

รายงานผลการดำเนินงานวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2550

โครงการวิจัยย่อย

การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ

สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

โครงการวิจัยนี้

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2550

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปภาพรวม

ผลการดำเนินงาน

โครงการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ

สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ปีงบประมาณ 2550

หลักการและเหตุผล

พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ทรงเล็งเห็นความสำคัญในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชมาเป็นเวลานานก่อนที่คำว่า ความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) และการอนุรักษ์ (Conservation) จะเป็นที่รู้จักกันดีในประเทศไทย จากการที่เสด็จแปรพระราชฐานไปประทับ ณ พระราชวังไกลกังวล อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในปี พ.ศ. 2503 เมื่อเสด็จผ่าน อำเภอท่า양 จังหวัดเพชรบุรี ทอดพระเนตรเห็นต้นยางนาขนาดใหญ่ ตามเส้นทางเสด็จพระราชดำเนินเป็นจำนวนมาก ทรงมีพระราชดำริที่จะสงวนต้นยางนาเหล่านี้ไว้ด้วยพระราชทรัพย์ส่วนพระองค์ แต่เนื่องจากมีราษฎรเข้าไปอาศัยอยู่ในพื้นที่เป็นจำนวนมาก จึงทำให้ไม่สามารถจัดถวายได้ตามพระราชประสงค์ จึงทรงพระราชทานให้เก็บเมล็ดยางนาไปเพาะไว้ที่พระตำหนักเป็ยมสุข พระราชวังไกลกังวล จากนั้นได้นำต้นยางนาที่เพาะได้ไปปลูกไว้ในสวนจิตรลดา ในวันคล้ายวันประสูติ สมเด็จพระบรมโอรสาธิราชฯ สยามมกุฎราชกุมาร ในวันที่ 28 กรกฎาคม 2504 จำนวน 1250 ต้น จากนั้นทรงมีพระราชดำริให้จัดเก็บพรรณไม้จากภูมิภาคต่างๆทั่วประเทศนำมาปลูกไว้ในสวนจิตรลดาเพื่อเป็นแหล่งศึกษา (แก้วขวัญ วัชโรทัย 2546)

ในปี พ.ศ. 2508 ทรงมีพระราชดำริให้ทำการอนุรักษ์พันธุ์ต้นขนุนในพระบรมมหาราชวัง และดำเนินการ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชเอกลักษณ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต่อมาในปี พ.ศ. 2509 ทรงมีพระราชดำริให้ทำการอนุรักษ์พันธุ์ต้นหวาย จัดสร้างสวนพืชสมุนไพรในโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา เพื่อเป็นแหล่งศึกษา

สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทรงสืบสานงานอนุรักษ์พันธุกรรมต่อจากพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ในปี พ.ศ. 2535 ได้ทรงมีพระกระแสรับสั่งเรื่องการอนุรักษ์พืชพรรณในประเทศไทย จัดสร้างธนาคารพืชพรรณสำหรับเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ การเก็บรักษาโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล ต่อมาในปี พ.ศ. 2536 ได้พระราชทานแนวทางใน

การอนุรักษ์พันธุ์ไม้เก่า ได้แก่อันทุเรียน ในจังหวัดนนทบุรี การอนุรักษ์พันธุ์พืชที่ไม่ใช่พืชเศรษฐกิจ และการอนุรักษ์พันธุ์พืชตามเกาะต่างๆ ดังที่มีพระกระแสรับสั่งว่า

“ให้มีการศึกษาสำรวจพรรณไม้ตามเกาะต่างๆ เพราะยังไม่มีผู้สนใจเท่าไร อีกทั้งการดำเนินงานในเรื่องการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชตามเกาะต่างๆ ยังไม่มีการดำเนินงานเป็นรูปธรรม.....”

ในปี พ.ศ. 2540 กองทัพอากาศ ได้เข้าร่วมสนองพระราชดำริน้อมเกล้าถวาย เกาะแสมสาร และเกาะช้างเคียง ที่อยู่ในการดูแลของกองทัพอากาศ เข้าร่วมในโครงการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ในวันที่ 22 เมษายน 2541 ทรงพระกระแสรับสั่ง “ให้มีการศึกษาสำรวจทรัพยากรธรรมชาติ นับตั้งแต่ยอดเขาถึงใต้ทะเล.....” จึงเป็นที่มาของการ ศึกษาสำรวจทรัพยากรธรรมชาติของนักวิจัยจากกลุ่มต่างๆ ที่มาจากหลายหน่วยงาน และหลายสถาบัน ที่ทำงานร่วมกันในลักษณะบูรณาการ ได้แก่ การศึกษาต่างๆ ทั้งทางด้านกายภาพ และชีวภาพ แทบทุกสาขา ที่ก่อให้เกิดผลงานต่างๆ จำนวนมากมาย มีการประชุมวิชาการ การแสดงผลงานในรูปแบบของนิทรรศการ และการนำผลงานไปขยายผลในการฝึกอบรม ให้กับเยาวชน นิสิต นักศึกษา ประชาชนทั่วไป เพื่อให้ความรู้ในด้านการอนุรักษ์ การสร้างจิตสำนึก และการใช้ทรัพยากรอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

ในระหว่าง วันที่ 21 -27 มิถุนายน 2544 มีการจัดประชุมวิชาการและจัดแสดงนิทรรศการ เรื่อง **ทรัพยากรไทย : อนุรักษ์และพัฒนาด้วยจิตสำนึกแห่งนักวิจัยไทย** ณ ศาลาพระแก้ว ในวันที่ 21 มิถุนายน 2544 ในพิธีเปิดงานแสดงนิทรรศการและประชุมวิชาการ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทรงมีพระกระแสรับสั่งในพิธีเปิดงานในความตอนหนึ่งว่า

“.....การจัดประชุมนี้ ก็เป็นการแลกเปลี่ยนความคิดเห็นและเพิ่มพูนความรู้ในระดับนักวิชาการ และการจัดนิทรรศการนี้ก็จะมีโอกาสให้คนอื่นที่สนใจได้มาดูได้มาศึกษา เมื่อบุคคลต่างๆ ได้มาศึกษาแล้วก็ทราบว่ามีพืชต่างๆ และต่อไปก็ต้องศึกษาเรื่องสัตว์ สิ่งมีชีวิต และสิ่งธรรมชาติต่างๆ ของพวกนี้ก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจ เมื่อสนใจแล้วก็จะมีความรู้ลึกซึ้งอยากจะทำการศึกษา ไม่ทำลายให้เสียหาย สูญสิ้นไป ก็เป็นการช่วยอนุรักษ์เป็นอย่างดี.....”

อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ดังกล่าว ในข้างต้น จึง การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเรื่อยมา และมีผู้ทูลเกล้าถวายพื้นที่เข้าร่วมโครงการฯ เพิ่มขึ้น ซึ่งพื้นที่ต่างๆเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่หวงห้าม ถ้าผู้ที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องก็ยากต่อการที่เข้าไปทำการศึกษาในพื้นที่ต่างๆเหล่านี้ นอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่ต่างๆเหล่านี้ยังจัดว่าเป็นพื้นที่ที่ยังมีความอุดมสมบูรณ์สูง ทั้งนี้เนื่องจาก พื้นที่ต่างๆเหล่านี้ ประกอบด้วยระบบนิเวศธรรมชาติที่มีความ

