

การหาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรกบนาอีสานที่มีการเพาะเลี้ยง โดยการวิเคราะห์ RAPD

Determining Genetic Structure of Culture *Rana rugolosa* Populations by RAPD Analysis

วิรัช จิวแหยม (Wirat Jiwyam)^{1*}

ธงชัย จำปาศรี (Thongchai Champasri)²

จิรัชชัย จันทนะ (Jirachai Juntana)³

บทคัดย่อ

การหาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรกบนาอีสานที่มีการเพาะเลี้ยงโดยการวิเคราะห์ RAPD ดำเนินการกับกบที่ได้จากการเพาะพันธุ์รุ่นเดียวกันซึ่งมีอายุใกล้เคียงกันแต่มีขนาดแตกต่างกัน โดยกบขนาดเล็กมีน้ำหนักระหว่าง 50 ถึง 70 กรัม และกบขนาดใหญ่มีน้ำหนักระหว่าง 10 ถึง 150 กรัม โดยการนำเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในสภาพสดมาสกัดดีเอ็นเอ จากการศึกษาพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 55 ถึง 3,755 ng/μL ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอมีค่าอยู่ระหว่าง 1.27 ถึง 1.83 และจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ OPE15 OPE19 OPE20 OPY15 และ OPY19 ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 434 แถบ มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300 ถึง 1,031 คู่เบส โดยมีเปอร์เซ็นต์ แถบดีเอ็นเอที่ไม่เกิดขึ้นในกบทุกตัวในแต่ละไพรเมอร์ (polymorphic band) อยู่ระหว่าง 26.0 ถึง 47.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance; D) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.09–0.64 และดัชนีความคล้ายคลึง (Similarity index, S) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.36 ถึง 0.91

Abstract

Determining genetic structure of culture *Rana rugolosa* population by RAPD analysis performed with the same age group and different size of culture *Rana rugolosa*. Body weights of a small size group were between 50–70 g and body weights of a large size group *Rana rugolosa* were between 100–150 g. Fresh tissue from muscle of each *Rana rugolosa* was used for DNA extraction. The results of the study indicated that the concentration of extracted DNA was 55 to 3,755 ng/μL. The purity of DNA was 1.27 to 1.83. The result of DNA amplification with various primers; OPE15, OPE19, OPE20, OPY15 and OPY19, yield 434 DNA fragments. Size of DNA bands were between 300 to 1031 base pairs. The polymorphic band was 26.0 to 47.5 %. A genetic distance (D) was 0.09 to 0.64 and similarity index (S) was 0.36 to 0.91. The results of the present study indicated that all sizes of the same age population from different brood stocks were the same population. The different of growth resulted from environment or culture technique.

คำสำคัญ: กบนาอีสาน โครงสร้างทางพันธุกรรม RAPD

Keywords: *Rana rugolosa*, Genetic structure, RAPD

¹รองศาสตราจารย์ วิทยาเขตหนองคาย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³นักวิชาการประมง 6 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

