การกระจายพันธุกรรมของกบทูด (*Limnonectes blythii*) ในบางพื้นที่ของจังหวัดแม่ฮ่องสอน

GENETIC DISTRIBUTION OF BLYTH'S GIANT FROG (*Limnonectes blythii*) IN SOME AREAS OF MAE HONG SON PROVINCE

ฉัตรมงคล สุวรรณภูมิ[1/], วีระ วงศ์คำ[1/], ชิตชล ผลารักษ์[1/], ทัตพร คุณประดิษฐ์[2/]
เอกพจน์ เจริญศิริวงศ์ธนา[3/], วารณี ประดิษฐ์[1/], สิริวดี ชมเดช[1/*]
Chatmongkon Suwannapoom[1/], Weerah Wongkham[1/], Chitchol Phalaraksh[1/],
Tatporn Kunpradid[2/], Ekkapod Jalernsiriwongthna[3/], Waranee Pradit[1/], Siriwadee Chomdej[1/*]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของกบทูด (*Limnonectes blythii*) ในจังหวัดแม่ฮ่องสอน ด้วยการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ Rtemμ4 และ RECALQ โดยทำการเก็บตัวอย่างกบทูดจาก 4 บริเวณ คือ บริเวณสถานีประมงจังหวัดแม่ฮ่องสอน บริเวณชายแดนไทย-พม่า ปางอุ๋ง และบริเวณฝั่งประเทศพม่าที่ติดกับจังหวัดแม่ฮ่องสอน ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกบทูดทั้ง 4 ประชากร พบว่า ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลาง ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งมีค่าเท่ากับ 3.5 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกต (H_0) มีค่าระหว่าง 0.1739 - 0.4038 นอกจากนี้ ยังพบว่า ประชากรกบทูดมีความแตกต่างระหว่างประชากรย่อยอีกด้วย (F_{ST} = 0.0606) และจากการศึกษา ค่าความห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดยใช้วิธี UPGMA พบว่า กบทูดในบริเวณสถานีประมง เขตชายแดนไทย-พม่า และบริเวณฝั่งประเทศพม่าที่ติดกับจังหวัดแม่ฮ่องสอน มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากกว่ากบทูดจากปางอุ๋ง

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม, *Limnonectes blythii*, ไมโครแซทเทลไลท์

ABSTRACT

Genetic diversity and structure of mountain frog (*Limnonecte blythii*) in Mae Hong Son district were studied by 2 loci of microsatellite DNA (Rtemμ4 and RECALQ). Collected tissue samples of mountain frogs were collected from 4 areas in Mae Hong Son (Mae Hong Son inland fisheries station, This study showed that genetic diversity of these populations was moderate. A number of alleles

[1/]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ *e-mail address siriwadee@yahoo.com
[2/]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
[3/]สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดแม่ฮ่องสอน อำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน

per locus was 3.5 and the observed heterozygosity (H_0) ranged between 0.1739 - 0.4038. We also found difference between subpopulation (F_{ST} = 0.0606). Genetic distance between 4 populations from UPGMA method showed that mountain frogs in Mae Hong Son inland fisheries station, Thai – Myanmar border and Myanmar area near by Mae Hong Son district were more similar than mountain frogs from Pang Aung.

Key words: Genetic diversity, *Limnonectes blythii*, Microsatellite

บทนำ

กบทูดมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Limnonectes blythii* เป็นกบที่มีขนาดใหญ่ (Taylor, 1962) มีการกระจายพันธุ์อยู่ตามลำห้วย ลำธาร ที่มีน้ำไหล บริเวณภูเขาสูงประเทศที่มีรายงานว่าพบกบทูดได้แก่ อินโดนีเซีย ลาว มาเลเซีย พม่า ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และประเทศไทย ซึ่งในประเทศไทยแถบเทือกเขาตะนาวศรี จังหวัด ตาก แม่ฮ่องสอน ยะลา และกาญจนบุรี ในปัจจุบันกบทูดตามธรรมชาติมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากธรรมชาติที่กบทูดอาศัยอยู่นั้นได้ถูกทำลาย และรวมไปถึงการที่มนุษย์นำมาบริโภคเป็นอาหาร จึงทำให้ในปัจจุบันกบทูดจึงถูกจัดให้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตาม พ.ร.บ สงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับใช้ประกอบในการอนุรักษ์กบทูด จึงมีความจำเป็นในการศึกษาเรื่องสายพันธุ์ตลอดจนถึงโครงสร้างทางพันธุกรรม เป็นที่น่าสนใจว่าในพื้นที่ภาคเหนือโดยเฉพาะอำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอนยังมีการกระจายตัวของกบทูด ขณะนี้ประเทศไทยไม่มีรายงานการศึกษาทางพันธุกรรมของกบทูด มีเพียงการศึกษาชีววิทยาของกบทูด เพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ (ผุสตีและคณะ, 2529) งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาการแพร่กระจายพันธุกรรมของกบทูด ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน เพื่อเป็นการสนับสนุนข้อมูลงานวิจัยทางด้านชีววิทยาให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง และชัดเจนมากขึ้นนอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการจัดการทรัพยากรของกบทูดต่อไปในอนาคต

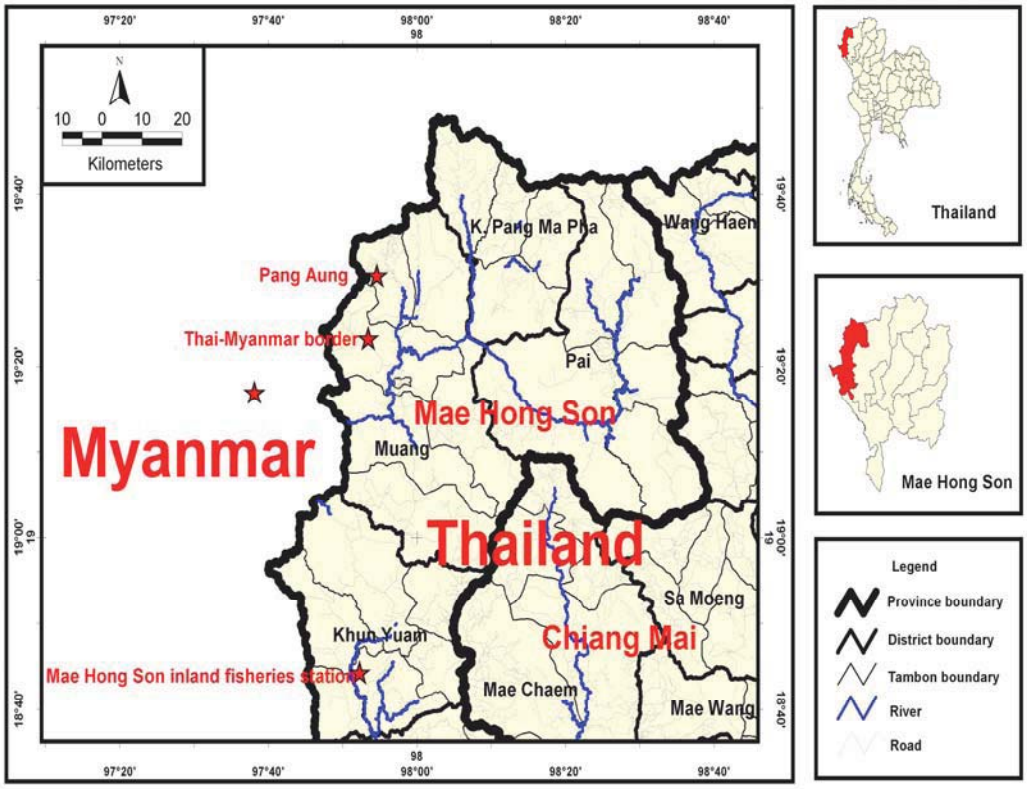
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