หลากหลายนานาชนิด นับตั้งแต่ ป่าดิบเขา ป่าดิบชื้น ป่าดิบแล้ง ป่าผลัดใบ ป่าเต็งรัง ป่าดิบในที่ราบต่ำ ไปจนถึงป่าชายเลน ตลอดจนได้ผืนทะเลท้องน้ำ ท้องทะเลที่ประกอบด้วยแนวปะการังชายฝั่งและแนวปะการังน้ำลึกใต้ท้องทะเล ซึ่งพื้นที่ต่าง ๆ เหล่านี้ล้วนเป็นที่อยู่อาศัยของพืชและสัตว์ที่มีคุณค่า นานาชนิด ในบางพื้นที่ของโครงการยังอยู่ในบริเวณที่เป็นจุดบรรจบของพืชและสัตว์ชนิดต่างๆ ที่มีถิ่นกำเนิดมาจากหลายบริเวณ โดยรอบของประเทศ ดังนั้นจึงเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูง พบว่ามีพืชพรรณนานาชนิด มีสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง ประกอบด้วย สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และ ปลา สัตว์ไม่มีกระดูก สัตว์หลัง ประกอบด้วย กลุ่ม มอลลัส แผลง ไพร โตรซัว และ อื่นๆ อีกจำนวนมากมายจนนับไม่ถ้วน ทรัพยากรต่างๆ เหล่านี้ล้วนเป็นแหล่งพันธุกรรมที่เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของมวลมนุษยชาติแทบทั้งสิ้น

ปัจจุบัน การเพิ่มจำนวนของประชากรมนุษย์มีแนวโน้มสูงมากขึ้น ส่งผลทำให้ความต้องการใช้ทรัพยากรเพิ่มมากขึ้นด้วย ไม่ว่าจะเป็นอาหาร ที่อยู่อาศัย พลังงาน และยารักษาโรค ประกอบกับการขยายตัวทางเศรษฐกิจและความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี ล้วนแต่ส่งผลกระทบต่อทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมแทบทั้งสิ้น

ดังนั้นเพื่อเป็นการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ในบริเวณต่างๆ ของพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จึงนับเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องดำเนินการศึกษาอย่างรีบด่วน ทั้งนี้เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการวางแผนด้านการอนุรักษ์ การปกป้องรักษา และการใช้ทรัพยากรชาติที่มีอยู่เพื่อให้เป็นสมบัติของชนชาวไทยอย่างยั่งยืนสืบต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการศึกษา ความหลากหลายทางชีวภาพ ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

พื้นที่ทำการศึกษา ได้แก่ พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจาก

พระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ประกอบด้วย

- 1) โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี หมู่เกาะแสมสาร และเกาะทะเลไทย ที่อยู่ในการดูแลของกองทัพเรือ

2) โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่บริเวณเขาเขียวและเขาชมพู่ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อ. ศรีราชา จังหวัดชลบุรี

3) โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เขาวังเขมร อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี

4) และพื้นที่อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

วิธีดำเนินการ

ทำการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ในระดับพันธุกรรม (genetic diversity) ระดับชนิด (species diversity) และ ระบบนิเวศ (ecological diversity) ทั้งนี้เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ ในด้านการอนุรักษ์ และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติของไทยที่มีอยู่อย่างยั่งยืน ทั้งนี้การศึกษาในปี 2550 มีขอบเขต การศึกษาในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ และพื้นที่บางแห่งที่เกี่ยวข้อง เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบและประเมินค่าด้านความหลากหลายทางชีวภาพต่อไป

งานวิจัย ประกอบด้วย โครงการย่อยทั้งสิ้นจำนวน 5 โครงการ ดังรายละเอียดที่อยู่ในผลการดำเนินงาน

ผลการดำเนินงาน

1) งานวิจัย

จำนวน 5 โครงการย่อย ดังรายละเอียดที่อยู่ในผลการดำเนินงาน ประกอบด้วย

ลำดับที่	เรื่อง	
1	การศึกษา ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกบนา (<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>) ที่พบในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี และพื้นที่ข้างเคียง	เอกสารประกอบ 1
2	การศึกษาปรสิตในกบนา (<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>) ที่พบในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี และพื้นที่ข้างเคียง	2

3	การศึกษาระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Testosterone) ในแฉี่เสื่อ <i>Leiolepis belliana belliana</i> ในช่วงฤดูกลีบพันธุ์	3
4	ความหลากหลายของ ปู บริเวณอ่าวสัดหีบ	4
5	โครงการฝึกอบรม ความหลากหลายทางชีวภาพ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สำหรับนักเรียนครู และอาสาสมัคร ระดับมัธยมศึกษา	5

2. ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

ระดับชาติ

ศานิต ปิยพัฒนานกร อนุสรณ์ ปานสุข สุรียา แสงพงค์ และ ผุสดี ปริยานนท์ 2550 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแฉี่ *Leiolepis belliana belliana* บริเวณชายฝั่งตะวันออกและแฉียบนเกาะในทะเลอ่าวไทย การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ณ อาคารประชุมวิชาการ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย จ. ชลบุรี : 38-42

ชโลทร รักษาทรัพย์ วรณพ วัยกาญจน์ และสุชญา ชวนิชย์ 2550 การเพาะขยายพันธุ์ปะการังและการฟื้นฟูแนวปะการังด้วยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ-1 : ฤดูกาลปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปะการังแข็งบางชนิดบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ณ อาคารประชุมวิชาการ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย จ. ชลบุรี : 127-134

ปรุพร เกื้อนุ้ย สุชญา ชวนิชย์ ชโลทร รักษาทรัพย์ และ วรณพ วัยกาญจน์ 2550 การเพาะขยายพันธุ์ปะการังและการฟื้นฟูแนวปะการังด้วยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ-2 : ช่วงเวลาการปล่อยตัวอ่อนปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758) บริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการ

ประจำปี ครั้งที่ 3 ณ อาคารประชุมวิชาการ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย จ.
ชลบุรี : 135-140

กมลพันธ์ ลักษณะนา วรณพ วัยกาญจน์ และสุชานา ขวณิชย์ 2550 สิ่งมีชีวิตในแนวปะการังบริเวณหมู่
เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี -5 : ความสัมพันธ์ระหว่างรูปทรงปะการังที่ใช้เป็น
ถิ่นอาศัยกับชนิดปลา การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุม
วิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ณ อาคารประชุมวิชาการ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเล
ไทย จ. ชลบุรี : 141-147

วิมล เหมะจันทร และ กรณ์รวิ เตียมสมบุญณ์ 2550 พรรณปลาเศรษฐกิจในอ่าวสัตหีบ จังหวัดชลบุรี
การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3
ณ อาคารประชุมวิชาการ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย จ. ชลบุรี : 170-182

ตัณษมัย ประดิษฐ์ กรณ์รวิ เตียมสมบุญณ์ และ วิมล เหมะจันทร 2550 ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูม้า
Portunus pelagicus (Linnaeus, 1758) บริเวณชายฝั่งอ่าวสัตหีบ จังหวัดชลบุรี การประชุม
วิชาการ ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ณ อาคาร
ประชุมวิชาการ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย จ. ชลบุรี : 183-187

พัชร ดนัยสวัสดิ์ อนุสรณ์ ปานสุข วิเชษฐุ์ คนชื้อ และ ผุสดี ปริยานนท์ 2550 ความหลากหลายของ
ชนิดและสถานภาพด้านการอนุรักษ์สัตว์เลื้อยคลานของเกาะกูด การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย :
ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ณ อาคารประชุมวิชาการ บริเวณ
พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย จ. ชลบุรี : 207-212

วิเชษฐุ์ คนชื้อ อนุสรณ์ ปานสุข พัทธ ดนัยสวัสดิ์ และ ผุสดี ปริยานนท์ 2550 ความหลากหลายของ
ชนิดและสถานภาพด้านการอนุรักษ์สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของเกาะกูด การประชุมวิชาการ
ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ณ อาคารประชุม
วิชาการ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย จ. ชลบุรี : 213-217

มาลินี ฉัตรมงคลกุล วิเชษฐุ์ คนชื้อ พงษ์ชัย หาญยุทธนากร และ ผุสดี ปริญานนท์ 2550 ปรลิตใน เลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะกูด จังหวัดตราด การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ณ อาคารประชุมวิชาการ บริเวณ พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย จ. ชลบุรี : 300-309

3. บทความและเอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ จำนวน 13 เรื่อง ได้แก่

ธีรวรรณ นุตประพันธ์ และ ผุสดี ปริญานนท์ 2550 ก่อนจะถึงวันนี้...ที่มีพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติเกาะและ ทะเลไทย ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว...สู่...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการ อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 35-41

วิโรจน์ ดาวฤกษ์ 2550 ถ้า เขานินปูน เกือกุลชีวิต ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว ...สู่...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 58-66

มาลินี ฉัตรมงคลกุล 2550 บทบาทของปรลิตในระบบนิเวศ ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่งล้วน พันเกี่ยว...สู่...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 140-143

สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา และ พัทนี สิงห์อาษา 2550 จอมพลังผู้พลิกผืนปฐพี ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว...สู่...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจาก พระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 144-148

บัณฑิตกา อารีย์กุล นุทเชอร์ 2550 มหัศจรรย์ชีวิตแดนเบียน ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่งล้วน พันเกี่ยว...สู่...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 149-153

วิเชษฐุ์ คนชื่อ ดุสิตี ปริยานนท์ และ อนุสรณ์ ปานสุข 2550 “สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว” บนสายน้ำ...
ผืนป่า...ภาวะโลกร้อน... กับความอยู่รอดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒
สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว...สู่...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจาก
พระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ
หน้า 154-160

ดุสิตี ปริยานนท์ วรัญญา อรัญวาลัย กรภัทร แก้วเนิน และ สมชาย เสนนคร 2550 การคืนสู่ธรรมชาติ
ของสิ่งมีชีวิต ที่ใครก็คิดว่าเป็นเรื่องง่ายหรือไม่สำคัญ ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่งล้วนพัน
เกี่ยว...สู่...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระ
เทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 161-165

วิณา เมฆวิชัย 2550 พฤติกรรมการสืบพันธุ์ของนกที่น่าสนใจ ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่ง
ล้วนพันเกี่ยว...สู่...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 166-169

วรรณพ วิยาญญจน์ 2550 ปะการัง...หมู่บ้านเล็กๆ ในทะเลกว้าง ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่ง
ล้วนพันเกี่ยว...สู่...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 170-175

สุชนา ขวณิชน์ 2550 ปะการังกับภาวะโลกร้อน ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว...สู่
...ประโยชน์แท้แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพ
รัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 176-180

วิมล เหมะจันทร์ กรณ์รวิ เอี่ยมสมบุรณ์ เสธ์ ทรงพลอย และ เข็มชัย เหมะจันทร์ 2550 ปลาสมุทร:
แหล่งอาหารและยาเพื่อปวงชน ในจากยอดเขาถึงใต้ทะเล ๒ สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว...สู่...ประโยชน์แท้
แก่มหาชน โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ
สยามบรมราชกุมารี บริษัทเวิร์คสแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 190-199

มาลินี จัตรมงคลกุล 2550 การฝึกอบรมปฏิบัติการเรื่องแพลงก์ตอน เอกสารเผยแพร่ในการประชุม
วิชาการและนิทรรศการ เรื่อง ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน ณ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติ

วิทยาภาควิทยาศาสตร์และทะเลไทย เขาหมาจอ ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี ระหว่างวันที่ 20 ตุลาคม ถึง 5 พฤศจิกายน 2550 จำนวน 16 หน้า

คณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สร. 2550 คู่มือค่ายศึกษาและอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เอกสารเผยแพร่ในค่ายศึกษาและอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ โครงการความหลากหลายทางชีวภาพ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ระหว่างวันที่ 1-5 เมษายน 2550 จำนวน 142 หน้า

วรรณพ วิทยาญจน์ และ สุชนา ขวณิช 2550 จัดทำโปสเตอร์ 3 ชุด ได้แก่

1. ปลาในแนวปะการังในน่านน้ำไทย
2. สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในแนวปะการังในน่านน้ำไทย
3. ปะการังในน่านน้ำไทย

เผยแพร่ในการประชุมวิชาการและนิทรรศการ เรื่อง ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน ณ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาภาควิทยาศาสตร์และทะเลไทย เขาหมาจอ ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี ระหว่างวันที่ 20 ตุลาคม ถึง 5 พฤศจิกายน 2550

4) งานบริการทางวิชาการ

งานบริการทางวิชาการ

4.1 จัดประชุมวิชาการและนิทรรศการ

4.1.1 จัดประชุมวิชาการและนิทรรศการ เรื่อง ทรัพยากรไทย : ประโยชน์แท้แก่มหาชน ณ บริเวณพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาภาควิทยาศาสตร์และทะเลไทย เขาหมาจอ ต. แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี ระหว่างวันที่ 20 ตุลาคม ถึง 5 พฤศจิกายน 2550

4.1.2 จัดค่ายศึกษาและอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ โครงการความหลากหลายทางชีวภาพ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว และ เกาะแสมสาร ระหว่างวันที่ 1-5 เมษายน พ.ศ. 2550 จำนวนผู้เข้าอบรม 46 คน

ประโยชน์ของโครงการ

1. ด้านความรู้พื้นฐาน อาหาร การแพทย์ สาธารณสุข และสิ่งแวดล้อม

1.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบนา เป็นการสร้างองค์ความรู้พื้นฐาน ที่ต่อไปจะเป็นข้อมูล ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาพันธุ์ การอนุรักษ์ และการเกษตรเพื่อการพัฒนาอาชีพให้กับชุมชน

1.2 สร้างองค์ความรู้พื้นฐาน ชีววิทยาการสืบพันธุ์ ของแม่ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงในพื้นที่เลี้ยง เพื่อประโยชน์ด้านการอนุรักษ์และการคืนสู่ธรรมชาติบนเกาะแสมสาร

1.3 การศึกษาความหลากหลาย ของปู และชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปูม้า ในอ่าวสัตหีบ เป็นการศึกษาเพื่อเสาะแสวงหาความอุดมสมบูรณ์ ในการเพิ่มผลผลิตแหล่งอาหารทางธรรมชาติมากขึ้น ทำให้ชาวประมงมีอาชีพที่มั่นคงต่อไป

1.4 การศึกษาข้อมูลด้านประวัติของกบนา ซึ่งจากความรู้ นั้นนอกจากนำไปสู่องค์ความรู้ เรื่องความสัมพันธ์ทางระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกัน ที่ก่อให้เกิดวิวัฒนาการร่วมของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้สร้างองค์ความรู้พื้นฐาน ความรู้ด้านประวัติของกบนา ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการสาธารณสุข และการแพทย์ และการพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

2. การถ่ายทอดองค์ความรู้ของงานวิจัยสู่ชุมชน

2.1 จัดให้มีโครงการฝึกอบรม ค่าใช้จ่ายการศึกษาและอนุรักษ์ธรรมชาติ สำหรับนักเรียน และครู โดยมีการเผยแพร่เอกสารทางวิชาการ ทั้งในระดับชุมชน นักเรียน และครู

2.2 จัดทำข้อมูลทางวิชาการ ได้แก่ คู่มือการศึกษาเรื่องนก เพื่อบริการข้อมูลทางด้านการศึกษาและวิจัย และ เป็นการเผยแพร่ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัย สู่ชุมชนและองค์กรท้องถิ่น และในแวดวงของนักวิชาการอย่างเป็นรูปธรรม