*corresponding author

บทนำ

กบเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibian) ที่ชาวไทยรู้จักกันดี และนิยมบริโภคกันมาช้านาน ปัจจุบันความต้องการในการบริโภคกบมีสูงมาก เห็นได้จากการส่งออกกบไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เช่น ฮองกง ญี่ปุ่น มาเลเซีย เยอรมันนี ฝรั่งเศส และ สหรัฐอเมริกา (จิราภรณ์, 2534) เป็นผลทำให้การผลิตกบทั้งจากธรรมชาติและจากฟาร์มเพาะเลี้ยงกบไม่ทันกับความต้องการ ส่งผลให้ประชากรกบนาในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็วจนน่าเป็นห่วง (นิรนาม, 2547) และยังมีสาเหตุอื่นๆ อีกทำให้ปริมาณกบนาในธรรมชาติลดลงได้ เช่น การตัดไม้ทำลายป่า การเปลี่ยนแปลงพื้นที่ป่าเป็นพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งมีการใช้สารฆ่าแมลงอย่างรุนแรง และการสร้างโรงงานอุตสาหกรรมบริเวณทุ่งนา เป็นต้น (ทวีศักดิ์, 2548) กบที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ กบนา (*Rana rugulosa* Wiegmann, 1971) กบทูตหรือกบยักษ์หรือกบแดง (*Rana macrodon* Khul and Tschudi, 1839) และกบต่างประเทศคือกบบลูฟรอก (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) (พงพันธ์, 2539 และศุภชัย, 2537) กบเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอยู่ในวงศ์ *Ranidae* สกุล *Rana* (สมพร และสมโภชน์, 2535) Taylor (1962) รายงานว่า กบสกุล *Rana* ที่พบมีอยู่ 35 ชนิด ซึ่งได้ศึกษาจากที่อยู่ในวงศ์ *Ranidae* ลักษณะที่สำคัญของ กบในสกุล *Rana* คือเป็นกบที่มีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่มีรูปร่างตาอยู่ในแนวนอน มีฟันอยู่บนกระดูกขากรรไกรและบนเพดาน ลิ้นเป็นอิสระตอนท้ายเป็นหลุมลึก ปกติมองเห็นแก้วหู แต่บ่อยครั้งพบว่าแก้วหูซ่อนอยู่ใต้ผิวหนัง นิ้วมือไม่มีพังผืดยึดปลายแหลมหรือฟองออก ฝ่าเท้าด้านนอก ถูกแยกออกโดยพังผืด กระดูกอก มีส่วนที่เป็นกระดูกแข็ง กบสกุลนี้เป็นชนิดที่แพร่หลายที่สุดในประเทศไทย มีประมาณ 34 ชนิด (วิโรจน์, 2544) ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงกบของประเทศไทยคือ การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กบ เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในปัจจุบันเริ่มมาจากการนำพ่อแม่พันธุ์มาจากธรรมชาติ ซึ่งอาจจะเป็นกบที่ต่างชนิดกัน Taylor (1962) รายงานว่า

กบพื้นเมืองจะโตเต็มที่เมื่ออายุ 12 ถึง 18 เดือน ประกอบกับการนำกบบลูฟรอกเข้ามาในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2497 ดังนั้นพ่อแม่พันธุ์กบที่มีการเพาะเลี้ยงในปัจจุบันอาจเป็นกบที่มีการผสมข้ามชนิด แม้อาจจะไม่เกิดจากการผสมโดยตรงแต่อาจจะเกิดจากกบที่มีการเพาะเลี้ยงหลุดลอดออกสู่ธรรมชาติ ดังนั้นการตรวจสอบชนิดกบที่มีการเพาะเลี้ยงตามฟาร์มต่างๆ รวมถึงกบที่พบในธรรมชาติจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งในการคัดเลือกหรือจัดการพ่อแม่พันธุ์เพื่อประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงในอนาคต ซึ่งการเลี้ยงกบนี้มีประโยชน์ในหลายๆ เรื่อง เช่น เป็นอุปกรณ์ทางการศึกษาทางการแพทย์ การวิจัยทางชีววิทยา และการทดลองทางวิทยาศาสตร์ สร้างความเพลิดเพลินใจแก่ผู้เลี้ยง ใช้เป็นอาหารและสร้างรายได้ให้แก่ครัวเรือนได้ และช่วยทำให้ระบบนิเวศในนาสมดุล เป็นต้น

การเลี้ยงกบในปัจจุบันพบว่ามีปัญหาสำคัญหลายประการ เริ่มจากการขยายพันธุ์ การอนุบาล จนถึงวิธีการเลี้ยง ซึ่งปัญหาที่พบส่วนใหญ่เป็นปัญหาเรื่องการเงินกันเอง หรืออาจเกิดจากสภาพสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ อาจมีผลกับการพัฒนาของตัวอ่อน ดังนั้นการวิจัยนี้เพื่อทราบโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรกบนาอีสานที่มีการเพาะเลี้ยงในปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกบพื้นเมืองด้วยเทคนิค RAPD

นำเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในสภาพสดของกบพื้นบ้านมาสกัดดีเอ็นเอด้วย phenol:chloroform method ทำการตรวจสอบคุณภาพการสกัดบน 0.8% agarose gel electrophoresis หลังจากจึงเตรียมส่วนผสมรวม 10 µl เพื่อการทำพีซีอาร์ ดังนี้ คือ 10x Taq buffer 1 µl MgCl₂ 1 µl dNTPs mix 1 mM each Primer 100 pmol (0.1 mM) Taq Polymerase 1 µl และ genomic DNA ความเข้มข้น 25 ng 1 µl แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 µl นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งโปรแกรมควบคุมการ

ทำงานดังนี้ ขั้นที่ 1 94°C 2 นาที 1 รอบ ขั้นที่ 2 94°C 1 นาที 38°C 1 นาที 72°C 1 นาที 43 รอบ และขั้นที่ 3 72°C 5 นาที 10°C 10 นาที 1 รอบ แล้ว ค้างไว้ที่ 4°C ในศึกษาครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ 6 ไพรเมอร์ คือ OPE15 (5'-3', AGCGACAACC) OPE17 (5'-3', CTACTGCCGT) OPE19 (5'-3', ACGGCGTATG) OPE20 (5'-3', AACGGT GACC) OPY15 (5'-3', AGTCGCCCTT) และ OPY19 (5'-3', TGAGGGTCCC) หลังจากเสร็จ ขั้นตอนพีซีอาร์จึงนำส่วนผสมที่ได้จากการทำพีซีอาร์ 10 µl มาผสมกับสีย้อม (loading dye) 2 µl แยกบน 2% agarose gel และย้อมด้วย EtBr โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker เพื่อตรวจวิเคราะห์รูปแบบ ดีเอ็นเอ

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

นำผลรูปแบบดีเอ็นเอ (DNA banding pattern) ที่ปรากฏจากประชากรกบและจากทุก ๆ ไพรเมอร์ ไปสร้างเป็นตารางข้อมูล โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จากกลุ่มประชากรกบที่ทำการศึกษา โดยตัวอย่างที่ พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ให้คะแนน (1) ส่วน ตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันให้ คะแนน (0) หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม NTSys-pc2.1 เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากร ความหลากหลายและความสัมพันธ์ ของกลุ่มประชากรโดยอาศัยค่าดัชนีความคล้ายคลึง (Similarity index, S) ตามทฤษฎีของ Nei and Li (1979) จากสูตร

$$S = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y}$$

เมื่อ n_x , n_y และ n_{xy} คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ พบในประชากร X Y และทั้ง X และ Y

ค่า S ที่ได้สามารถนำมาคำนวณหาความแตกต่าง ทางพันธุกรรมของประชากร (Genetic dissimilarity หรือ Genetic distance, D) จาก $D = 1 - S$ ตามวิธีของ Lynch (1990)

3. การหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ Dendrograms

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method Analysis) ตามวิธีของ Sneath and Sokal (1973) โดยอาศัยโปรแกรมวิเคราะห์ NTSYS-pc2.1 ตามวิธีของ Rohlf (2000).