รวบรวมกบทูด *L. blythii* จาก 4 แหล่ง (ภาพที่ 1) ในแต่ละแหล่งได้แก่ แหล่งที่ 1 พื้นที่อนุรักษ์เขียดแลวหรือกบทูด *L. blythii* พื้นที่ 60 ไร่ บ้านปางอุ๋ง ตำบลหมอกจำแป่ อำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน แหล่งที่ 2 บริเวณสถานีประมงน้ำจืด อำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน แหล่งที่ 3 บริเวณชายแดนไทย-พม่า ที่ติดกับจังหวัดแม่ฮ่องสอน แหล่งที่ 4 บริเวณห้วยยูในฝั่งประเทศพม่า จากนั้นทำการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกบทูดในส่วนของพังผืดระหว่างตีนกบทูดไว้ใน 95% แอลกอฮอล์

ตารางที่ 1. แสดงตัวอย่างของประชากร ชื่อย่อประชากร จำนวนตัวอย่าง สถานที่เก็บตัวอย่างกบทูด *L. blythii* ที่ใช้ในการศึกษา

Sample code	Locality	Latitude, Longitude	Sample size
TMM	Thai-Myanmar border	19° 22 ’ 67 ” N 97° 52 ’ 87 ” E	32
PMM	Mae Hong Son inland fisheries station	18° 44 ’ 13 ” N 97° 52 ’ 19 ” E	25
MM	Myanmar	19° 16 ’ 52 ” N 97° 38 ’ 10 ” E	32
PAM	Pang Aung	19° 29 ’ 87 ” N 97° 53 ’ 99 ” E	31



ภาพที่ 1 แสดงจุดเก็บตัวอย่างกบทูด *L. blythii*

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกบทูด (*Limnonectes blythii*) ด้วยวิธี Pretenase K/Phenal-Chlloroform โดยดัดแปลงจากวิธีของ Jiwyam และคณะ (2005)

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณพังผืดระหว่างตีนกบทูด *L. blythii* ประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ TE buffer 500 µl จากนั้นเติม 10% SDS ปริมาตร 50 µl และเติม Proteinase K 5 µl บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ย่อยแล้วมาสกัดดีเอ็นเอ โดยขั้นตอนแรกเติมสารละลาย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 µl ในแต่ละหลอด และนำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที สารละลายที่แยกออกเป็นสองชั้นทำการดูดส่วนใสชั้นบนมาใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 500 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนย้ายทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมสารละลาย 3M Sodium acetate (pH 6.0) ปริมาตร 50 µl ร่วมกับ 95% แอลกอฮอล์ที่เย็นจัดปริมาตร 50 µl บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% แอลกอฮอล์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 15 นาที ละลายตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-EDTA) และเก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm (A_{260} / A_{280}) (Sambrook and Russel, 2001; Sambrook *et al*, 1989)

3. การศึกษา ไมโครแซทเทลไลท์

นำ genomic DNA ที่มีความเข้มข้น 100 ng เป็นดีเอ็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) ปริมาตรรวม 15 µl เข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิต่างๆดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Denaturation : 94 °C เวลา 5 นาที จำนวน 1รอบ

ขั้นตอนที่ 2 Denaturation : 94 °C เวลา 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 Annealing : อุณหภูมิไพรเมอร์แต่ละคู่ แสดงดังตาราง 1 เวลา 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 4 Extension : 72 °C เวลา 30 วินาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 3 และ 4 อย่างต่อเนื่อง จำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 5 Final extension : 72 °C เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้ด้วย 6 % polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมสีดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.,*1999)

ตารางที่ 2 : ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ (Solano and Garcia-Paris, 2005) แต่ละคู่และอุณหภูมิที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

Primer's name	ลำดับเบสของ primer (5'→ 3')	annealing (°C)
Rtemµ4	F: TCATGCAGGCAAAGGTCAGG	62
	R: AGAACCGCTGGTGTCCCAAC	
RECALQ	F: GGAGGGTGAAGTCAACACT	56
	R:ACATTTGAATATATAAACTAGTTAGATGC	