จากผลการศึกษาดังกล่าวเหล่านี้ คณะผู้วิจัยหวังว่า ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาและวิจัยดังกล่าวเหล่านี้ จะสามารถนำไปใช้ประกอบการพิจารณาและเป็นแนวทางในการวางแผนการจัดการทรัพยากรธรรมชาติ และการใช้ทรัพยากรธรรมชาติ รวมทั้งการดูแลรักษาทรัพยากรธรรมชาติของแผ่นดิน การสร้างจิตสำนึก เพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรชีวภาพของประเทศให้คงอยู่ยั่งยืนสืบต่อไป การวิจัยดังกล่าวเหล่านี้ เป็นโครงการต่อเนื่อง ซึ่งจะทำให้เพิ่มองค์ความรู้ในโครงการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ตามความต้องการของประเทศ



โครงการวิจัยย่อย 2550

ลำดับที่	เรื่อง	รายงานวิจัย
1	การศึกษา ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกบนา (<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>) ที่พบในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี และพื้นที่ข้างเคียง	1
2	การศึกษาปรสิตในกบนา (<i>Hoplobatrachus rugulosus</i>) ที่พบในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี และพื้นที่ข้างเคียง	2
3	การศึกษาระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Testosterone) ในเข้ผีเสื้อ <i>Leiolepis belliana belliana</i> ในช่วงฤดูสืบพันธุ์	3
4	ความหลากหลายของ ปู บริเวณอ่าวสัดหีบ	4
5	โครงการฝึกอบรม ความหลากหลายทางชีวภาพ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สำหรับนักเรียนครู และอาสาสมัคร ระดับมัธยมศึกษา	5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัย

โครงการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม
อันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร
กบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)

ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
พระเจ้าอยู่หัวฯ จังหวัดชลบุรี และพื้นที่ข้างเคียง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

โดย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ มุสดี ปริยานนท์ และคณะ

หน่วยปฏิบัติการวิจัยสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2550 คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการเข้าทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ หน่วยปฏิบัติการวิจัยสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลาน และ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการดำเนินงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน 2550

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร
กบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)
ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
เขาเขียวเขาชมพู่ จังหวัดชลบุรี และพื้นที่ข้างเคียง

คณะผู้วิจัย

สุลตี ปริยานนท์, วิเชษฐุ์ คนชื้อ, ศานิต ปิยพัฒน์นกร และ อนุสรณ์ ปานสุข

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของ กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ระหว่างประชากร 2 กลุ่ม จากจังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดสระแก้ว โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 12S rRNA พบว่ามีลำดับเบสที่แตกต่างกันเพียง 3 ตำแหน่ง จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการศึกษาในประชากรของกบนา และ จากการศึกษาโดยวิธี Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) ระหว่างประชากร 3 กลุ่ม จากจังหวัดชลบุรี และประชากรพื้นที่ข้างเคียงภาคกลาง 2 กลุ่ม พบว่ามีไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรม จำนวน 3 แบบ จากจำนวนไพรเมอร์ ทั้งหมดจำนวน 47 แบบ ได้แก่ ไพรเมอร์ HB12, ไพรเมอร์ SAS 3, ไพรเมอร์ TL-02

คำสำคัญ: กบนา ความหลากหลายทางพันธุกรรม

The genetic diversity of rice field Frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) in Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Mahachakri Sirindhon, Kao Keaw Kao Chompoo Forest, Chonburi Province

Abstract

To examine genetic diversity of rice field Frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) between 2 populations, Nakhonratchasima Province and Srakaew Province by using 12S rRNA sequences. The sequences divergence of 12S rRNA was very low. By using inter-simple sequence repeat (ISSR) technique to examine genetic diversity between 3 populations; Chonburi Province and 2 areas of the central part of Thailand. Forty seven primers were screened to obtain suitable ISSR primers. The three ISSR primers (HB 12, SAS 3 and TL-02) provided reliable, consistent and polymorphic ISSR profiles.

Keywords; rice field Frog, *Hoplobatrachus rugulosus* , genetic diversity,

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญเรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)

ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เขาเขียวเขาชมพู่ จังหวัดชลบุรี

กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
สารบัญเรื่อง.....	iv
สารบัญรูป.....	v
บทนำ.....	1
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
วิธีดำเนินการศึกษา.....	3
ผลการศึกษา.....	6
สรุปและวิจารณ์ผล.....	14
ข้อเสนอแนะ.....	14
เอกสารอ้างอิง.....	15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ 1	แถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มจำนวนด้วย PCR	6
รูปที่ 2	ลำดับเบสบริเวณอื่น 12S rRNA ที่เปรียบเทียบกับโปรแกรม Cluster X ...	7
รูปที่ 3	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ HB 12 จังหวัดชลบุรี	9
รูปที่ 4	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SAS 3 จังหวัดอ่างทอง	9
รูปที่ 5	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SAS 3 จังหวัดนครปฐม	10
รูปที่ 6	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SAS 3 จังหวัดชลบุรี	10
รูปที่ 7	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ TL-20 จังหวัดอ่างทอง	11
รูปที่ 8	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ TL-20 จังหวัดนครปฐม	11
รูปที่ 9	แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ TL-20 จังหวัดชลบุรี	12
รูปที่ 10	ไพรเมอร์ 17898 B.....	12
รูปที่ 11	ไพรเมอร์ SAS1	12
รูปที่ 12	ไพรเมอร์ T8703	12
รูปที่ 13	ไพรเมอร์ T8706	12
รูปที่ 14	ไพรเมอร์ T8713	12
รูปที่ 15	ไพรเมอร์ UBC 809	12
รูปที่ 16	ไพรเมอร์ UBC 811	13
รูปที่ 17	ไพรเมอร์ UBC 840	13
รูปที่ 18	ลักษณะกบนาเพศผู้	13
รูปที่ 19	ลักษณะกบนาเพศเมีย	13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

กบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์ Ranidae สามารถพบได้ทุกภาคของประเทศไทย เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ที่มีลักษณะทั่วไป ลำตัวสีเขียวมะกอกอมน้ำตาล หลังและสีข้างมีจุดสีดำจางๆกระจายอยู่ทั่วไป ท้องสีขาว ได้คางมีลายขีดยาวๆสีดำแผ่นหลังมีรอยพับไม่ต่อเนื่องตามยาวตั้งแต่หัวถึงเอวประมาณ 9 แถว ตามปกติจะพบอาศัยอยู่บริเวณในนาที่มีน้ำท่วมขัง และจะออกมาผสมพันธุ์ในเวลากลางวันของวันที่มีฝนตกหนักครั้งแรกในช่วงฤดูฝน

กบนาจัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอีกชนิดหนึ่งที่มีผู้นิยมจับมาบริโภค ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงเป็นสัตว์เศรษฐกิจ โดยเริ่มมีการเพาะเลี้ยงประมาณ 20 ปีที่ผ่านมา (Pariyanonth and Daorerk, 1995) พ่อแม่พันธุ์กบนาที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นกบที่จับมาจากธรรมชาติ นำมาคัดเลือกลักษณะที่ดีโดยดูจากภายนอกและมีการเจริญเติบโตเร็ว แต่ในปัจจุบันสภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลง สภาพที่อยู่อาศัยของกบนาถูกบุกรุกเปลี่ยนแปลงไปเป็นที่อยู่อาศัยของมนุษย์ สภาพภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาล สภาพแวดล้อมมีการปนเปื้อนจากสารเคมี ส่งผลให้ประชากรของกบนาในธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว จำนวนพ่อพันธุ์แม่พันธุ์กบนาจากธรรมชาติที่นำมาจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ลดน้อยลงไปด้วย ส่งผลให้ประชากรกบนาที่เป็นพ่อแม่พันธุ์ที่นำมาเพาะเลี้ยง มีการผสมแบบเลือดชิด (inbreeding) ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง มีผลต่อคุณภาพของลูกกบที่ออกมาด้วย

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรของกบนาที่พบในธรรมชาติในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เขาเขียวเขาชมพู่ จังหวัดชลบุรี เปรียบเทียบกับประชากรกบนาในพื้นที่ใกล้เคียง และพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ อื่นๆที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของประชากรสัตว์ในกลุ่มนี้ นอกจากนี้จากผลที่ได้ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการกำหนดสายพันธุ์ เพื่อใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์กบนาที่จะนำไปใช้การเพาะเลี้ยงในอนาคต

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สามารถนำวิธีการทางด้านอนุพันธุศาสตร์มาใช้ได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น การศึกษารูปแบบของลักษณะทางพันธุกรรมของ Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) ซึ่งเป็นซาลาแมนเดอร์ที่ใกล้สูญพันธุ์ จากการตรวจสอบลำดับเบสของยีน cytochrome *b* และยีน ATPase 6 พบว่า มีลำดับเบสที่เหมือนกัน ทำให้ทราบว่าประชากรของซาลาแมนเดอร์ชนิดนี้มีความหลากหลายทาง

พันธุกรรมต่ำ ซึ่งอาจจะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ได้ (Murphy และคณะ, 2000) เช่นเดียวกันกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ Malagasy poison frog (*Mantella bernhardi*) ในประเทศมาดากัสการ์ โดยการตรวจสอบลำดับเบสของยีน cytochrome *b* สามารถแบ่งประชากรของ Malagasy poison frog ได้เป็นสองกลุ่ม (Viates และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับเบสของยีน 12S rRNA และยีน 16 S rRNA สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการอ้างอิงถึงถิ่นที่อยู่อาศัยในกบสกุล *Fejervarya* ได้เช่นกัน (Kurabayashi และคณะ, 2005)

สำหรับการศึกษาทางด้านอนุพันธุศาสตร์ของกบนาที่ผ่านมา ในปี 2001 Kosuch และคณะ ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของกบในวงศ์ Ranidae จำนวน 34 ชนิด พบว่า กบในสกุล *Hoplobatrachus* ที่พบในทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชีย รวมทั้งกบนา มีความเหมือนกันทางพันธุกรรม เมื่อพิจารณาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA ในปี 2004 Grosjean และคณะ ได้ทำการศึกษาการกระจายตัว และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกบในสกุล *Hoplobatrachus* โดยใช้ลักษณะฐานวิธานของลูกอ๊อด และลำดับเบสของยีนทั้งสิ้น 6 ตำแหน่ง พบว่า กบในสกุล *Hoplobatrachus* ที่พบในทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชียมีความสัมพันธ์กัน โดยมีกบในสกุล *Euphylys* เป็น sister group และในปี 2006 Jiwyam และคณะได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกบนาที่เพาะเลี้ยงบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า กบนาจากแหล่งเพาะเลี้ยงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน ทำให้เกิดปัญหาการพัฒนาพันธุ์กบในอนาคต

วัตถุประสงค์

- 1) ศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมของประชากรกบนาในธรรมชาติในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เชาเขี้ยวเขามพู่ จังหวัดชลบุรี
- 2) ศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมของประชากรกบนาที่นำมาใช้เลี้ยงในพื้นที่ข้างเคียงในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอื่นๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดนครราชสีมา
- 3) เพื่อนำข้อมูลที่ได้ ไปประยุกต์ใช้ในด้านการศึกษาอนุรักษ์และการพัฒนาพันธุ์กบนา และการปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงสถานภาพปัจจุบันของประชากรกบนาและการแปรผันทางพันธุกรรมในประชากร ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์ และการคืนสู่

ธรรมชาติในพื้นที่เดิมที่มีประชากรกบนาลดน้อยลง รวมทั้งการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กบนาในแหล่งเพาะเลี้ยงต่อไป

วิธีดำเนินการศึกษา

ปีที่ 1 2550 ประกอบด้วย

1. การวิเคราะห์ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธี 12S rRNA
2. การวิเคราะห์ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธี ISSR

ปีที่ 2 2551 ประกอบด้วย

1. การวิเคราะห์ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธีศึกษาลำดับเบส ตำแหน่ง 16S rRNA และ control region ของไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ
2. นำผลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น PAUP เพื่อสรุปผลการศึกษา

การดำเนินการศึกษา ในปีที่ 1 (2550)

วิธีที่ 1 การวิเคราะห์ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธี 12S rRNA

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* จากบริเวณที่ต่างๆ จากนั้นทำการเก็บเนื้อเยื่อจากนิ้วเท้าของกบนาที่นำมาเป็นตัวอย่าง เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ
2. ทำการสกัดดีเอ็นเอเนื้อเยื่อที่หยดลงบนกระดาษกรอง ซึ่งประยุกต์จาก Hillis และคณะ(1996) ตามขั้นตอนดังนี้

(2.1) ตัดเนื้อเยื่อตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL.

(2.2) เติมสารละลาย TNE+1% SDS ปริมาตร 335 μ L และ Proteinase K (10 mg/mL) ปริมาตร 15 μ L ลงในหลอดทดลอง

(2.3) นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมง

(2.4) เติมสารละลาย Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol อัตราส่วน 25: 24: 1 ปริมาตร 700 μ L แล้วนำเข้าเครื่องเหวี่ยง ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

(2.5) ตูดสารละลายส่วนใสด้านบนลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ จากนั้นเติม เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100% ปริมาตร 1 mL. ลงในหลอดทดลอง

(2.6) นำหลอดทดลองตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน

- (2.7) นำมาเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนลงกันหมด
- (2.8) ดูดสารละลายด้านบนทิ้ง และเติมเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70% เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้วดูดเอทิลแอลกอฮอล์ทิ้ง ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ เพื่อให้ตะกอน ดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาตร 20 μ L เก็บดีเอ็นเอไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้บนแผ่นอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8%

3. ศึกษาความแตกต่างของพันธุกรรมของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งยีน 12S rRNA ด้วยเครื่อง PCR ซึ่งสภาวะในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ เป็นดังนี้

- Pre-heat = 94 องศาเซลเซียส 3 นาที
 - Denature = 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที
 - Annealing = 57 องศาเซลเซียส 45 วินาที
 - Extension = 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
 - Final-extension = 72 องศาเซลเซียส 10 นาที
- } 35 รอบ

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* โดยใช้ไพรเมอร์ในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ 12 SL-524 (5'-AAA CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA T-3') และ 12 SH-981 (5'-GTA CAC TTA CCT TGT TAC GAC TT-3')

4. ทำการ run gel เพื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1% จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแล้วให้บริสุทธิ์ด้วย QIA quick purification kits (Qiagen) และทำการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง ABI PRISM 3100 โดยใช้ไพรเมอร์ 12 SL-524 และไพรเมอร์ 12 SH-981 ในการหาลำดับเบส
5. นำลำดับเบสบริเวณยีน 12S rRNA มาเปรียบเทียบความเหมือนโดยใช้โปรแกรม Clustal X

วิธีที่ 2. การวิเคราะห์ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยวิธี ISSR

2.1. ทำการเก็บเนื้อเยื่อจากนิ้วของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ในพื้นที่จังหวัดชลบุรี และจังหวัดนครปฐม จังหวัดอ่างทอง ตามวิธีของ Vieites และคณะ (2006)

2.2. นำชิ้นเนื้อขนาดประมาณ 2 มม. จากนิ้วของกบนามาย่อยด้วย Proteinase K ความเข้มข้น 10 mg/ml แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอ ด้วย Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol อัตราส่วน 25: 24: 1 (Hillis *et al.*, 1996) และตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้บนแผ่นอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8%

2.3. ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ด้วยเทคนิค ISSR โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction) และหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาจำนวนทั้งสิ้น 47 ชนิด โดยปริมาณที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในเครื่อง PCR ทั้งสิ้น 25 μ L ประกอบด้วย DNA 10-20 ng, dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อย่างละ 250 μ M, ไพรเมอร์ 1 μ M, 1X PCR buffer, *Taq* DNA polymerase 1 units (Fermentas)

ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ได้แก่

ขั้นที่ 1 Initial-denaturation	94 °C	5 นาที	} 45 รอบ
ขั้นที่ 2 Denaturation	94 °C	45 วินาที	
ขั้นที่ 3 Annealing	40 °C	45 วินาที	
ขั้นที่ 4 Extension	72 °C	2 นาที	
ขั้นที่ 5 Final-extension	72 °C	10 นาที	

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้ว นำไปตรวจสอบในแผ่นอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 2% ที่ผ่านกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้

2.4. นำไพรเมอร์ที่เหมาะสมมาใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของกบนา โดยเครื่อง PCR ตามสภาวะในข้อ 3 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้ว นำไปตรวจสอบในแผ่นอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 2% ที่ผ่านกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นอะกาโรสเจล โดยการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็น 1 และที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็น 0 จากนั้นนำผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PAUP เวอร์ชัน 4.0 b10 (Swofford, 2002)

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกบนา โดยการหาลำดับเบสของยีน 12S rRNA ซึ่งได้ทำการทดสอบเบื้องต้นในกบนาจากกลุ่มประชากรในแหล่งธรรมชาติ 2 กลุ่ม ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา (NKR) และจังหวัดสระแก้ว (ARA) ด้วยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว ได้ผลการทดลองตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 ดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ 12 SL-524 และ 12 SH-981

ARA = ประชากรจากจังหวัดสระแก้ว

NKR = ประชากรจากจังหวัดนครราชสีมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จากนั้นจึงศึกษาลำดับเบสของยีน 12S rRNA ที่เพิ่มจำนวนได้นี้ จากตัวอย่างกบนา 2 กลุ่มประชากร ผลการทดลองพบว่า จำนวนเบสของยีน 12S rRNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ 12 SL-524 และ 12 SH-981 มีความยาวทั้งสิ้น 442-443 เบส และมีตำแหน่งต่างกันทั้งสิ้น 3 ตำแหน่ง ซึ่งนับว่ามีจำนวนน้อยมาก ดังในรูปที่ 2

```

ARA_18 GGGAAACCCCGCGCCAGGGAACCTACGAGCCTTAGCTTAAAACCCAAAGGACTTGACGGTG
NKR_20 GGGAAACCCCGCGCCAGGGAACCTACGAGCCTTAGCTTAAAACCCAAAGGACTTGACGGTG
☆☆*****

ARA_18 TCCCACCCAACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAACCCCGCTTCACCCAACCCCC
NKR_20 TCCCACCCAACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAACCCCGCTTCACCCAACCCCC
☆☆*****

ARA_18 CTTGCTTTATCAGCCTGTATACCTCCGTCGTAAACCCGCGGTATGAATGTACTTAAGCGG
NKR_20 CTTGCTTTATCAGCCTGTATACCTCCGTCGTAAACCCGCGGTATGAATGTACTTAAGCGG
☆☆*****

ARA_18 ATTCAATGGTCTCCACCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAGCCAATGGAGGTGGTAAGTAA
NKR_20 ATTCAATGGTCTCCACCAACACGTCAGGTCAAGGTGCAGCCAATGGAGGTGGTAAGTAA
☆☆*****

ARA_18 TGGGCTACAATTTCTAACTAGAACAAACGAAGTACTGCATGAAACACAGTCATGAAGGA
NKR_20 TGGGCTACAATTTCTAACTAGAACAAACGAAGTACTGCATGAAACACAGTCATGAAGGA
☆☆*****

ARA_18 GGATTTAGTAGTAAAAAGAAAGTAGCGTGTCTTTTTAACACGGCCCTGGGACGTGTACA
NKR_20 GGATTTAGTAGTAAAAAGAAAGTAGCGTGTCTTTTTAACACGGCCCTGGGACGTGTACA
☆☆*****

ARA_18 CACCGCCCGTCGCCCTCTTCGACAATACTATTCTGTTACCTAACCCAACCTAATAACTAGA
NKR_20 CACCGCCCGTCGCCCTCTTCGACAATACTATTCTGTTACCTAACCCAACCTAATAACTAGA
☆☆*****

ARA_18 GAAGAGGTAAGTCGTAACAAGGT
NKR_20 GAAGAGGTAAGTCGTAACAAGGT
☆☆*****

```

รูปที่ 2 ลำดับเบสบริเวณยีน 12S rRNA เมื่อเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม Clustal X

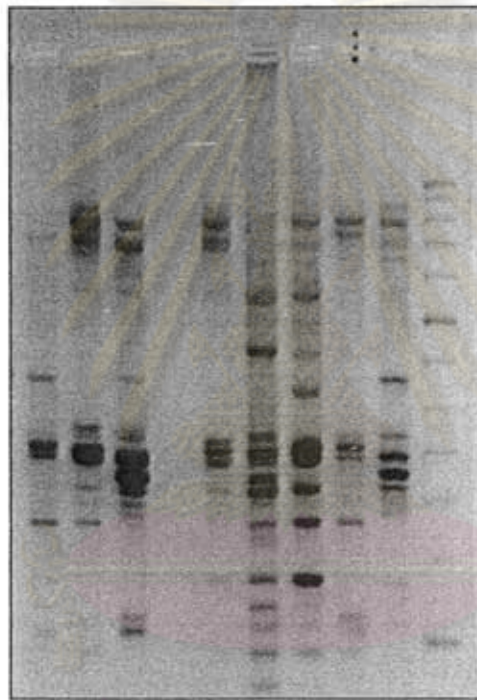
ARA = ประชากรจากจังหวัดสระแก้ว

NKR = ประชากรจากจังหวัดนครราชสีมา

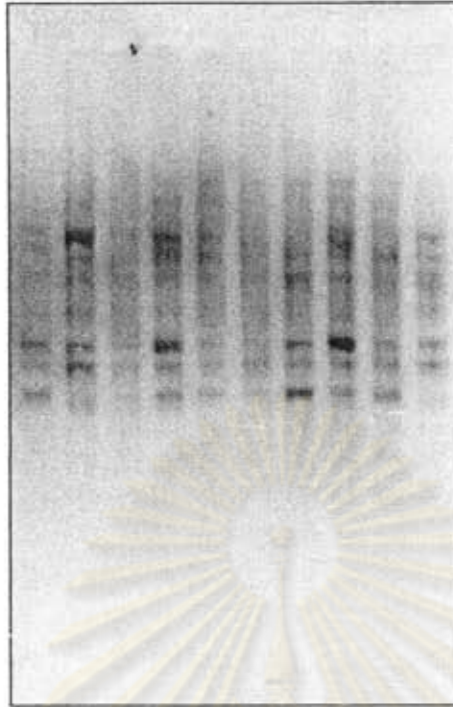
จากลำดับเบสของยีน 12S rRNA ในไมโทคอนเดรียของกบนาที่มีความแตกต่างกัน้อยมาก ทำให้ไม่เหมาะสมในการนำลำดับเบสของยีนดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งจะต้องหาตำแหน่งยีนอื่นในไมโทคอนเดรีย เพื่อนำมาหาลำดับเบส และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป

ผลการศึกษาจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ISSR

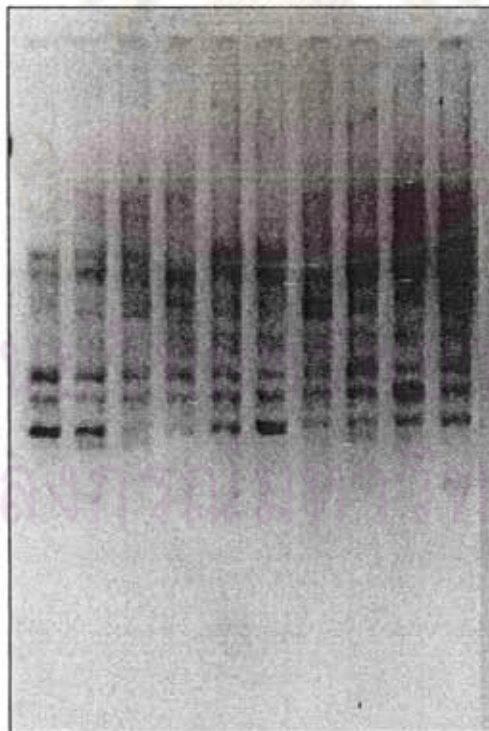
จากไพรเมอร์ทั้งหมด 47 แบบ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 3 แบบ ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรสเจล และสามารถนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และเมื่อทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์แต่ละชนิดดังกล่าว ได้แก่ ไพรเมอร์ HB 12, ไพรเมอร์ SAS 3, และไพรเมอร์ TL-02 รูปที่ 3-9 ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอ ที่สามารถเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างของขนาดแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มประชากร (polymorphism) ได้ดี ตามสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอข้างต้น