ผลการศึกษา

1. คุณภาพดีเอ็นเอ

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อ กบมีค่าระหว่าง 55 ถึง 3,755 ng และมีความบริสุทธิ์ ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.27 ถึง 1.83 (ตารางที่ 1)

2 ผลการทดสอบไพรเมอร์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ จำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ OPE15 OPE17 OPE19 OPE20 OPY15 และ OPY19 ปรากฏว่าไพรเมอร์ที่มี ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ผล สม่ำเสมอมีจำนวน 5 ไพรเมอร์ คือ OPE15 OPE19 OPE20 OPY15 และ OPY19 (รูปที่ 1)

3 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกบขนาดใหญ่ และขนาดเล็กด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ คือ OPE15 OPE19 OPE20 OPY15 และ OPY19 ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 434 แถบ มีขนาดของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300 ถึง 1,031 คู่ เบส โดยมีแถบดีเอ็นเอที่ไม่เกิดขึ้นในกบทุกตัวในแต่ละ ไพรเมอร์ (polymorphic band) อยู่ระหว่าง 26.0 ถึง 47.5 เปอร์เซ็นต์

4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกบ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ ประชากรกบ พบว่าค่า S ของประชากรกบขนาดใหญ่ และขนาดเล็กมีค่าอยู่ระหว่าง 0.36 ถึง 0.91 (ตาราง ที่ 2 และรูปที่ 2) โดยที่ประชากรส่วนมากมีค่า S

ค่อนข้างสูง ซึ่ง สอดคล้องกับค่าของระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance; D) ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.09 ถึง 0.64 ซึ่งถือว่าระยะห่างทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับระยะห่างทางพันธุกรรมสูงสุด ($D = 1.00$)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ในการศึกษาด้านชีวโมเลกุลภายในประชากรกบขนาดเล็กและขนาดใหญ่โดยการนำเนื้อเยื่อสดมาสกัดดีเอ็นเอพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร มีค่าอยู่ระหว่าง 0.114 ถึง 0.903 และมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (อัตราส่วน A_{260}/A_{280}) อยู่ระหว่าง 1.27 ถึง 1.83 โดยที่ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์นั้นควรมีอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8 (Sambrook et al., 1989; Sambrook and Russel, 2001) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อสกัดดีเอ็นเอทุกขั้นตอนมีการเตรียมอย่างระมัดระวังโดยเฉพาะในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอต้องกระทำเบา ๆ เพื่อป้องกันการฉีกขาดของดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งอาจมีผลต่อปฏิกิริยา PCR ในการเลือกไพรเมอร์สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้นำไพรเมอร์ชนิด 10 mer kit ที่ผลิตจากบริษัท Operon Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 5 ไพรเมอร์ คือ OPE15, OPE19, OPE20, OPY15 และ OPY19 ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวอาจยังมีคุณสมบัติไม่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่เกิดขึ้นในกบทุกตัวในแต่ละไพรเมอร์ (polymorphic band) ค่อนข้างน้อย ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ประชากรกบนาอีสานที่มีการเพาะเลี้ยงมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันมากโดยสังเกตได้จากค่าตรรกะความคล้ายคลึงและค่าของระยะห่างทางพันธุกรรม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประชากรกบที่นำมาศึกษามีการผสมแบบเลือดชิด (inbreeding) ประชากรของกบขนาดเล็กและขนาดใหญ่จากพ่อแม่พันธุ์หลายคู่มาจากประชากรเดียวกัน ความแตกต่างของขนาดอาจจะได้รับอิทธิพลมาจากสิ่งแวดล้อมและเทคนิคการเลี้ยง และหากพ่อแม่พันธุ์ยังมีการผสมพันธุ์แบบนี้

ต่อไปจำนวนหลายรุ่น อาจส่งผลเสียต่อการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม จากผลที่ได้สามารถสรุปความสัมพันธ์ในระหว่างกลุ่มประชากรได้และสมควรอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องต่อไปอีกเพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบซึ่งส่งผลไปถึงการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการเก็บรวบรวมประชากรกบจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อนำมาศึกษาด้านพันธุกรรมเปรียบเทียบกัน และควรมีตัวอย่างในการศึกษาอย่างพอเพียง อย่างไรก็ตามการที่ได้ศึกษาในครั้งนี้ถือเป็นการเริ่มต้นในเรื่องดังกล่าวสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับประชากรกบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงกบ และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชีววิทยาของกบโดยเฉพาะชีวประวัติของกบชนิดต่าง ๆ ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการเพาะเลี้ยง