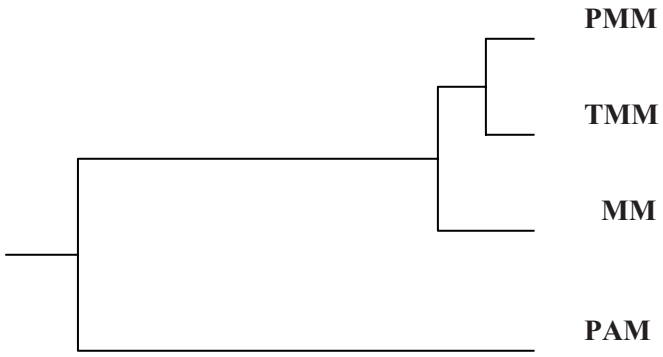
ผลการศึกษา

คุณภาพของดีเอ็นเอ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อเยื่อกบทูด *L. blythii* มีค่าความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 80 – 2455 ng ผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจากไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ 2 คู่ โดยมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่งเท่ากับ 3.5 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากร (F_{IS}) ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรทั้งหมด (F_{IT}) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (F_{ST}) ของกบทูด *L. blythii* เฉลี่ยทุกตำแหน่งมีค่าเท่ากับ - 0.2760 ,- 0.1986 และ 0.0606 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความแตกต่างระหว่างประชากร (F_{ST}) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0606 แสดงให้เห็นว่าประชากรแต่ละแหล่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 : **Population genetic parameters for *L. blythii* Using the two microsatellite loci**

	Heterozygosity		F-statistics			
Locus	**Ho**	**He**	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	**Nm***
Rtemμ4	0.6148	0.5089	- 0.3055	- 0.2244	0.0621	3.7750
RECALQ	0.0738	0.0721	- 0.0704	- 0.0167	0.0501	4.7356
Mean	0.3443	0.2905	- 0.2760	- 0.1986	0.0606	3.8736
SD	0.3825	0.3089				

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม: แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่า ประชากรกบทูด แบ่งเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน โดยกบทูดที่เก็บตัวอย่างมาจากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดแม่ฮ่องสอนจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับประชากรกบทูดที่เก็บมาจากฝั่งพม่าและ กลุ่มประชากรบริเวณชายแดนไทย-พม่า ในขณะที่กลุ่มประชากรที่เก็บตัวอย่างมาจากปางอุ๋ง กลับมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ห่างจากกลุ่มอื่น (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 2 : **แผนผังแสดงความคล้ายคลึงกันของพันธุกรรมระหว่างประชากรกบทูด *L. blythii* 4 กลุ่มประชากร โดยวิธี UPGMA**

ตารางที่ 4 : **Genetic distance between population of *L. blythii* samples based on microsatellite analysis at the Rtemμ4 and RECALQ locus**

pop ID	PMM	TMM	MM	PAM
PMM	-			
TMM	0.0023	-		
MM	0.0025	0.0045	-	
PAM	0.0581	0.0593	0.0362	-

หมายเหตุ: PMM= สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดแม่ฮ่องสอน, TMM= ชายแดนไทย- พม่า, MM= ฝั่งพม่า PAM= ปางอุ๋ง

วิจารณ์ผลการทดลอง

กบทูดในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลาง (Ho = 0.344) โดยมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับกบภูเขา *Rana iberica* ในประเทศสเปน (Ho = 0.140) (Solano and Garcia-Paris, 2005) และมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่ากบ *Rana arvalis* ในประเทศเนเธอแลนด์ (Ho = 0.377) (Vos *et al*., 2001) ในการศึกษาโครงสร้างประชากรโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ Wright (1978) ได้ให้ความหมายของค่า F_{ST} ในแต่ละช่วงไว้ดังนี้ ค่า F_{ST} เท่ากับ 0-0.05 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ค่า F_{ST} เท่ากับ 0.05-0.15 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง ค่า F_{ST} เท่ากับ 0.15-0.25 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก และค่า F_{ST} มากกว่า 0.25 ขึ้นไป แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด จากการศึกษา

โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรกบทูดทั้ง 4 ประชากร พบว่ามีค่าปานกลาง ค่าเฉลี่ย F_{ST} เท่ากับ 0.0606 แสดงว่าประชากรกบทูด ที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อย ซึ่งระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรกบทูด นี้มีค่าต่ำกว่ากบภูเขา *Rana iberica* ในประเทศสเปน F_{ST} เท่ากับ0.198 (Solano and Garcia-Paris, 2005) และกบ *Rana arvalis* ในประเทศเนเธอแลนด์ F_{ST} เท่ากับ 0.065 (Vos *et al*., 2001) และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า F_{ST} ของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* พบว่ามีค่าต่ำกว่าเช่นกันซึ่ง F_{ST} เท่ากับ 0.065 (เฉลิมชัย, 2539) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกบทูด *L. blythii* จากฝั่งพม่ามีความใกล้เคียงกับ สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดแม่ฮ่องสอนและ ชายแดนไทย – พม่า อาจเพราะทางสถานีประมงเองในแต่ละปีต้องใช้พ่อแม่พันธุ์ในการเพาะลูกกบทูด *L. blythii* จำนวนมากในการปล่อยสู่ธรรมชาติในเชิงอนุรักษ์ จึงทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมมีความใกล้เคียงกัน ในขณะที่ชายแดนไทย – พม่าก็เป็นอีกแหล่งที่ทางสถานีประมงน้ำจืด จังหวัดแม่ฮ่องสอน ได้ทำการปล่อยลูกกบทูด *L. blythii* อยู่ตลอดทุกปีซึ่งจากการสอบถามข้อมูลเจ้าหน้าที่ของสถานีประมงได้ให้ข้อมูลว่าทำการปล่อยมานานกว่า10 ปี ในแต่ละปีที่ทำการปล่อยลูกกบทูดไม่น้อยกว่า5,000 ตัว และยังได้นำกบทูดจากชายแดนไทย-พม่ามาเป็นพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของกบทูดทั้งสองแหล่งนี้มีความใกล้เคียงกัน ทั้งนี้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบทูด *L. blythii* ในประเทศไทยยังมีผู้ทำการศึกษาน้อย ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ ในการศึกษาครั้งนี้จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์มากขึ้นเพื่อประเมินความหลากหลาย รวมทั้งจะต้องใช้ศึกษาความหลากหลายในส่วนของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ เพื่อดูความหลากหลายภายในกลุ่มประชากรอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2551

เอกสารอ้างอิง

เฉลิมชัย สุวรรณรักษ์. 2539. โครงสร้างละความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรกบนา (*Rana rugulosa*) ใน 7 จังหวัดของประเทศไทยด้วยวิธี Starch Gel Electrophoresis Technique. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ผุสตี ปริยานนท์ กัมพล อิศรางกูร ณ อยุธยา นงเยาว์ จันทร์ผ่อง ธีรวรรณ นุตประพันธุ์ อารมณ์ รัศมิทัต กิ่งแก้ว วัฒนาเสริมกิจ วีณา เมฆวิชัย วิโรจน์ ดาวกฤษ์. 2529. รายงานการวิจัยเรื่อง การศึกษาชีววิทยาของกบภูเขา (เขียดแลว) เพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์. **เอกสารโรเนียว** 93 หน้า.

Jiwyam, W., champasri, T. and Juntana, J. 2005. A study on DNA fingerprint of some thai native frogs using RAPD technique. **Kku Research Journal**. 100 –105.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989.**Molecular Cloning**: **A Laboratory Manual**2nd ed. Cold Spring Harber Raboratory Press.

Sambrook, J. and Russel, D.W. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 3nd ed. Cold Spring Harber Raboratory Press.

Solano, I.R. and Garcia-Paris, M. 2005. The impact of historical and recent factors on genetic variability in a mountain frog: the case of *Rana iberica* (Anura: Ranidae). **Animal Conservation**.8 : 431-441.

Taylor, E.H. 1962. **The Amphibian Fauna of Thailand**. Science Bulletin Vol. XLlll No.8. The University of Kansas.

Vos, C.C., Antonisse-de-Jong, A.G., Goedhart, P.W. and Smulders, M.J.M. 2001.Genetic similarity as a measure for connectivity between fragmented populations of the moor frog (*Rana arvalis*). **Heredity** 86: 598-608.

Wright, S. 1978. **Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4**: Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press.

Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 1999. **POPGENE version 1.31**. Microsoft window-based software for population genetics analysis, University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada