตะกอนทราย มีซากใบไม้และรากพืชทับถมปะปน มีพืชทางการเกษตรขึ้นล้อมรอบ ในขณะที่แหล่งน้ำในพื้นที่น้ำไหลเป็นแหล่งน้ำชั่วคราวที่มีน้ำไหลเอื่อย ๆ อยู่ในพื้นที่ป่า มีไม้ล้มลุกและพืชน้ำล้อมรอบแหล่งน้ำประปราย ดินมีลักษณะอ่อนนุ่ม เป็นดินโคลนปนตะกอนทราย มีใบไม้ทับถมหนา ซึ่งจากที่กล่าวมาข้างต้น ลักษณะพื้นที่น้ำนิ่งและพื้นที่น้ำไหลค่อนข้างแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามปัจจัยทางกายภาพของทั้งสองพื้นที่ ได้แก่ อุณหภูมิ น้ำ pH น้ำ pH ดิน และลักษณะตะกอนดินไม่ต่างกัน อาจกล่าวได้ว่าปัจจัยทางกายภาพเหล่านี้อาจไม่ได้มีผลต่อการอยู่อาศัยของลูกอ๊อดมากนัก (พัชร ดนัยสวัสดิ์, 2552) แต่เป็นปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเลือกใช้พื้นที่ของลูกอ๊อด เช่น ลำธารและแหล่งน้ำที่มีน้ำตลอดปี (ศรีวรรณ จิระสุขทวีกุล, 2534 และ ณรงค์ฤทธิ์ ศุขปราคาร, 2546) ความแรงของกระแส (วรรณวิภา คงเจริญ, 2550) เป็นต้น

## บทที่ 6

### สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

#### 6.1. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่า เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการระบุชนิดของลูกอ๊อด โดยมีหลักฐานสนับสนุน ได้แก่ แผนภูมิวิวัฒนาการที่มีระดับความเชื่อมั่นที่สูง ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อด โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกอ๊อดบางชนิดระหว่างพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่ กับพื้นที่อื่นในงานวิจัยก่อนหน้ามีความแปรผัน ซึ่งอาจแสดงถึงความหลากหลายทางชีวภาพที่ซ่อนเร้น นอกจากนี้พบว่าปัจจัยทางกายภาพที่ศึกษาไม่มีผลต่อการใช้พื้นที่ของลูกอ๊อด

การศึกษานี้ยังสามารถนำมาใช้ในการจัดการพื้นที่อนุรักษ์ในลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ซึ่งเป็นพื้นที่ป่าต้นน้ำที่สำคัญทางภาคเหนือของประเทศไทย และแสดงให้เห็นบทบาทและความสำคัญของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีต่อทั้งระบบนิเวศบกและระบบนิเวศน้ำ

#### 6.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

1. ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควรวัดข้อมูลเชิงปริมาณ เช่น ความยาวจากปลายปากถึงหัว ความกว้างของแพนหาง เป็นต้น เพื่อให้เห็นถึงความแปรผันทางสัณฐานที่ชัดเจนขึ้น
2. ควรสำรวจตัวอย่างลูกอ๊อดให้ครอบคลุมทุกฤดูกาล เพื่อเก็บตัวอย่างได้ครอบคลุมมากขึ้น
3. ควรวัดระดับน้ำที่ลูกอ๊อดอาศัยในขณะที่อยู่นิ่ง เพื่อศึกษาแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย โดยกำหนดเป็นระดับผิวน้ำ กลางน้ำ และบริเวณผิวดิน
4. ควรใช้สถิติในการเปรียบเทียบความแตกต่างของปัจจัยทางกายภาพระหว่างสองพื้นที่
5. ควรศึกษาปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการใช้พื้นที่ของลูกอ๊อด เช่น ความแรงของกระแส น้ำ ลำธาร และแหล่งน้ำที่มีน้ำตลอดปี เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง

### ภาษาไทย

- โกวิท น้อยโคตร. 2545. ความหลากหลายชนิดของกบตัวเต็มวัยและลูกอ๊อด ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขาคิชฌกูฏ จังหวัดจันทบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 70-232.
- ธัญญา จั่นอาจ. 2546. คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย. กรุงเทพมหานคร: ด่านสุทธาการพิมพ์. 175 หน้า.
- นริศ ภูมิภาคพันธุ์. 2539. สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย การสำรวจศึกษาทรัพยากรชีวภาพในพื้นที่อนุรักษ์ฯ. การบริหารการจัดการพื้นที่อนุรักษ์ และการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ (2). ศูนย์วิจัยป่าไม้ คณะวนศาสตร์, กองฝึกอบรมกรมป่าไม้ กรุงเทพมหานคร.
- ปิยวรรณ นิยมวัน, ไพรวลัย ศรีสม และปริญญา ภูวังคะนันท์. 2562. Amphibians of Thailand สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของประเทศไทย. ราชบุรี: มูลนิธิกระต่ายในดวงจันทร์. 485 หน้า.
- ผุสดี ปริยานนท์, วิเชษฐ์ คนชื้อ, สุภาพ บาร์มี, อนุสรณ์ ปานสุข และรชตะ มณีอินทร์. 2558. ความหลากหลายของชนิดสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ. เชียงใหม่: โรงพิมพ์ทิพย์เนตร.
- พัชร ดนัยสวัสดิ์, อาจอง ประทัดสุนทรสาร และวิเชษฐ์ คนชื้อ. 2553. วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย: สันฐานวิทยาของลูกอ๊อดบางชนิด ในพื้นที่เตรียมจัดตั้งอุทยานแห่งชาติเขาสิบชั้น จังหวัดจันทบุรี. 17(1). หน้า 64-103.
- วาทีณี จุทอง. 2558. ความหลากหลายชนิดและสันฐานวิทยาของอึ่งในสกุลอึ่งน้ำเต้า (*Microhyala* Tschudi, 1838) ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วัทธิกร โสภณรัตน์, จิรัชย์ อาคะจักร และอัญชลี เออาผล. 2556. การใช้ถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานตามระดับความสูงในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย. ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วุฒิ ทักษิณธรรม, วัชรภรณ์ รวมธรรม, บุญลือ พูลนิล และวีรยุทธ์ เลาหะจินดา. 2553. การเปรียบเทียบความหลากหลายชนิดกบและการเลือกใช้ถิ่นอาศัยในพื้นที่อุทยานแห่งชาติกุยบุรี และพื้นที่เกษตรกรรมใกล้เคียง. 17(1). หน้า 104-123.
- สุภาพ ปารมี, รองลาภ สุขมาสรวง และ สุรพล กัณชัย. 2558. การศึกษาความหลากหลายของสัตว์ในพื้นที่ลุ่มน้ำห้วยฮ่องไคร้ จังหวัดเชียงใหม่. แบบรายงานความก้าวหน้าของการวิจัย ปี 2558, หน้า 25-62. เชียงใหม่: ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ.

สุภัจฉรี อรัญ, จันทรทิพย์ ช่วยเงิน, สุธี ดวงใจ และ ยอดชาย ช่วยเงิน. 2555. วารสารสัตว์ป่า  
เมืองไทย: สัณฐานวิทยาของลูกอ๊อดบางชนิดในมหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น.  
19(1). หน้า 41–73.

### ภาษาอังกฤษ

- Aowphol, A., Thirakhupt, K., Nabhitabhata, J., and Voris, H.K. 2006. Foraging ecology of the Tokay gecko, *Gekko gecko* in the residential area in Thailand. *Amphib-Reptil.* 27(4): 491–503.
- Arifin, U., Smart, U., Hertwig, S.T., Smith, E.N., Iskanadar, T., and Haas, A. 2018. Molecular phylogenetic analysis of a taxonomically unstable ranid from Sumatra, Indonesia, reveals a new genus with gastromyzophorous tadpoles and two new species. *Zoosystematics and Evolution.* 94(1): 163-193.
- Chapman, A.D. 2009. Number of living species in Australia and the world, 2<sup>nd</sup> edition, Australian Biological Resources study. Canberra. <https://environment.gov.au/>
- Dang, N.X., Sun, F.H., LV, Y.Y., Zhao, B.H., Wang, J.C., Murphy, R.W., Wang, W.Z., and Li, J.T. 2015. DNA barcoding and the identification of tree frogs (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, DNA Sequencing, and Analysis.* 27(4): 2574–2584.
- Fatorelli, P., and Costa, P.N., Laia, R.C., Almeidasantos, M., Van Sluys, M., and Rocha, C.F.D. 2010. Description, microhabitat, and temporal distribution of the tadpoles of *Proceratophrys tupinamba* Prado and Pombal, 2008. *Zootaxa.* 2684: 54-62.
- Frost, D.R. 2021. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (02/01/2021). New York (USA): American Museum of Natural History, Electronic database. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging Anuran embryos and larvae with notes on Identification. *Herpetologica.* 16(8): 183–190.
- Grosjean, S., Ohler, A., Chuaynkern, Y., Cruaud, C., and Hassanin, A. 2015. Improving biodiversity assessment of anuran amphibians using DNA barcoding of tadpoles. Case studies from Southeast Asia. *C. R. Biologies.* 338: 351-361.

- Hawley, T.J. 2009. The ecological significance and incidence of intraguild predation and cannibalism among anurans in ephemeral tropical pools. *Copeia*. <https://dx.doi.org/10.1643/>
- Hebert, P.N.D., Ratnasingham, S., and deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- Hebert, P.N.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., and Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 14812-14817.
- Hebert, P.D.N., and Gregory, T.R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Sys. Biol.* 54(5): 852-859.
- Hiragond, N.C., and Saidapur S.K. 2001. Microhabitat Choice of Tadpoles of Seven Anuran Species. *Curr Herpetol.* 20(1): 51-60.
- Hocking, D.J., and Babbitt K.J. (2014). Amphibian contribution to ecosystem services. *Herpetol Conserv Biol.* 9(1): 1-17.
- Inger, R.F. 1966. The systematic and zoogeography of amphibians of Borneo. Chicago: Field Museum of Natural History.
- Kingman, J.F.C. 2000. Origins of Coalescent: 1974-1982. *Genetics.* 156(4): 1461-1463.
- Kohler, J., Vieites, D.R., Bonett, R.M., Garcia, F.H., Glaw, F.H., Glaw, F., Steinke, D., and Vences, M. 2005. Boots in species discoveries in a highly endangered vertebrate group: new amphibians and global conservation. *BioScience.* 55: 693-696.
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological Methodology* 2, California: Addison Wesley Longman.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz C., and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 35(6): 1547-1549.
- Laudet, V., and Molecular Zoology Team. 2011. The Origins and Evolution of Vertebrate Metamorphosis. *Curr Biol.* 21(18): 726-737.
- McDiarmid, R.W., and Altig, R. 1999. *Tadpoles: The Biology of Anura Larva*. Chicago: University of Chicago Press.
- Melo, L., Gonçalves-Souza, T., Gonçalves-Souza, T. and de Cerqueira Rossa-Feres, D. (2017). *Herpetol J.* 27(4): 339-345.



- Nascimento, F.F., Reis, M.D., and Yang, Z. 2017. A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. *Nature ecology and evolution*. 1: 1446-1454.
- Nei, M., and Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York. Oxford University Press, Inc.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard M.A., and Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol*. 61(3): 539–542.
- Sachs, L.M., and Buchholz, D.R. 2019. Insufficiency of thyroid hormone in frog metamorphosis and the role of glucocorticoids. *Front. Endocrinol.* <https://frontiersin.org/>
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, D.L., Fischman, D.L., and Waller, R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *306*: 1783-1786.
- Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J., and Rambaut, A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*. 4(1).
- Taylor, E.H. 1962. The amphibian fauna of Thailand. *The University of Kansas Science Bulletin*. 43: 312–456.
- Vitt, L.J., and Caldwell, J.P. 2014. *Herpetology (Fourth Edition): Anatomy of Amphibians and Reptiles*. Academic Press. 407–443.
- Waddle, J.H. 2006. *Use of Amphibians as Ecosystem Indicator species*. Doctoral dissertation, Department of Philosophy, University of Florida.
- Wilson, J.J., Sing, K.W., and Jaturas, N. 2019. DNA Barcoding: Bioinformatics Workflows for Beginners. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 3: 985–995.

ภาคผนวก

## ภาคผนวกที่ 1 ลำดับดีเอ็นเอของลูกอ๊อด

การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยวิธีการ Sanger sequencing ของลูกอ๊อดแต่ละชนิด ได้ความยาวของลำดับเบส 573-597 bp โดยมีลำดับเบสของ *Fejervarya limnocharis* 2 ตัว, *Hoplobatrachus rugurosus* 1 ตัว, *Sylvirana nigrovittata* 2 ตัว, *Phrynoglossus martensii* 2 ตัว, *Microyla heymonsi* 3 ตัว, *Microhyla berdmorei* 1 ตัว และ *Microhyla muklersuri* 6 ตัว ซึ่งภายในชนิดเดียวกันมีลำดับเบสที่เหมือนกันในตำแหน่ง 16s rRNA

### 1. *Fejervarya limnocharis*

Field number: PT1879 Length: 597 bp

```
CCCCGCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACTTCCATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGATA  
CTATTAACGGCCGCGGTACCCTGACCGTGCGAAGGTAGCATAATAACTTGTTCTTTAAATGGG  
GACTAGCATGAACGGCATCACGAGGGTCTCACTGTCTCCTTTTTCTAATCAGTGAAACTGATCT  
CCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACCCAATA  
GACACCTCTGACTAATCTAACCCAAAACACTTCTTAAGTTCTGTCTATTGGTTTTAGGTTGGGGT  
GACCACGGAGTACAATAAATCCTCCATGACGTACGGGACTTCCCTCTTATCCTTGAACCACATT  
TCTAAGAATCAACAAATTGACGTTTGATGATCCAATATATTGATCAACGGACCAAGTTACCCTG  
GGGATAACAGCGCAATCCATTTTAAGAGCCCCTATCGCCAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTG  
GATCAGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAATGGTTTGTGTTCAACAATTAACCCCTA  
CGTGATCTGAGTTCAGACCA
```

Field number: PT2180 Length: 597 bp

```
CCCCGCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACTTCCATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGATA  
CTATTAACGGCCGCGGTACCCTGACCGTGCGAAGGTAGCATAATAACTTGTTCTTTAAATGGG  
GACTAGCATGAACGGCATCACGAGGGTCTCACTGTCTCCTTTTTCTAATCAGTGAAACTGATCT  
CCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACCCAATA  
GACACCTCTGACTAATCTAACCCAAAACACTTCTTAAGTTCTGTCTATTGGTTTTAGGTTGGGGT  
GACCACGGAGTACAATAAATCCTCCATGACGTACGGGACTTCCCTCTTATCCTTGAACCACATT  
TCTAAGAATCAACAAATTGACGTTTGATGATCCAATATATTGATCAACGGACCAAGTTACCCTG  
GGGATAACAGCGCAATCCATTTTAAGAGCCCCTATCGCCAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTG  
GATCAGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAATGGTTTGTGTTCAACAATTAACCCCTA  
CGTGATCTGAGTTCAGACCA
```

2. *Hoplobatrachus rugurosus*

Field number: PT1984 Length: 587 bp

CCAAAAACATCGCCTCTTGATAAAATATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACATAGTTAAACGG  
CCGCGGTACCCTGACCGTGCGAAGGTAGCATAATCACTTGTTCTTTAAATGGGGACTCGTATCA  
ACGGCATCACGAGGGCTTTACTGTCTCCTTTCTCCAATCAGTGAAACTGATCTCCCCGTGAAGA  
AGCGGGGATGACAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACCCAACGACACCCCTCAA  
CCCCCCAACCCATTATAGTTGCTACAGCCCTGTTGTTGGTTTTAGGTTGGGGTGACCGCGGA  
GTATAAATTACCCTCCACGACGAATGGGACTACCCCTTACCCAAGAGCTACTCCTCTAAGGAT  
CAACAGATTGACGTAAAATGATCCAAGCATTGATCAACGGACCAAGTTACCCTGGGGATAACA  
GCGCAATCCATTTCAAGAGCTCCTATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT  
ACCCAAGTGGTGCAGCCGCTACTAATGGTTTGTGTTTCAACAATTA AACCCCTACGTGATCTG  
AGTTCAGACCA