เอกสารอ้างอิง

- จิราภรณ์ ชีวะปรีชา. 2534. กบไทยไปนอก. วารสารส่งเสริมการลงทุน 2(1): 25-27. (cited 30 June 2005) Available from: URL: <http://www.lib.ru.ac.th/journal/frog.html#top>.
- นิรนาม ก. 2547. วิจัยชี้ “กบนา” ของไทยวิกฤติใกล้สูญพันธุ์ เหตุใช้สารเคมีสูงสภาพแวดล้อมเปลี่ยน. หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ. (cited 30 June 2005) Available from: URL: http://www.environment.in.th/news_detail.asp?id=1112.
- ทวีศักดิ์ บุตรตัน. 2548. กบ เขียดและคางคก. มติชนสุดสัปดาห์ 25(1286). (cited 31 June 2005) Available from: URL: <http://www.matichon.co.th/weekly/weekly.php?srctag=0418080448&srcday=2005/05/27&search=no>

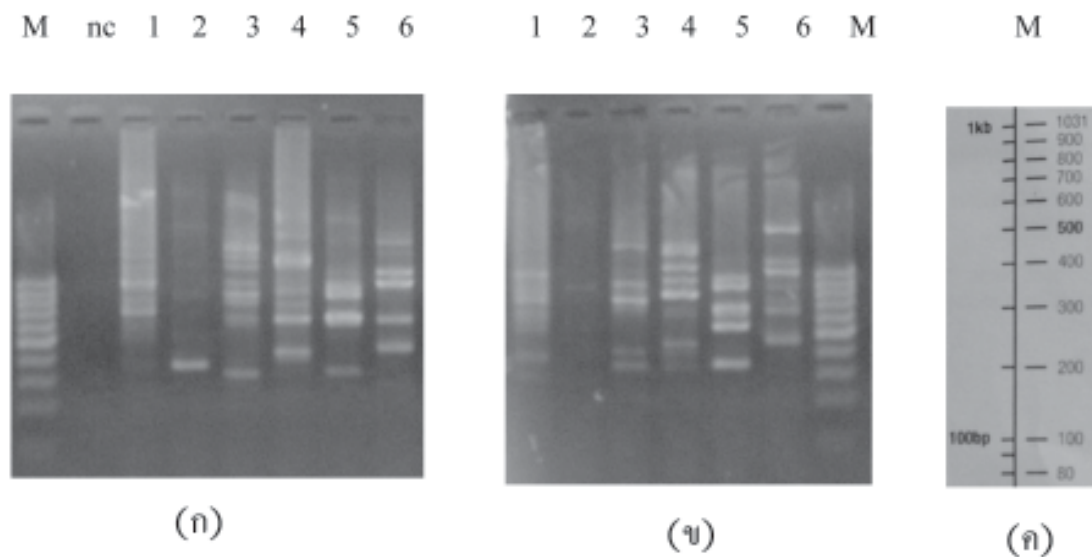
- พงษ์พันธ์ อินทรวัดน์. 2539. การเลี้ยงกบ. อักษร
สยามการพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- วิโรจน์ นุตพันธุ์. 2544. คู่มือคนรักสัตว์: สัตว์สะเทิน
น้ำสะเทินบกในประเทศไทย. บ้านและสวน.
กรุงเทพฯ.
- ศุภชัย ชาตวรกุล. 2537. คู่มือการเลี้ยงกบเป็นการ
ค้า. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์. กรุงเทพฯ.
- สมพร ภูริพงษ์ และสมโภชน์ อัคระทีวีวัฒน์. 2535.
ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. กรมประมง
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA
fingerprinting. **Mol. Biol. Evol.** 7: 478-84.
- Nei, M. and Li, W. 1979. Mathematical model for
studying genetic variation in terms of re-
striction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci.**
USA. 76: 5269-5278.
- Rohlf, F. J. 2000. **Numerical taxonomy and
Multivariate Analysis System.** NTSYS-pc.
Department of Ecology and Evolution. State
University of New York. New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989.
Molecular Cloning: A Laboratory Manual
2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. 2001. **Molecular
Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed.** Cold
Spring Harbor Laboratory Press.
- Sneat, T. H. A. and Sokal, R. R. 1973. **Numerical
Taxonomy.** San Francisco. Freeman.
- Taylor, E. H. 1962. **The Amphibian Fauna of
Thailand.** Science Bulletin Vol. XLIII No.8.
The University of Kansas.

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอกบ

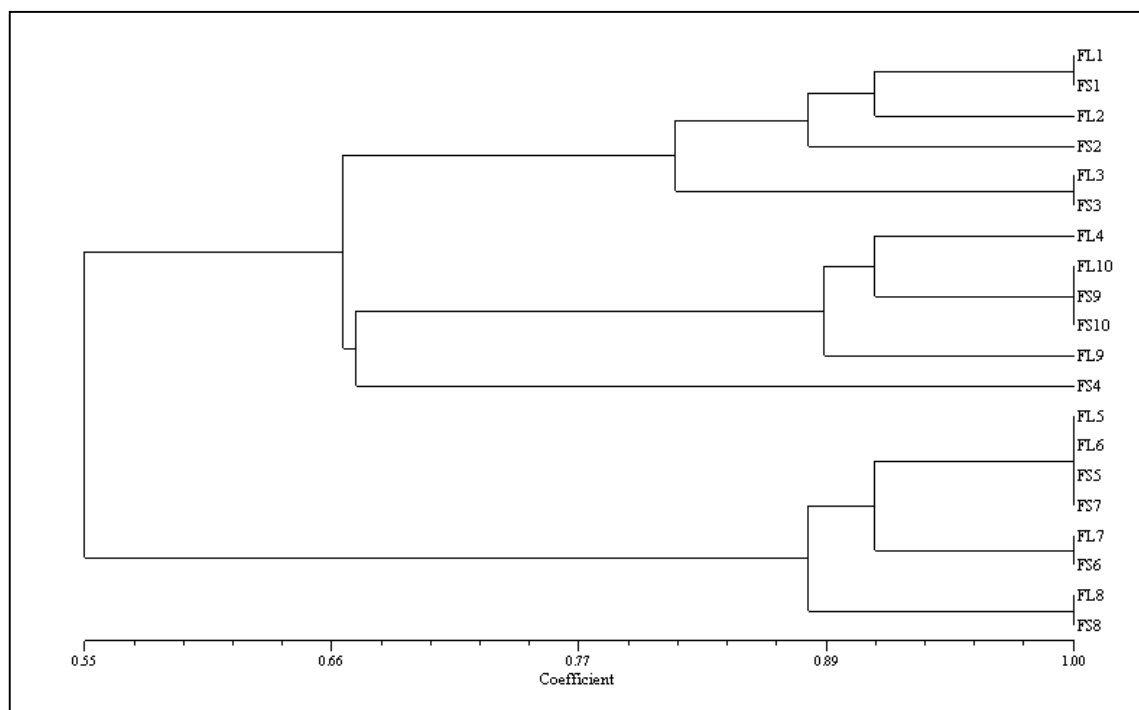
ขนาดกบ		ค่าดูดกลืนแสง		ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ μ L)	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ
		260 nm	280 nm		
กบขนาดใหญ่	1	0.197	0.353	492.5	1.43
	2	0.259	0.460	647.5	1.52
	3	0.198	0.500	495.0	1.42
	4	0.745	0.470	337.5	1.31
	5	0.135	0.431	1862.5	1.81
	6	0.137	0.918	342.5	1.62
	7	0.252	0.432	277.5	1.78
	8	0.127	0.421	285.0	1.43
	9	0.704	0.410	55.0	1.72
	10	0.126	0.361	630.0	1.56
กบขนาดเล็ก	1	0.159	0.581	317.5	1.43
	2	0.114	0.368	3755.0	1.47
	3	0.194	0.425	485.0	1.81
	4	0.157	0.468	392.5	1.83
	5	0.126	0.385	315.0	1.56
	6	0.704	0.383	1760.0	1.43
	7	0.144	0.447	2457.5	1.36
	8	0.205	0.422	512.5	1.82
	9	0.281	0.740	702.5	1.27
	10	0.379	0.903	360.0	1.36