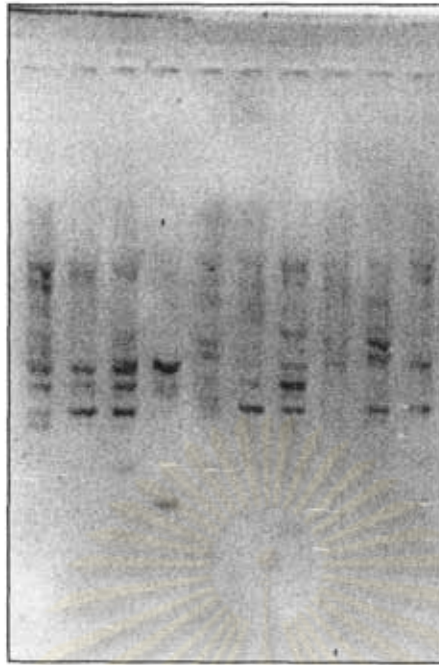
ศูนย์วิทยทรัพยากร
รูปที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ HB 12
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ของกบนาจังหวัดชลบุรี



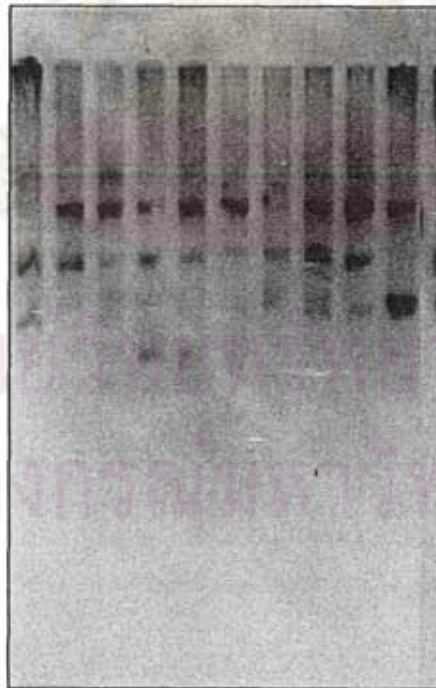
รูปที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SAS 3
จากพื้นที่ข้างเคียง 1 (อ่างทอง)



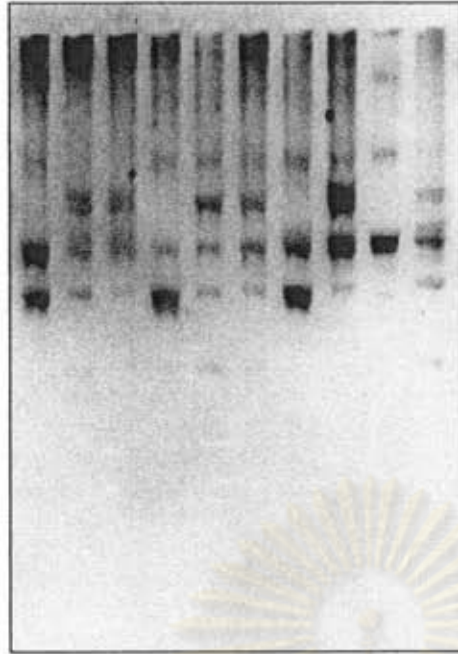
รูปที่ 5 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SAS 3
จากพื้นที่ข้างเคียง 2 (นครปฐม)



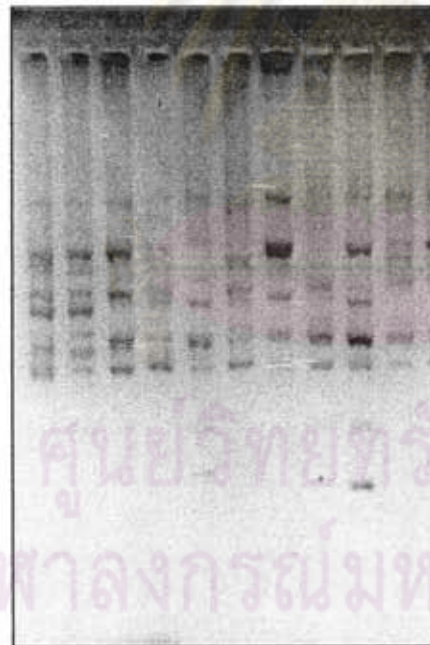
รูปที่ 6 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ SAS 3
ของกบนาจากจังหวัดชลบุรี



รูปที่ 7 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ TL-02
ของกบนาจาก พื้นที่ข้างเคียง 1 (อ่างทอง)



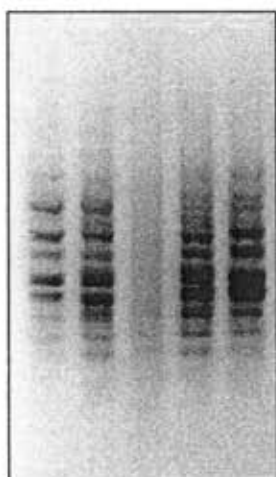
รูปที่ 8 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ TL-02
จากพื้นที่ข้างเคียง 2 (จังหวัดนครปฐม)



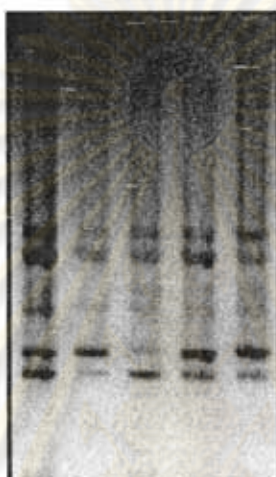
รูปที่ 9 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ TL-02
ของกบนาจากจังหวัดชลบุรี

และเมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้น จากการใช้ไพรเมอร์แบบต่างๆในการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอ พบว่า ยังมีไพรเมอร์บางแบบ ได้แก่ ไพรเมอร์ 17898 B, ไพรเมอร์ SAS 1, ไพรเมอร์ T 8703, ไพรเมอร์ T 8706, ไพรเมอร์ T 8713, ไพรเมอร์ UBC 809, ไพรเมอร์ UBC 811 และไพรเมอร์ UBC 840 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏยังมีความแตกต่างของขนาดแถบที่ไม่ชัดเจน ดังรูปที่ 10 - 17

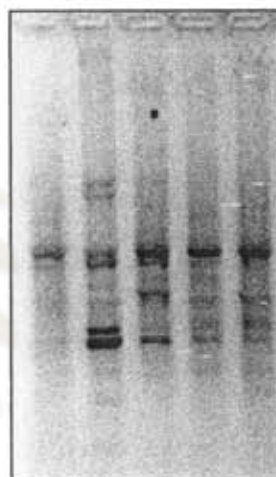
ดังนั้นจึงต้องทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วง annealing ของสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ในจำนวนหลายไพรเมอร์ ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม PAUP มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น



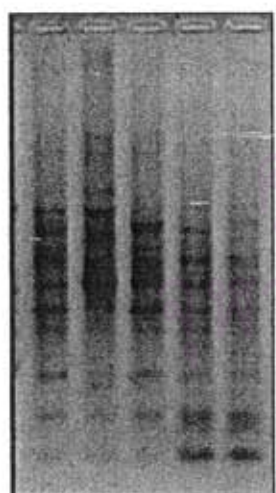
รูปที่ 10 ไพรเมอร์ 17898 B



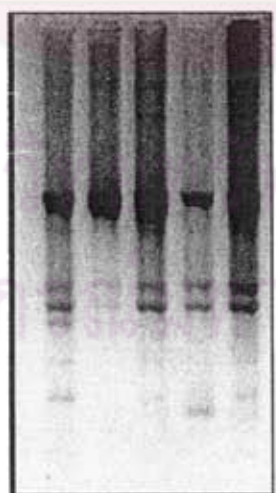
รูปที่ 11 ไพรเมอร์ SAS 1



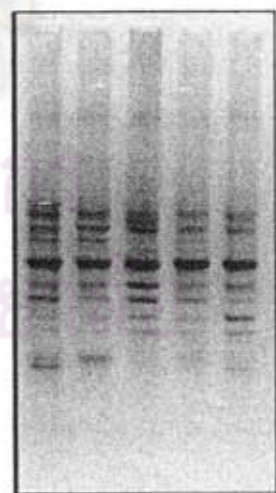
รูปที่ 12 ไพรเมอร์ T 8703



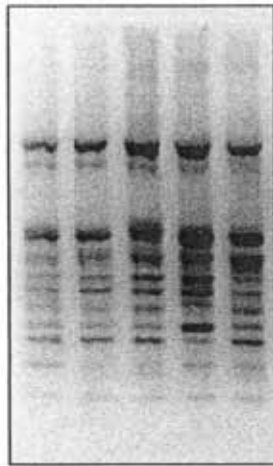
รูปที่ 13 ไพรเมอร์ T 8706



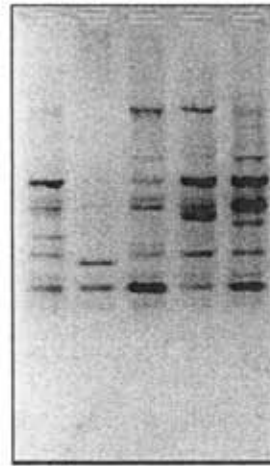
รูปที่ 14 ไพรเมอร์ T 8713



รูปที่ 15 ไพรเมอร์ UBC 809



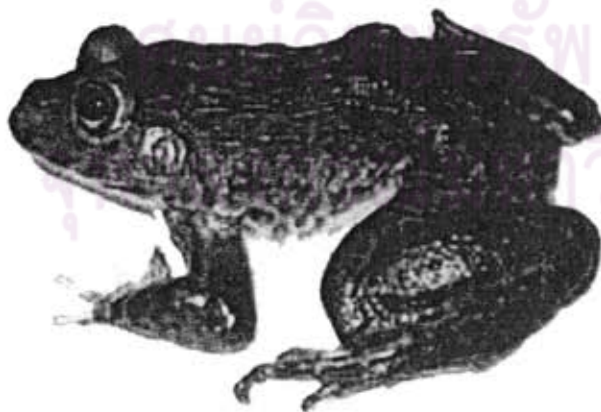
รูปที่ 16 โพรเบอ UBC 811



รูปที่ 17 โพรเบอ UBC 840



รูปที่ 18 ลักษณะของกบนาเพศผู้ (*Hoplobatrachus rugulosus*)



รูปที่ 19 ลักษณะของกบนาเพศเมีย (*Hoplobatrachus rugulosus*)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา โดยวิธี 12S rRNA และ ISSR

จากการศึกษาลำดับเบสของยีน 12S rRNA ในไมโทคอนเดรีย จำนวน 442-443 ลำดับเบส พบว่ามีความแตกต่างกันน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kurabayashi และคณะ ที่ทำการศึกษาในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกวงศ์ Bufonidae และ Ranidae จำนวน 13 ชนิด จะพบความแตกต่างของลำดับเบสของยีน 12S rRNA ภายในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดเดียวกันมีค่าต่ำมาก (3.17%) แต่จะมีความแตกต่างของลำดับเบสของยีน 12S rRNA ระหว่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดค่อนข้างสูง (27.68%) ดังนั้นการศึกษาคความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดเดียวกันจึงไม่น่าที่จะนำลำดับเบสของยีน 12S rRNA มาใช้ในการศึกษา

สำหรับการศึกษาคความแตกต่างทางพันธุกรรมของกบนา ด้วยเทคนิค ISSR จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาคครั้งนี้จำนวนทั้งสิ้น 47 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ เมื่อใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในขั้นตอน annealing จำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ HB 12, ไพรเมอร์ SAS 3, และไพรเมอร์ TL-02 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้นประมาณ 30 แถบ ซึ่งนับว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จะใช้ในการวิเคราะห์น้อย เนื่องจากโดยปกติการศึกษาคความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค ISSR ควรจะมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จะใช้ในการวิเคราะห์ประมาณ 100 แถบขึ้นไป (Kumar *et al.*, 2001) ดังนั้นจึงจะต้องทำการหาไพรเมอร์ที่จะทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นต่อไป โดยอาจจะทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้เพิ่มสูงขึ้นเพื่อที่จะได้ไพรเมอร์ที่สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น สำหรับใช้ในการนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของกบนาต่อไป

ขอเสนอแนะ และงานที่จะดำเนินการในขั้นต่อไป ในระยะ ที่2 (2551)

1. จะต้องทำการหาไพรเมอร์ที่จะทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเพิ่มเติม โดยอาจจะทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ให้เพิ่มสูงขึ้น
2. การวิเคราะห์ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธีศึกษาลำดับเบส ตำแหน่ง 16S rRNA และ control region ของไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ
3. นำผลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น PAUP เพื่อสรุปผลการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- Hillis, D. M., Mable, B. K., Larson, A., Davis, S. K. and Zimmer E. A. 1996. Nucleic acids IV: Sequencing and cloning. In "Molecular Systematics" Sinauer Associate, Sunderland, MA, pp 321-378.
- Jiwyam, W., Champasri, T. and Juntana, J. 2006. Determining genetic structure of culture *Rana rugolosa* populations by RAPD analysis. *KKU Res. J.*, 11(1): 17-24.
- Pariyanonth, P. and Daorerk, V. 1995. Frog farming in Thailand. *INFOFISH International*, 3/95: 25-28.
- Kosuch, J., Vences, M., Dubois, A., Ohler, A. and Bohme, W. 2001. Out of Asia: Mitochondrial DNA Evidence for an Oriental Origin of Tiger Frogs, Genus *Hoplobatrachus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21(3): 398-407.
- Kumar, L. D., Kathirvel, M., Rao, G. V. and Nagaraju, J. 2001. DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. *Foren. Sci. Int.* 116: 63-68.
- Vieites, D. R., Chiari, Y., Vences, M., Andreone, F., Rabemananjara, F., Bora, P., Nieto-Roman, S. and Meyer, A. 2006. Mitochondrial evidence for distinct phylogeographic units in the endangered Malagasy poison frog *Mantella bernhardi*. *Mol. Ecol.* 15: 1617-1625.
- Grosjean, S., Vences M. and Dubois, A. 2004. Evolutionary significance of oral morphology in the carnivorous tadpoles of tiger frogs, genus *Hoplobatrachus* (Ranidae). *Bio. J. Linn. Soc.* 81:171-181.
- Murphy, R. W., Fu, J., Upton, D. E., De Lema, T. and Zhao, E. 2000. Genetic variability among endangered Chinese giant salamanders, *Andrias davidianus*. *Mol. Ecol.* 9: 1539-1547.
- Kurabayashi, A., Kuramoto, M., Joshy, H. and Sumida, M. 2005. Molecular phylogeny of the ranid frogs from Southwest India based on the mitochondrial ribosomal RNA gene sequences. *Zoo. Sci.* 22: 525-534.