3. *Sylvirana nigrovittata*

Field number: PT1978 Length: 594 bp

CCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGACTCCCATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACAT  
AAAGTTCAACGGCCGCGTAACCTAACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCTCTAAATAG  
GGACTTGATCAACGGCATCACGAGGGCTATACTGTCTCCTTTCTCCAATCAGTGAAACTGATC  
TCCCCGTGAAGAAGCGGGGATTTTTTTATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAGCAACAC  
ATTTACTTTTTATCTTTTATATCAACTTAATAAAATACCTAAGTATTAGCTTTAGGTTGGGGGA  
CCGCGGAGTATAACCTAACCTCCACGACAAATGGGCCACGCCCTTATCCACGAGCCACAACCTCT  
AAGAATCAATAAACTGATGTTTAATGATCCGATAATTCGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGG  
ATAACAGCGCAATCTACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTAGGTTTACGACCTCGATGTTGGAT  
CAGGGTATCCTAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTGTTTTGTTCAACGATTA AACCCCTACGT  
GATCTGAGTTCAGACCA

Field number: PT2206 Length: 594 bp

ACCAAAAACATCGCCTCTTGACTCCCATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACATAAAGTTCAAC  
GGCCGCGGTAACCTAACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCTCTAAATAGGGACTTGTAT  
CAACGGCATCACGAGGGCTATACTGTCTCCTTTCTCCAATCAGTGAAACTGATCTCCCCGTGAA

GAAGCGGGGATTTTTTTATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAGCAACACATTTACTTTT  
TATCTTTTATATCAACTTAATAAAATACCTAAGTATTAGCTTTAGGTTGGGGGACCGCGGAGTA  
TAACCTAACCTCCACGACAAATGGGCCACGCCCTTATCCACGAGCCACAACCTCTAAGAATCAAT  
AAACTGATGTTTAATGATCCGATAATTTCGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGC  
AATCTACTTCAAGAGCCCCTATCGACAAGTAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCC  
TAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTGTTTGTTCACGATTA AACCCCTACGTGATCTGAGTT  
CAGACCA

4. *Phrynoglossus martensii*

Field number: PT1980 Length: 595 bp

GCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGTTTAAAGTATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGATAAT  
TTATTCAACGGCCGCGTAATTTAAAGCGCGCAAAGGTAGCGTAATCACTTGTTCTTTAAATGAG  
GACTCGAATCAACGGCACCACGAGGGCTATACTGTCTCCTTCTCCTAATCAGTGAAACTAATCT  
CCCTGTGAAAAAGCAGGAATACCTCTATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACATAACA  
ACACCTTTAAACTTAATCTACCTTATTAACCTGAAAGCATTGTATGTTAGTTTTAGGTTGGGGC  
GACCGCGGAGTATAACAAAACCTCCATAACGAAAGGGCGTAAATCCTTACTTGAGAAAAACATT  
TCTACAAATTATTAACATAACGTTTAATGACCCGATCATCGATTAACGAACCAAGTTACCCTGGG  
GATAACAGCGCAATCCATTTTGAGAGCTCATATTGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGA  
TCAGGGTATCCCAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGGTTTGTGTTTCAACAATTA AACCCCTACG  
TGATCTGAGTTCAGACC

Field number: PT1994 Length: 596 bp

GTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGTTTAAATATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGATAATTCATT  
CAACGGCCGCGTAATTTAAAGCGCGCAAAGGTAGCGTAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTC  
GAATCAACGGCACCACGAGGGCTATACTGTCTCCTTCCCCAATCAGTGAAACTAATCCCCCTG  
TGAAAAAGCAGGGATATCCCTATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACATGACAACATC  
TTTAAAATTTTACACCCACCTTATTAACATGAAAGCATTGTGCGTTAGTTTTAGGTTGGGGCG  
ACCGCGGAGTATAAGAAAACCTCCACAACGAAAGGGAATAAACCCCTTACTTGAGAAAAACATTT  
CTACAAATTATTAATATAACGTTTAATGACCCGATTATCGATTAACGAACCAAGTTACCCTGGGG  
ATAACAGCGCAATCCATTTTGAGAGCTCATATTGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGAT

CAGGGTATCCCAGTGGTGCAGCCGCTACTAAAGTTTGTGGTTCAACAATTAACCCTACGT  
GATCTGAGTTCAGACCA

5. *Microtyla heymonsi*

Field number: PT1972 Length: 583 bp

TTACCAAAAACATCGCCTCCTGATTTCTATAGGAGGTCTAGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAAC  
GGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTAT  
GAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCTACTTTATTAGTGAAACTGATCTCCCCGTGAA  
GAAGCGGGGATAAAAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGTATCAACTGCT  
ATTTTAAAAACCTAGTACACAAGCAATTTCTGACTACTAGTTTTCGGTTGGGGTGACCACGGAG  
TAAACCTAACCTCCACGATGAAAGGAGATAATAACCTAAATTAAGAGCTACAACCTCTAAATAT  
CAATAAATTGACTGATTGATCCAATTAATTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGC  
GCAATCCATTTCAAGAGCTCCTATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTAT  
CCCAGTGGCGCAGCTGCTACTAATGGTTCGTTTGTTCACGATTAACCCTACGTGATCTGAG  
TTCAGAC

Field number: PT1986 Length: 589 bp

CTGTTTACCAAAAACATCGCCTCCTGATTTCTATAGGAGGTCTAGCCTGCCAGTGACAAAGTT  
AAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTA  
GTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCTACTTTATTAGTGAAACTGATCTCCCCG  
TGAAGAAGCGGGGATAAGAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGTATCAAC  
TGCTATTTTTAAAACCTAATACACAAGCAATTTCTGACTACTAGTTTTCGGTTGGGGTGACCACG  
GAGTAAAACCTAACCTCCACGATGAAAGGAAGTAACAACCTAAATTAAGAGCTACAACCTCTAAA  
TATCAATAAATTGACTGATTGATCCAATTAATTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACA  
GCGCAATCCATTTCAAGAGCTCCTATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGT  
ATCCCAGTGGCGCAGCTGCTACTAACGGTTCGTTTGTTCACGATTAACCCTACGTGATCTG  
AGTTCAGACCA

Field number: PT1995 Length: 583 bp

TTACCAAAAACATCGCCTCCTGATTTCTATAGGAGGTCTAGCCTGCCAGTGACAAAGTTAAAC  
GGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTAT

GAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCTACTTTATTTCAGTGAAACTGATCTCCCCGTGAA  
GAAGCGGGGATAAAAAATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGTATCAACTGCT  
ATTTTAAAAACCTAGTACACAAGCAATTTCTGACTACTAGTTTTTCGGTTGGGGTGACCACGGAG  
TAAACCTAACCTCCACGATGAAAGGAGATAATAACCTAAATTAAGAGCTACAACCTCTAAATAT  
CAATAAATTGACTGATTGATCCAATTAATTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGC  
GCAATCCATTTCAAGAGCTCCTATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTAT  
CCCAGTGGCGCAGCTGCTACTAATGGTTCGTTTGTTC AACGATTA AAACCCTACGTGATCTGAG  
TTCAGAC

6. *Microhyla berdmorei*

Field number: PT2214 Length: 590 bp

CCTGTTTACAAAAACATCGCCTCTTGCTAACTATAAGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACAAAGT  
TAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACT  
AGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATACTGTCTCCCCCTTTTTTCAGTGAAACTGATCTTCCC  
GTGAAGAAGCGGGAATATTAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGAATCAA  
CTGCCACAACTTAACTTAATAACTATGCAGGAATGACTTCTAGTTTTTCGGTTGGGGTGACCGC  
GGAGTAAATAAAACCTCCACGACGAAAGGAACTAACCCACTAAACCAAGAGCCACAGCTCTAA  
GTATTAATACATTAACCTAATTGATCCAATTACTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAA  
CAGCGCAATCCATTTCAAGAGCTCATATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGG  
ATATCCAAGTGGCGCAGCCGCTACTAACGGTTCGTTTGTTC AACGATTA AAATCCTACGTGATC  
TGAGTTCAGACCA

7. *Microhyla muklersuri*

Field number: PT1897 Length: 597 bp

TCCCGCCTGTTTACAAAAACATCGCCTCCTGATCACCCATAGGAGGTCCAGCCTGCCAGTGA  
CTAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATG  
AGGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCTACTCTACTCAGTGAAACTGAT  
CTCCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAAATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAG  
TACCAACTGCCCTAATAATAACCTATTACCCTTGACGCCATGGTCACTAGTTTTTCGGTTGGGGT  
GACCACGGAGTAAATTTAACCTCCACGATGAAAGGAACTAATATCCTAACCCATGAGCTACAG  
CTCTAAGTATCAACAAATTGACTAATTGACCCAATTACTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGG

GGATAACAGCGCAATCCATTTCAAGAGCTCATATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGG  
ATCAGGGTATCCCAGTGGCGCAGCCGCTACTAATGGTTCGTTTGTTC AACGATTA AACCCCTAC  
GTGATCTGAGTTCAGACCAAG

Field number: PT1920 Length: 594 bp

CCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCCTGATCACCCATAGGAGGTCCAGCCTGCCAGTGAC  
TAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGA  
GGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCTACTCTACTCAGTGAAACTGATC  
TCCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGT  
ACCAACTGCCCTAATAATAACCTATTACCCTTGCAGCCATGGTCACTAGTTTTCGGTTGGGGTG  
ACCACGGAGTAAAATTTAACCTCCACGATGAAAGGAACTAATATCCTAACCCATGAGCTACAGC  
TCTAAGTATCAACAAATTGACTAATTGACCCAATTA CTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGG  
GATAACAGCGCAATCCATTTCAAGAGCTCATATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGA  
TCAGGGTATCCCAGTGGCGCAGCCGCTACTAATGGTTCGTTTGTTC AACGATTA AACCCCTACG  
TGATCTGAGTTCAGACCA

Field number: PT1943 Length: 582 bp

ACCAAAAACATCGCCTCCTGATCACCCATAGGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACTAAGTTAAACG  
GCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATG  
AACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCTACTCTACTCAGTGAAACTGATCTCCCCGTGAAG  
AAGCGGGGATAAAAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGTACCAACTGCCC  
TAATAATAACCTATTACCCTTGCAGCCATGGTCACTAGTTTTCGGTTGGGGTGACCACGGAGTA  
AAATTTAACCTCCACGATGAAAGGAACTAATATCCTAACCCATGAGCTACAGCTCTAAGTATCA  
ACAAACTGACTAATTGACCCAATTA CTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGC  
AATCCATTTCAAGAGCTCATATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCC  
CAGTGGCGCAGCCGCTACTAATGGTTCGTTTGTTC AACGATTA AACCCCTACGTGATCTGAGTT  
TCAGAC

Field number: PT1961 Length: 573 bp

ACCAAAAACATCGCCTCCTGATCACCCATAGGAGGTCCAGCCTGCCAGTGACTAAGTTAAACG  
GCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTAGTATG



AACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCTACTCTACTCAGTGAAACTGATCTCCCCGTGAAG  
AAGCGGGGATAAAAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGTACCAACTGCCC  
TAATAATAACCTATTACCCTTGCAGCCATGGTCACTAGTTTTCGGTTGGGGTGACCACGGAGTA  
AAATTTAACCTCCACGATGAAAGGAACTAATATCCTAACCCATGAGCTACAGCTCTAAGTATCA  
ACAACTGACTAATTGACCCAATTACTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAACAGCGC  
AATCCATTTCAAGAGCTCATATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGGTATCC  
CAGTGGCGCAGCCGCTACTAATGGTTCGTTTGTTC AACGATTAAAACCCTACGTGATCTGG

Field number: PT1983 Length: 588 bp

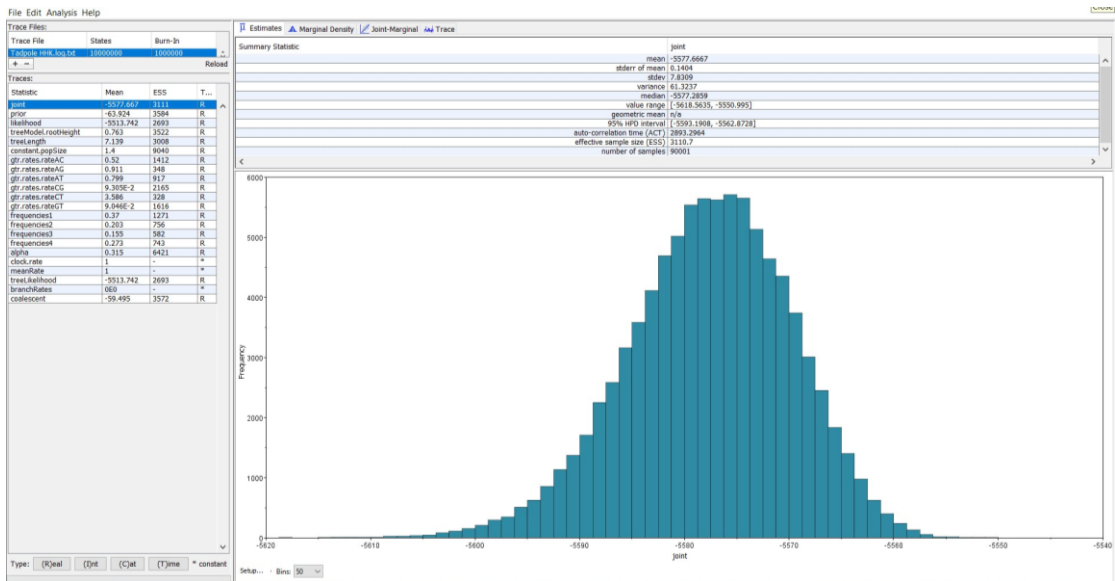
TGTTTACCAAAAACATCGCCTCCTGATCACCCATAGGAGGTCCAGCCTGCCAGTACTAAGTT  
AAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGAGGACTA  
GTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCTACTCTACTCAGTGAAACTGATCTCCCCG  
TGAAGAAGCGGGGATAAAAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGTACCAAC  
TGCCCTAATAATAACCTATTACCCTTGCAGCCATGGTCACTAGTTTTCGGTTGGGGTGACCACG  
GAGTAAAATTTAACCTCCACGATGAAAGGAACTAATATCCTAACCCATGAGCTACAGCTCTAAG  
TATCAACAAATTGACTAATTGACCCAATTACTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGGGATAAC  
AGCGCAATCCATTTCAAGAGCTCATATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGG  
TATCCCAGTGGCGCAGCCGCTACTAATGGTTCGTTTGTTC AACGATTAAAACCCTACGTGATCT  
GAGTTCAGACCA

Field number: PT2177 Length: 594 bp

CCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCCTGATCACCCATAGGAGGTCCAGCCTGCCAGTGAC  
TAAGTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGCAATCACTTGTTCTTTAAATGA  
GGACTAGTATGAACGGCATCACGAGGGTTATGCTGTCTCCCTACTCTACTCAGTGAAACTGATC  
TCCCCGTGAAGAAGCGGGGATAAAAATATAAGACGAGAAGACCCCATGGAGCTTTAAACTCAGT  
ACCAACTGCCCTAATAATAACCTATTACCCTTGCAGCCATGGTCACTAGTTTTCGGTTGGGGTG  
ACCACGGAGTAAAATTTAACCTCCACGATGAAAGGAACTAATATCCTAACCCATGAGCTACAGC  
TCTAAGTATCAACAAATTGACTAATTGACCCAATTACTTGATCAACGAACCAAGTTACCCTGGG  
GATAACAGCGCAATCCATTTCAAGAGCTCATATCGACAAATGGGTTTACGACCTCGATGTTGGA  
TCAGGGTATCCCAGTGGCGCAGCCGCTACTAATGGTTCGTTTGTTC AACGATTAAAACCCTACG  
TGATCTGAGTTCAGACCA



## ภาพผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ MCMC ด้วยโปรแกรม Tracer v1.7.2



## ภาพผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของ MCMC ด้วยโปรแกรม Tracer v1.7.2