ตารางที่ 2 ค่าดัชนีความคล้ายคลึง (Similarity index; S) ของประชากรกบ (FL= กบขนาดใหญ่;
FS = กบขนาดเล็ก)

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10	FS1	FS2	FS3	FS4	FS5	FS6	FS7	FS8	FS9	FS10
FL1	1.00																			
FL2	0.91	1.00																		
FL3	0.82	0.91	1.00																	
FL4	0.73	0.82	0.73	1.00																
FL5	0.56	0.64	0.73	0.46	1.00															
FL6	0.56	0.64	0.73	0.46	1.00	1.00														
FL7	0.46	0.60	0.64	0.36	0.91	0.91	1.00													
FL8	0.46	0.56	0.64	0.56	0.91	0.91	0.82	1.00												
FL9	0.56	0.64	0.55	0.82	0.46	0.46	0.56	0.55	1.00											
FL10	0.64	0.73	0.64	0.91	0.55	0.55	0.46	0.64	0.91	1.00										
FS1	0.91	0.82	0.73	0.82	0.46	0.46	0.37	0.55	0.64	0.64	1.00									
FS2	0.91	0.82	0.73	0.82	0.46	0.46	0.36	0.55	0.64	0.73	0.91	1.00								
FS3	0.82	0.91	1.00	0.73	0.73	0.73	0.64	0.64	0.55	0.64	0.82	0.73	1.00							
FS4	0.64	0.73	0.64	0.73	0.55	0.55	0.64	0.64	0.73	0.64	0.64	0.73	0.64	1.00						
FS5	0.55	0.64	0.73	0.55	1.00	1.00	0.91	0.91	0.46	0.55	0.55	0.46	0.73	0.55	1.00					
FS6	0.45	0.55	0.64	0.36	0.91	0.91	1.00	0.82	0.55	0.50	0.50	0.36	0.64	0.64	0.91	1.00				
FS7	5.45	0.64	0.73	0.45	1.00	1.00	0.91	0.91	0.50	0.50	0.55	0.50	0.73	0.55	1.00	0.91	1.00			
FS8	0.50	0.55	0.64	0.55	0.91	0.91	0.82	1.00	0.55	0.64	0.50	0.55	0.64	0.64	0.91	0.83	0.91	1.00		
FS9	0.64	0.73	0.64	0.91	0.55	0.55	0.50	0.64	0.91	0.64	0.73	0.64	0.91	1.00	0.64	0.73	0.64	0.64	1.00	
FS10	0.64	0.73	0.64	0.91	0.55	0.55	0.50	0.64	0.91	0.64	0.73	0.64	0.91	1.00	0.64	0.73	0.64	0.64	1.00	1.00



รูปที่ 1 (ก) รูปแบบดีเอ็นเอของกบขนาดเล็กจากไพรเมอร์ 1) OPE15; 2) OPE17; 3) OPE19; 4) OPE20; 5) OPY15 และ 6) OPY19; (ข) รูปแบบดีเอ็นเอของกบขนาดใหญ่จากไพรเมอร์ 1) OPE15; 2) OPE17; 3) OPE19; 4) OPE20; 5) OPY15 และ 6) OPY19; (ค) ขนาดของ 100bp DNA ladder; M=100bp DNA ladder; nc= negative control



รูปที่ 2 Dendrograms ดรรชนีความคล้ายคลึง (Similarity index) ของประชากรกบขนาดเล็กและขนาดใหญ่ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA